



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

Trabajo de Tesis de Maestría en Plantas Medicinales

“Estudio anatómico y farmacológico de la especie  
*Schinus lentiscifolius* Marchand (Anacardiaceae)”.

---

Tesista: Lic. Qca. Catalina Vanegas Andrade

Directoras: Prof. Dra. María Inés Ragone

Prof. Mg. Sc. Marta Colares

2018

Dedicada a mis padres

A mi hermana

A quien alegra nuestros días con su sonrisa Valeria

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es fruto de un esfuerzo colectivo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas que durante la realización del mismo me brindaron apoyo, compañía y orientación.

Agradezco en primera instancia a las Facultades de Ciencias Exactas y Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme una excelente formación y permitirme realizar esta Tesis de Maestría en Plantas Medicinales. De igual manera a la comunidad académica en especial a la planta docente de la Maestría, que ofrecieron en cada una de sus clases las bases teóricas y prácticas necesarias para desarrollar esta investigación.

A mis directoras de Tesis Dra. María Inés Ragone y Mg. Sc. Marta Colares, por todo su apoyo, su conocimiento y el tiempo que dedicaron con paciencia a aconsejarme y guiarme a lo largo de este proceso.

A la Dra. Alicia Consolini, Directora de la Maestría en Plantas Medicinales, por abrirme las puertas de la Cátedra de Farmacología para realizar esta tesis, y apoyarla con sus consejos y orientación.

A los investigadores del laboratorio de farmacología Soledad, German y Matías por toda su ayuda.

A mis compañeros de estudio Tatiana, Milena, Silvina, Patricia y Jorge que hicieron cada momento más agradable.

A todas las personas que conocí en este hermoso país durante este tiempo, en especial a Cintia, Jose, Dalis, Caro, Marce y Yeinsson, porque sin sus risas y su compañía en el momento indicado, no habría sido lo mismo.

Agradezco de manera especial a mi familia, por el apoyo y la confianza que siempre me han brindado, por su interés constante en mi crecimiento profesional y personal y por brindarme las herramientas para que esto sea posible.

A todos los que no nombré pero que son parte de mi vida y de este sueño mil gracias por ayudarme a hacerlo realidad.

## Tabla de contenido

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	ANTECEDENTES .....	3
1.1.1	Antecedentes generales de la familia Anacardiaceae.....	3
1.1.2	Género <i>Schinus</i> .....	5
1.1.3	<i>Schinus lentiscifolius</i> Marchand (“molle ceniciento”).....	11
1.2	Importancia del screening farmacológico de extractos de plantas con uso medicinal popular .....	13
1.2.1	Generalidades de la contracción del músculo liso.....	15
1.2.1.1	Uso tradicional de plantas medicinales como antiespasmódicos gastrointestinales .....	19
1.2.2	Modelos experimentales empleados para el estudio de la actividad sobre el músculo liso:.....	24
2	. OBJETIVOS.....	31
2.1	Objetivos Generales.....	32
2.2	Objetivos particulares.....	33
3	. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1	Recolección, acondicionamiento y almacenamiento del material vegetal.....	36
3.1.1	Determinación taxonómica.....	36
3.1.2	Acondicionamiento del material vegetal .....	36
3.2	Estudios anatómicos .....	37
3.3	Extracción del material vegetal.....	38
3.3.1	Preparación del extracto hidro-alcohólico al 20% ( <i>SchT</i> ).....	38
3.3.2	Obtención del aceite esencial ( <i>SchA</i> ): .....	38
3.3.3	Preparación de la infusión de hojas de <i>S. lentiscifolius</i> ( <i>SchW</i> ):.....	39
3.3.4	Preparación del extracto de diclorometano ( <i>SchDCM</i> ):.....	39

3.3.5	Preparación del extracto acuoso (decocción) ( <i>SchH2O</i> ):.....	39
3.3.6	Preparación del extracto de acetato de etilo ( <i>SchAcEt</i> ):.....	39
3.4	ANÁLISIS FITOQUÍMICO: REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN: .....	40
3.4.1	Reacción con cloruro férrico (para ácidos hidroxámicos y fenoles): .....	40
3.4.2	Detección de Flavonoides.....	40
3.4.3	Detección de Triterpenos/esteroides.....	41
3.4.4	Estudio cromatográfico en capa delgada (CCD) .....	41
3.4.5	Identificación de compuestos por Cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-UV) .....	43
3.5	Screening farmacológicos en preparados biológicos.....	44
3.5.1	Animales utilizados .....	44
3.5.2	Preparados biológicos de órganos aislados .....	44
3.5.3	Ratones utilizados para la realización de test para evaluar comportamiento. ....	46
3.5.4	Soluciones y drogas empleadas .....	46
3.5.5	Estudio de actividad antiespasmódica en órgano aislado.....	49
3.5.6	Medidas de actividad central .....	52
4	.RESULTADOS .....	59
4.1	ESTUDIOS BOTÁNICOS .....	60
4.1.1	Morfología foliar .....	60
4.1.2	Anatomía Foliar.....	60
4.2	ANÁLISIS FITOQUÍMICO:.....	64
4.3	Ácidos hidroxámicos y fenoles:.....	64
4.3.1	Flavonoides: .....	64
4.3.2	Reacción de Shinoda: .....	65
4.3.3	Terpenos: .....	67

4.4	ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS .....	71
4.4.1	Estudio de la actividad antiespasmódica sobre el músculo liso intestinal del extracto hidroalcohólico ( <i>SchT</i> ) .....	71
4.4.2	Estudio de la actividad antiespasmódica sobre el útero del extracto hidroalcohólico ( <i>SchT</i> ) .....	77
4.4.3	Estudio de la actividad antiespasmódica sobre la vejiga aislada de rata del extracto hidroalcohólico ( <i>SchT</i> ) .....	85
4.4.4	Estudio de los efectos sobre la actividad central en ratones de los extractos obtenidos a partir de hojas .....	89
4.4.5	Estudios de los efectos ansiolíticos de los extractos.....	96
5	.DISCUSIÓN .....	105
5.1	ESTUDIO ANATÓMICO .....	106
5.2	ESTUDIO FITOQUÍMICO .....	107
5.2.1	Flavonoides.....	108
5.2.2	Triterpenos y esteroides.....	109
5.2.3	Análisis del aceite esencial .....	110
5.3	ESTUDIO FARMACOLÓGICO .....	112
5.3.1	Estudio del efecto de la tintura de sobre el músculo liso gastrointestinal. ...	112
5.3.2	Estudio del efecto de la tintura sobre el músculo liso uterino .....	117
5.3.3	Estudio del efecto de la tintura sobre el músculo liso urinario (vesical).....	122
5.3.4	Estudio de los efectos de la tintura, aceite e infusión sobre la conducta de ratones	123
5.3.5	Estudio de los efectos antidepresivos de la tintura, aceite e infusión.....	129
6	.CONCLUSIONES.....	132
7	.PUBLICACIONES.....	136
8	. BIBLIOGRAFIA .....	139





# **1. INTRODUCCIÓN**

Las plantas han ofrecido a los seres vivos, y al hombre en especial, innumerables beneficios, entre los cuales cabe resaltar el uso medicinal que se les ha dado desde hace milenios y que por transmisión oral o escrita ha llegado hasta la actualidad (Agostini Costa, 2018).

Hoy en día se sabe que muchos componentes de estas plantas con potencial farmacológico son producto del metabolismo secundario. Por ende, en vista de los múltiples usos farmacológicos que se han reportado, es de gran interés para la comunidad científica la aplicación de dichos productos como antibióticos, antivirales, pesticidas, entre otros usos dado que ofrecen nuevas alternativas terapéuticas en el tratamiento de diversas patologías.

En Argentina existen más de 1500 plantas con referencias de uso medicinal o tóxico (Rondina *et al.*, 1999), sin embargo, sólo un pequeño número de éstas han sido estudiadas y validadas científicamente. Es por ello que poco se conoce en cuanto a su descripción anatómica y morfológica, a su perfil fitoquímico y/o actividad farmacológica. De allí surge el interés de evaluar experimentalmente las propiedades de especies pertenecientes a la flora nativa y así enriquecer el conocimiento que hasta el momento se tiene de ella ya sea para avalar o desaconsejar su uso de modo tradicional.

De esta manera, el estudio realizado en esta tesis contribuirá a la correcta identificación de la especie nativa de Sudamérica *Schinus lentiscifolius* Marchand mediante su estudio morfo-anatómico y su relevancia para el uso fitoterápico mediante el screening farmacológico en el sistema nervioso central y a nivel del músculo liso gastrointestinal, uterino y urinario.

## **1.1 ANTECEDENTES**

### **1.1.1 Antecedentes generales de la familia Anacardiaceae**

#### **1.1.1.1 Generalidades:**

La familia *Anacardiaceae Lindl.* comprende 68 géneros y 600 especies entre los que se cuentan árboles, arbustos y lianas de amplia distribución y en su mayoría de clima tropical (Boelcke, 1992). Se describen generalmente como árboles o arbustos, en pocas ocasiones lianas, inermes o armados, a veces con taninos, resinas o látex tóxicos o irritantes (Metcalf & Chalk, 1950). Hojas simples o compuestas, alternas, sin estipulas; folíolos opuestos o alternos, aserrados o enteros; láminas oblongas, lanceoladas, elípticas, obovadas. Inflorescencia panículas, axilares o terminales. Flores perfectas o imperfectas, polígamo-dioicas o dioicas; cíclicas, actinomorfas. Cáliz con 3-5 sépalos, libres o soldados en la base, acrescentes. Corola con 5 pétalos, libres o soldados en la base, a veces ausentes. Estambres isostémonos o diplostémonos, diadelfos insertos en un disco anular, intraestaminal, crenado o lobado; anteras bitecas, oblongas u ovoides, de dehiscencia longitudinal. Ovario súpero, con 1-5 carpelos, unilocular, a veces pentalocular, con un óvulo por lóculo; estilos 1-5 libres. Fruto drupa o sámara, el mesocarpo carnoso o seco, endocarpo óseo (Dimitri, 1988).

### 1.1.1.2 Distribución geográfica y hábitat:

Es una familia principalmente tropical y subtropical. Se hallan representadas en América del Sur, África y Malasia, con algunos géneros nativos de Norteamérica y Eurasia (Fig. 1) (Heywood, 1985)



Figura 1: Distribución de la familia Anacardiaceae. Esquema extraído de Cabral 2010

### 1.1.1.3 Importancia económica y alimentaria

Dentro de esta familia se encuentran especies madereras y ricas en taninos, dentro de Argentina se pueden mencionar a algunas especies de la provincia Chaqueña: *Astronium balansae* Engl. (Urunday), *Schinopsis balansae* Engl. (Quebracho colorado), *Schinopsis lorentzii* (Griseb.) Engl. y *Schinopsis marginata* Engl. Los frutos de algunas especies como *Mangifera indica* L. (mango) constituyen un recurso alimentario de primer orden por su pulpa de agradable sabor y valor nutricional, de este fruto también se preparan bebidas o jarabes muy agradables, con los frutos aún verdes o bien maduros. *Spondias purpurea* L. (ciruelo de huesito), se cultiva de igual manera por su importancia alimenticia, sus frutos se comen cocidos y se utilizan para elaborar vinos u otras bebidas alcohólicas y refrescos.

Otra especie de importancia es *Anacardium occidentale* L. (castaña de Cajú) cuyos frutos consisten de una nuez con forma de riñón color pardo lustroso, ésta se ubica sobre un pedúnculo engrosado en forma de pera o fruto falso de color amarillo o rojo, comestible, de sabor ácido y algo astringente que se consume como fruta fresca. Las castañas de Cajú se aprecian por sus semillas que se consumen mundialmente tostadas y saladas, o pueden usarse en la elaboración de turrone (Cabral, 2010).

### **1.1.2 Género *Schinus***

Género de árboles pertenecientes a la familia Anacardiaceae. En Sudamérica se encuentran 28 especies pertenecientes al género *Schinus*, distribuidas principalmente en Argentina, Brasil, Uruguay, Paraguay y Chile. En particular en Argentina, el género *Schinus* está representado por 22 especies, algunas de las cuales han sido estudiadas y caracterizadas anatómicamente (Perrota & Arambarri, 2004).

Pertenecen a este género árboles poligamo-dioicos, de hojas simples o compuestas, cortamente pecioladas o sésiles, con flores numerosas, pequeñas, agrupadas en panículas o en pseudorracimos. Caliz formado por 4-5 sépalos, generalmente con márgenes ciliados. Corola conformada por 4-5 pétalos imbricados. Androceo compuesto por 8-10 estambres desiguales. Disco cupuliforme o acopado, compuesto por 8-10 lóbulos. Gineceo tricarpelar, unilocular, con tres estilos terminales. Fruto drupa con epicarpo papiráceo, de color violáceo o rojizo (Cantero, 2015).

### 1.1.2.1 Antecedentes etnomedicinales del género *Schinus*

Los estudios científicos han registrado que diferentes especies del género *Schinus* poseen propiedades medicinales en sus hojas, tallos y frutos (Perrota & Arambarri, 2004). Las especies que pertenecen a este género se caracterizan por tener aceites esenciales de olor concentrado, que se utilizan popularmente para tratar afecciones respiratorias, micosis o infecciones candidiales.

Dentro de las especies más conocidas pertenecientes a este género, tanto popularmente como a nivel científico, se encuentran las que se describen a continuación:

#### 1.1.2.1.1 *Schinus molle* L. (“falso pimentero”)



**Figura 2:** *Schinus molle*. Fuente: <http://viveroelprogreso.com.ar>

#### *Descripción morfoanatómica:*

Esta especie es un árbol dioico perennifolio (**Fig. 2**), de 5-10 m de altura, pero puede alcanzar hasta los 15 m, con un diámetro de 25 cm a 35 cm, de copa densa redondeada y abierta, de color verde oscuro. Tiene hojas compuestas, alternas, de 15 cm a 30 cm de largo, colgantes, con savia lechosa; imparipinnada, de 15 a 41 folículos, generalmente

apareados; tronco nudoso, ramas flexibles, colgantes y abiertas. Su corteza es rugosa, fisurada y color pardo oscuro mientras que sus flores en panículas axilares en las hojas terminales, de 10 a 15 cm de largo, pequeñas y numerosas, de color amarillento. El fruto es una drupa en racimos colgantes, cada uno de 5 mm a 9 mm de diámetro, rosados o rojizos, mesocarpo delgado y resinoso, contiene una o dos semillas. Las semillas poseen un embrión bien diferenciado que llena toda la cavidad; la testa y endospermo son delgados. (Alonso & Desmarchelier, 2005).

*Schinus molle* L. es un árbol de origen tropical, originario de Sudamérica, que se ha aclimatado bien en países tropicales y subtropicales de los cinco continentes. Florece en primavera y verano, los frutos aparecen en otoño y perduran durante el invierno. Presenta alelopatía, impidiendo el crecimiento y desarrollo de especies vecinas (Alba *et al.*, 2009).

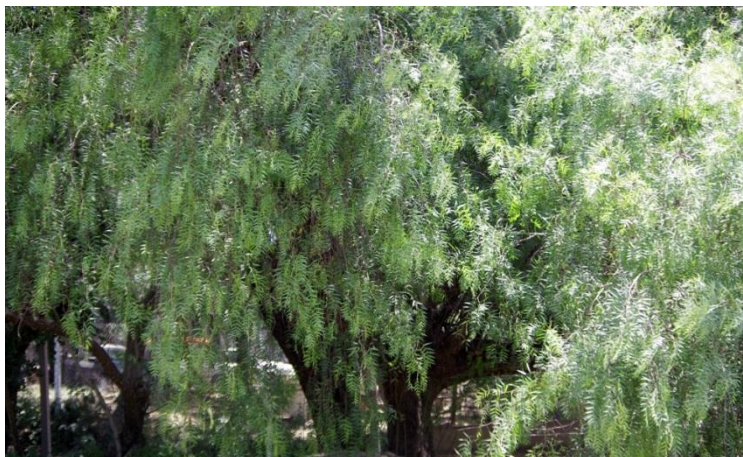
*Estudios científicos que avalan algunas de las actividades etnofarmacológicas de Schinus molle:*

En 1997, Barrachina & Bello mostraron que el extracto de diclorometano de las hojas de *Schinus molle* tiene actividad analgésica y depresora del sistema nervioso central, dado que inhibió totalmente la actividad motora y redujo significativamente el umbral del dolor. Por el contrario, otros autores mostraron que el extracto hexánico obtenido a partir de las hojas de esta especie demostró tener efectos antidepresivos mediante los modelos de natación forzada y suspensión de la cola en ratones (Machado, 2008).

Se demostró además que tanto los extractos metanólico y los de diclorometano de las hojas de *Schinus molle* reducen significativamente la presión arterial en ratas normotensas (Bendaoud & Romdhane, 2010).

Por su parte, el aceite esencial obtenido a partir de hojas frescas es activo como antimicrobiano frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Escherichia coli*, *Beneckeia natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y *Brochothrix thermosphacata* y como antifúngico frente a *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alternata* (Gundidza, 1993).

#### 1.1.2.1.2 *Schinus areira* L. (“Aguaribay”)



**Figura 3** *Schinus areira* L. Fuente: <http://sobreflora.blogspot.com>

#### *Descripción morfoanatómica*

El “aguaribay” es un árbol de ramas péndulas y delgadas, hojas verde grisáceas, glabras o pubérulas; folíolos opuestos, subopuestos o alternos en el raquis, 9-15 pares, lanceolados, de 36-54 mm de largo los basales (**Fig. 3**). Su fruto es una drupa globosa rosada a roja cuando madura, lisa, de unos 7 mm de diámetro, con fuerte fragancia parecida a la pimienta y de sabor picante (Cantero, 2015).

#### *Antecedentes etnofarmacológicos*



Tradicionalmente se emplean las hojas y la corteza de “aguaribay” en infusión para el tratamiento de la bronquitis, y en especial para el asma; en malestares reumáticos, hepáticos o estomacales. También se utilizan diferentes preparados para regular el ciclo menstrual, la hinchazón de las extremidades y para cicatrización de heridas (Barboza & Cantero, 2006). Se han realizado estudios con esta planta encontrándose efectos biológicos tales como: repelente, antibacteriano, antiviral, diurético antiséptico, hipotensor, antitumoral, analgésico, antioxidante y anti-inflamatorios (Rossetti, 2014).

#### **1.1.2.1.3 *Schinus terebinthifolius* Raddi (“Turbinto, pimentero de Brasil”)**



**Figura 4:** *Schinus terebinthifolius*. Fuente: <http://www.aromachat.com>

#### *Descripción morfoanatómica*

Es un árbol siempreverde, dioico (**Fig. 4**), resinoso, de 5-10 m de altura, con una copa densa, redondeada u ovoide, de color verde oscuro, y un tronco corto, a veces algo retorcido, con la corteza de color gris oscuro, al principio lisa, tornándose fisurada, agrietada y escamosa con el paso de los años; ramillas de color marrón claro, con fina pubescencia al principio y más tarde glabras, muy lenticeladas, resinosas. Tiene hojas

alternas, imparipinnadas, de 8-12 cm de longitud incluido el pecíolo, con el raquis de 4-9 cm de largo, estrechamente alado, puberulento, y el pecíolo de 2-3 cm de largo, puberulento, rojizo y no alado; folíolos 7-13, sésiles o subsésiles, de margen algo aserrado o entero. Inflorescencias en panículas axilares o terminales, piramidales, de 2,5-10 cm de longitud, muy ramificadas y con el raquis pubérulo; brácteas ovadas, de 1,5 x 1 mm, caedizas o persistentes. Sus flores pequeñas, verdosas, dispuestas en racimos axilares o terminales, unisexuales. Frutos en drupas globosas de 4,5-5 x 4-4,5 mm, lisas, de color rojo vivo, con el cáliz y el estilo persistentes. Semilla elíptica o reniforme, marrón claro, de unos 3 mm. (Alonso & Desmarchelier, 2005).

*Antecedentes etnofarmacológicos y estudios científicos que avalan algunos de los usos folclóricos conocidos:*

Esta especie es de amplio uso en medicina popular y se puede decir que casi todas las partes de la planta, incluyendo hojas, cáscaras, frutos, semillas, resinas, y oleoresina (o bálsamo), son empleadas medicinalmente por los pueblos indígenas por tener actividades antiinflamatorias, antidiarreicas, diuréticas y antipiréticas (Panneta & Mckee, 1997).

A nivel experimental se han llevado a cabo numerosos estudios que demuestran diferentes actividades farmacológicas, entre ellas la actividad antimicrobiana. El extracto etanólico de sus partes aérea fue activo frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que el extracto de la corteza inhibió sólo el crecimiento de *Saphylococcus aureus*. Además, el aceite esencial fue activo frente a *Saphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* debido a que ocasiona daño oxidativo de las cubiertas celulares de las bacterias mencionadas (Silva *et al.*, 2010).

En estudios realizados en mujeres con cervicitis y cervicovaginitis se comprobó la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de su corteza y se validó el uso popular como cicatrizante del decocto de su entrecorteza, del extracto hidroalcohólico y del aceite. (Alonso & Desmarchelier, 2005).

### 1.1.3 *Schinus lentiscifolius* Marchand (“molle ceniciento”)



**Figura 5:** *Schinus lentiscifolius* Marchand Fuente: <http://floranativadeuruguay.blogspot.com>

#### 1.1.3.1 Descripción de la especie

Esta especie es nativa de Argentina (Misiones: Candelaria, M. Belgrano, San Ignacio), Paraguay (Amambay, San Pedro), Brasil (Paraná, Rio Grande Do Sul, Santa Catarina) y Uruguay (Cerro Largo, Lavalleja, Montevideo, Rivera, Soriano, Tacuarembó, Treina y Tres Orientales) (Dimitri, 1988).

Es un árbol cuya altura varía entre 7 u 8 metros (**Fig. 5**). Presenta una copa redondeada, con un característico follaje glauco ceniciento, rasgo que la convierte en una apreciada especie ornamental. Sus hojas son pinado-compuestas, alternas, con 7-8 pares de folíolos cenicientos, sésiles, dispuestos sobre un raquis marcadamente alado. Su follaje es

persistente. Presenta flores blanquecinas dispuestas en panojas y frutos drupáceos, globosos, de 4 a 5 mm de diámetro de color liláceo conteniendo una semilla (Dimitri, 1988).

### **1.1.3.2 Estudios de los componentes de *S. lentiscifolius***

Existen estudios donde se caracterizó la composición del aceite esencial de ejemplares uruguayos de *S. lentiscifolius*, encontrando variedad de sustancias sesquiterpénicas como  $\delta$ -cadineno (16,79%), limoneno (10,36%), y germacrón(7,86%) (Rossini,1996).

De igual manera se caracterizó el aceite proveniente de ejemplares de Brasil y en concordancia con lo anterior se encontró que su principal constituyente es el  $\delta$ -cadineno (14,21%), seguido por el limoneno (8,14%) y en tercer lugar se encuentra el sabineno (5,08%) y no se halló ningún porcentaje de germacrón (Rossini, 1996; Pawlowski, 2013).

Sin embargo, no hay reportes del análisis del aceite esencial de ejemplares de *S. lentiscifolius* provenientes de Argentina, por lo cual este estudio fue uno de los objetivos de esta tesis de maestría.

### **1.1.3.3 Antecedentes etnofarmacológicos**

En medicina popular se utiliza como antiséptico y antimicrobiano, así como para el tratamiento de la leucorrea y la curación de heridas (Gehrke, 2013). Experimentalmente se analizó la actividad antibacteriana y se obtuvieron excelentes resultados frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Gehrke, 2013). Además de esto, se encuentran reportes que evidencian el efecto de su aceite esencial como fitotóxico y citotóxico en plantas de lechuga y cebolla (Pawlowsk *et al.*, 2013)

Si bien en la medicina popular se utiliza como antiespasmódico y en algunos casos para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso central, no hay estudios que avalen científicamente estos usos, ni estudios que evalúen alguna otra posible actividad farmacológica dada la proximidad taxonómica con otras especies de su género.

Por lo tanto, dado el potencial farmacológico que se ha encontrado en especies pertenecientes al género *Schinus* y a los escasos estudios que se encuentran de la especie *S. lentiscifolius* en particular, es de interés el estudio de sus propiedades farmacológicas.

## **1.2 IMPORTANCIA DEL SCREENING FARMACOLÓGICO DE EXTRACTOS DE PLANTAS CON USO MEDICINAL POPULAR**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado más de 119 sustancias químicas derivadas de aproximadamente 60 familias de especies vegetales y reconoce el papel medicinal de un gran número de plantas medicinales. Sin embargo, no son muchos los profesionales de la salud que consideran a estos productos naturales como opciones terapéuticas (Morón, 2010). El mayor conflicto expuesto por la comunidad médica con respecto a la utilización de la medicina natural es la ausencia de estudios preclínicos y clínicos que avalen los usos medicinales propuestos, por lo que tratamientos en base a sustancias de origen vegetal que han demostrado efectividad durante miles de años, sean desacreditados por distintos sectores de la comunidad médica (Feitosa, 2006).

Cabe destacar que las plantas medicinales son importantes no sólo para su uso directo como agente terapéutico sino también como materiales de base para el desarrollo de

medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos. World Health Organization (WHO),1991. La experiencia señala que el uso de plantas medicinales enteras y sus extractos tienen beneficios reales a largo plazo, ya que los componentes de las mismas actúan conjuntamente unos con otros (Viesca Treviño, 1991). Sin embargo, dado que no es posible la aprobación de medicamentos que sean mezclas indiferenciadas de productos químicos naturales, hay muy poca investigación sobre las plantas enteras. Además, debido a los altos costos en el aislamiento de cada principio activo y el tiempo que implica este proceso es muy poco el interés de la industria farmacéutica en este tipo de preparaciones (WHO, 1991).

En Argentina las plantas medicinales poseen diferentes canales de distribución, entre ellos las farmacias, las herboristerías y la industria farmacéutica. Hoy en día, la ley describe que el responsable legal en esta distribución siempre es un farmacéutico y las mezclas de medicamentos vegetales están controladas, así como las preparaciones hechas por la industria, en virtud de la Ley de Medicamentos No. 16.463 (Saldivia & Bandoni, 1987).

Sin embargo, el modo de la propagación del conocimiento en cuanto a la indicación o modo de uso conlleva a distintas formas de transmisión las cuales están asociadas normalmente a la automedicación. Estas vías son: la horizontal -entre individuos de una misma generación-, la vertical -de padres a hijos- y oblicua -entre líneas genealógicas emparentadas. (Hewlett & Cavalli-Sforza, 1986).

En el año 1993, se reglamentó en la provincia de Buenos Aires el registro y la comercialización de plantas medicinales, estableciéndose el registro de las hierbas

medicinales. Por lo que las herboristerías debieron registrar sus productos con documentación que garantice el nombre de la planta, parte de la planta utilizada, los principios activos, la identificación y las indicaciones, y en el caso de tratarse de una mezcla de hierbas, debe estar demostrado el beneficio de la combinación. (Ministerio de Salud y Acción Social, 1993)

A pesar de las reglamentaciones impuestas, estudios realizados en el año 2010 en zonas del interior de la provincia de Buenos Aires muestran que del 83% de las plantas medicinales utilizadas, más de la mitad son recolectadas en huertas o jardines, en terrenos baldíos o en zonas de sierra, siendo sólo el 25% de las mismas obtenidas en herboristerías o farmacias (Hilbert *et al.*, 2010).

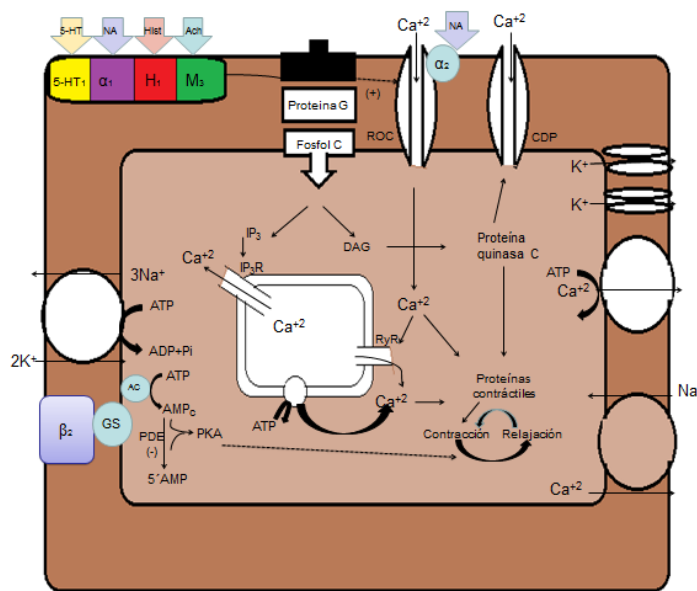
Además, hay muy pocos estudios científicos que avalen el uso medicinal de muchas plantas medicinales y son menos aún los datos acerca de sus efectos adversos y/o contraindicaciones avalados científicamente. Es por ello, que el estudio experimental de la actividad de los extractos de plantas medicinales mediante la realización de experiencias con preparados de tejidos aislados o en el comportamiento en animales son de gran utilidad para comprobar o desestimar el uso medicinal de diferentes especies vegetales tal como se utilizan en la población en general. Además, mediante este tipo de estudio es posible detectar potenciales efectos adversos o contraindicaciones del uso de las mismas

### **1.2.1 Generalidades de la contracción del músculo liso**

El músculo está formado por células uninucleadas y fusiformes, que forman agrupamientos irregulares y desarrollan una función contráctil debido a la presencia de

miofilamentos de actina y miosina (Gal, 2007). Este tipo de músculo constituye una gran parte de la pared de las vísceras como el tubo digestivo desde la zona media del esófago hasta el esfínter anal interno, bronquios, vejiga, útero y vasos sanguíneos (Rang, 2008).

El proceso de contracción del músculo liso es mucho más lento que el del músculo esquelético o cardíaco y está regulado por la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , la cual puede aumentar al ser liberado por el retículo sarcoplasmático o por el ingreso de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de los canales tipo L voltaje-dependientes o canales sensibles a las dihidropiridinas (DHP). (Rang & Dale, 2008). En la figura 6 se muestra un esquema general de las vías implicadas en la contracción y relajación del músculo liso.



**Figura 6:** Mecanismo general de contracción-relajación de músculo liso

En esta tesis estudiamos los efectos de la tintura de *S. lentiscifolius* en tres músculos lisos diferentes: el músculo liso del intestino (duodeno e ileon), el útero y la vejiga.

El *duodeno e ileon de rata* constituyen un modelo “ex vivo” para estudiar los efectos gastrointestinales antiespasmódicos de fármacos y extractos de plantas. En el



intestino, la contracción del músculo liso está desencadenada por dos tipos de estímulos: despolarización por una actividad marcapaso conducida entre fibras que activa canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y por la estimulación parasimpática que aumenta el peristaltismo por acción de la acetilcolina (ACh) en los receptores muscarínicos (principalmente M3) acoplados a una proteína Gq y a la cascada PLC/DAG/PKC que fosforila y activa canales de  $\text{Ca}^{+2}$ . Por otro lado, los efectos inhibitorios sobre el músculo liso intestinal son ejercidos por el sistema nervioso simpático, y están mediados principalmente por los receptores  $\beta_2$ . Estos receptores median la relajación del músculo intestinal por activación de la adrenalina circulante en plasma mediante la vía Gs/AC/AMPC/PKA que fosforila a la KCLM (la quinasa de la cadena liviana de la miosina) reduciendo la contractilidad de las fibras musculares lisas (Brunton *et al.*, 2011). También hay receptores  $\alpha_1$  localizados principalmente en las zonas de los esfínteres regulando su contracción (vía Gq) encontrándose en mucha menor proporción que los receptores  $\beta_2$ . Además de los receptores colinérgicos y adrenérgicos, en el músculo liso intestinal hay receptores de serotonina (5HT) e histamina (principalmente H1) entre otros que regulan la actividad intestinal. (Karamenderes & Apaydin, 2003; Emendörfer *et al.*, 2005; Brunton *et al.*, 2014).

Por su parte, *el músculo liso uterino* tiene tanto inervación simpática como parasimpática. Los receptores muscarínicos presentes son de los subtipos  $M_1$  y  $M_3$ , los que al igual que en intestino y demás músculos lisos están acoplados a una proteína Gq y conducen al aumento del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y el consecuente aumento del tono uterino. En particular el útero presenta una respuesta que varía entre especies y con el estado gestacional, predominando especialmente los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos en el útero no gestante, que generan aumento del tono del músculo liso, y los  $\beta_2$ -adrenérgicos en el

útero gestante que inducen relajación (Brunton *et al.*, 2011; De Carvalho *et al.*, 2014). Además, el útero responde a otros agonistas: oxitocina, serotonina (5-HT) y prostaglandinas (PGF2 $\alpha$ ) quienes disparan la activación de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L. La oxitocina y la prostaglandina PGF2 $\alpha$  son los agentes oxióticos naturales encargados de desencadenar el parto, mientras Ach y 5HT ejercen un rol modulador menor en condiciones no gestantes. (Darios *et al.*, 2012).

En el caso de la *vejiga*, ésta es una víscera formada principalmente por dos músculos: el detrusor y el trígono. El detrusor es el músculo que forma la pared de la víscera, y su contracción que promueve la expulsión de la orina y el vaciamiento de la vejiga es desencadenada por la activación de neuronas parasimpáticas, las cuales liberan acetilcolina (Ach) que activa a los receptores muscarínicos de tipo M3. En el detrusor, juegan un rol importante los canales de K<sup>+</sup> dependientes de voltaje y de Ca<sup>2+</sup>, y conocidos como “big channels” por su gran conductancia. Al igual que el músculo uterino, el detrusor tiene receptores adrenérgicos  $\beta_2$  que inducen la relajación. En cambio, trígono hace las veces de esfínter, permitiendo la salida de la orina hacia la uretra y los uréteres, mediante la activación de los receptores M<sub>2</sub> acoplados a proteína Gi que promueven la relajación del mismo o evitando la salida de orina mediante la activación por noradrenalina de los receptores  $\alpha_1$  – adrenérgicos. (Andersson, 2003). Por lo tanto, el detrusor y el trígono reciben una regulación externa a cargo del sistema nervioso autónomo, que mediante las ramas parasimpática y simpática dispara simultáneamente la contracción del detrusor y la relajación del trígono para promover la micción, o los efectos opuestos durante los períodos de llenado de la vejiga (Andersson & Arner, 2004).

### **1.2.1.1 Uso tradicional de plantas medicinales como antiespasmódicos gastrointestinales:**

Los fármacos antiespasmódicos son por definición aquellos que ayudan a tratar los espasmos musculares intentando calmar o neutralizar las contracciones involuntarias de los músculos (Velázquez *et al.*, 2009). Comúnmente, son utilizados sin prescripción médica por la población para los espasmos digestivos. Sin embargo la mayoría de los fármacos antiespasmódicos por su efecto anticolinérgico o bloqueante de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  pueden ocasionar gran cantidad de efectos adversos (Brunton *et al.*, 2011)

Muchas plantas medicinales obtenidas en farmacias o herboristerías son utilizadas hoy en día por sus propiedades antiespasmódicas, ya sea por considerarse remedios naturales, por su bajo costo o por costumbre popular. Estudios observacionales descriptivos realizados en la provincia de Buenos Aires mostraron que en el término de un año (2005-2006) se dispensaron 43.608 plantas medicinales, entre droga cruda y productos fitoterápicos, siendo el 27,8% de las totales de utilización para desórdenes en el sistema gastrointestinal. Sin embargo un 85,1% del consumo total de especies vegetales fueron por automedicación y no por prescripción médica ni indicación farmacéutica (Consolini *et al.*, 2007). Si bien el porcentaje total de plantas dispensadas para trastornos gastrointestinales es relativamente bajo, especies como “malva” y “manzanilla”, “que son utilizadas con un fin antiespasmódico, se encontraron entre las 10 especies más dispensadas en la farmacia. (Consolini *et al.*, 2007).

Por otro lado, estudios *ex vivo* en ileon de cobayo mostraron que extractos etanólicos preparados a partir de hojas de *Mentha piperita* (“menta”) y *Matricaria chamomilla* (“manzanilla”) corren hacia la derecha la curva concentración respuesta de acetilcolina e

histamina de manera dosis dependiente mostrando un antagonismo competitivo en los receptores muscarínicos e histamínicos (ver cascadas intracelulares derivadas de la activación de estos receptores en Figura 5) , lo cual confiere evidencia científica al uso popular de ambas especies utilizadas por la población en general (Foster *et al.*, 1980).

En el laboratorio de farmacología, Facultad de ciencias exactas de la UNLP, se han estudiado los efectos antiespasmódicos gastrointestinales de varias plantas medicinales originarias de Sudamérica. Una de las especies vegetales de alto consumo por la población para los trastornos digestivos es el “cedrón” (Consolini *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta hace algunos años no había estudios científicos que avalaran dicho uso. Mediante estudios *ex vivo* en duodeno e ileon de rata se mostraron los efectos espasmolíticos de los extractos acuosos de cedrón (*Aloysia citriodora*), los cuales están asociados a un incremento en la concentración del GMPc y la activación de los canales de K<sup>+</sup>, siendo el flavonoide vitexina responsable en parte de este efecto. (Ragone *et al.*, 2007). De la misma manera, se avaló experimentalmente el uso popular de “burrito” (*Aloysia polystachya*) y de “palo amarillo” (*A. gratissima*) como digestivos antiespasmódicos (Consolini *et al.*, 2011).

De esta manera, en los últimos años se ha avanzado en el estudio de las propiedades antiespasmódicas gastrointestinales de varias plantas medicinales. En el presente trabajo se evaluará la actividad de la tintura de *S. lentiscifolius* en el duodeno e ileon aislado de rata dado que esta planta nativa de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay es muy utilizada en la medicina popular como antiespasmódica, y como se mencionó en secciones anteriores éste efecto aún no ha sido avalado científicamente (Gehrke, 2013; Pawlowski, 2013).

### **1.2.1.2 Uso tradicional de plantas medicinales como antiespasmódicos uterinos:**

Existen gran cantidad de estudios fitoquímicos de plantas de uso común que muestran la presencia de metabolitos secundarios (flavonoides, taninos, alcoholes aromáticos u otros) con actividad farmacológica en distintos blancos terapéuticos inclusive el músculo uterino.

Muchas plantas medicinales son utilizadas mundialmente para el tratamiento de la dismenorrea primaria por sus propiedades relajantes del músculo liso uterino (van Andel *et al.*, 2014). Si bien este trastorno no es concebido como un problema de salud grave, la dismenorrea primaria o dolor pélvico asociado al período menstrual femenino es una de las enfermedades más comunes en el área de ginecología en mujeres en edad fértil (Monterrosa, 2001).

Se ha encontrado que el exceso de prostaglandinas es en parte responsable de dicho trastorno por estimular y/o aumentar las contracciones uterinas, con lo cual la mayoría de los fármacos utilizados tienen como objetivo fundamental la regulación de la producción de las mismas (Lindsey *et al.*, 1998; Brunton *et al.*, 2016).

Gran variedad de aceites esenciales extraídos de plantas medicinales poseen componentes tales como quercetina, limoneno, eugenol entre otros, que tienen comprobada acción inhibitoria de las prostaglandinas con lo cual podrían ser utilizados en el tratamiento de la dismenorrea (Browner, 1985).

Además, la actividad sobre el músculo liso uterino de cualquier principio activo derivado de una especie vegetal debe ser tomada como precaución y/o contraindicación de uso durante el embarazo, dado que el uso de plantas medicinales durante la preñez está

asociado con diversos procesos carcinogénicos e involucrado en malformaciones congénitas por la facilidad de los principios activos de atravesar la placenta (Macías Peacock *et al.*, 2009).

En Latinoamérica existen pocos estudios del consumo de plantas medicinales durante el embarazo. Investigadores cubanos encontraron que en la provincia de Santiago (Cuba) la mayoría de las mujeres embarazadas evaluadas consumieron plantas medicinales durante el primer trimestre sin prescripción médica (Macías Peacock *et al.*, 2009). En dicho estudio, las plantas más utilizadas fueron la menta (*Mentha arvensis*), el tilo (*Justicia pectoralis*), la verbena (*Stachytarpheta jamaicensis*) y el anís (*Piper auritum*). Cabe destacar que en los perfiles de dichas especies se identificaron metabolitos activos capaces de provocar abortos espontáneos, teratogénesis y otros trastornos adversos para la etapa de embarazo (Macías Peacock *et al.*, 2009).

Si bien no hay estudios de la actividad sobre el músculo liso uterino de nuestra especie en estudio, hay registro de las propiedades abortivas por efecto uterino directo de otras especies vegetales pertenecientes a la familia Anacardiaceae. En este sentido, en Brasil se encuentra la especie *Anacardium occidentale L* que es usada como abortivo por las comunidades indígenas Krahô (Rodrigues, 2006), mientras que en Argentina hay registro del uso de la decocción del *Schinopsis lorentzii* en comunidades indígenas Chorote del Chaco argentino con similar fin abortivo (Scarpa, 2009).

Por ende, dado la relación filogenética entre ambas especies y los antecedentes etnofarmacológicos de uso de *Schinus* como antiespasmódico es de interés el estudio de sus propiedades sobre el músculo liso uterino de forma de profundizar en el conocimiento de sus propiedades farmacológicas y efectos adversos o contraindicaciones, de forma de lograr

que de manera apropiada puedan ser integrados en la medicina convencional de manera segura.

### **1.2.1.3 Uso tradicional de plantas medicinales como antiespasmódicos vesicales:**

La incontinencia urinaria o el síndrome de vejiga hiperactiva son los trastornos urinarios más frecuentes en toda la población. Si bien, el grupo etario más afectado por lo general son los ancianos, puede también afectar tanto a hombres como mujeres entre los laboralmente activos, impactando negativamente no sólo en la calidad de vida sino también en las relaciones personales y profesionales. (Abrams *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2009).

Estudios multicéntricos realizados por la Asociación Española de Urología muestran que la población femenina entre 25 y 65 años posee mayor prevalencia de estas patologías lo que implica un problema sanitario y económico. De la mayoría de las mujeres estudiadas (3.090), el 25 % recibió tratamiento farmacológico con fármacos con relajante del músculo detrusor de la vejiga (tolterodina u oxibutinina: ambos fármacos con acción anticolinérgica), mientras que el resto recibió fisioterapia o en algunos casos fue necesario la realización de procedimientos quirúrgicos. (Martinez Agullóa *et al.*, 2010).

Si bien los fármacos antimuscarínicos utilizados presentan gran selectividad por el músculo liso vesical, ambos presentan efectos adversos sistémicos como somnolencia, sequedad ocular, visión irregular, estreñimiento y disuria. Además se debe tener especial precaución en pacientes con insuficiencia renal y/o hepática ya que debe reajustarse la dosis de los mismos (Brunton *et al.*, 2011).

Gran cantidad de estudios farmacológicos encontraron que el efecto de las plantas medicinales o extractos derivados de ellas producen inhibición o estimulación de los receptores muscarínicos y por lo tanto muchas de ellas poseen reportes de uso en desórdenes del tracto genito - urinarios (Gholamnezhad *et al.*, 2018).

Sin embargo, existen también otras plantas que producen la contracción del músculo detrusor de la vejiga por una vía independiente al receptor muscarínico dado que la actividad constrictora no es afectada por atropina (Dias *et al.*, 1995).

Dado que el uso tradicional de *S. lentiscifolius* es como antiespasmódico, y los mecanismos involucrados en la contracción del músculo liso gastrointestinal y de la vejiga son similares, es de nuestro interés evaluar los efectos de esta planta sobre el músculo detrusor aislado de rata.

### **1.2.2 Modelos experimentales empleados para el estudio de la actividad sobre el músculo liso:**

Los experimentos en órganos aislados (“*ex vivo*”) permiten conocer sobre qué tipo de receptor actúa un compuesto químico, por lo que si hay un grupo de sustancias que interactúe con el mismo sistema receptor produciendo la misma clase de efectos, es posible comparar sus respectivas propiedades de interacción droga-receptor (Kenakin, 1984). Por lo tanto, estos preparados pueden ser utilizado efectivamente para obtener información acerca de principios activos obtenidos de plantas y de esta manera lograr un acercamiento a la definición del mecanismo de acción de estos principios activos (Consolini & Ragone, 2017).



Con el objeto de obtener los parámetros de interacción fármaco-receptor se construyen curvas concentración respuesta (CCR) la cual consiste en un barrido de los efectos producidos por un rango amplio de concentraciones del agonista. Para el estudio de los efectos de extractos de origen vegetal se utiliza el método de CCR acumulativa dado que es el más rápido para realizar estas curvas y para la obtención de los parámetros correspondientes que caracterizan la interacción droga-receptor. El mismo consiste en el agregado de una serie de concentraciones crecientes del agonista hasta lograr el efecto máximo del tejido elegido, luego se realizarán las mismas curvas en presencia de diferentes concentraciones del extracto en estudio. Este método nos permitirá deducir el tipo de interacción existente entre el extracto y los receptores presentes en el preparado y calcular los parámetros correspondientes a tal interacción (Consolini & Ragone, 2017).

#### **1.2.2.1 Uso de plantas medicinales en trastornos del sistema nervioso central**

Históricamente, las diferentes culturas han buscado “remedios” o acciones que busquen mejorar la calidad de vida. Hoy en día, el insomnio y la ansiedad son motivos frecuentes de consulta en atención primaria. Problemas relacionados con el trastorno del sueño o insomnio, ansiedad, nerviosismo y la depresión leve son trastornos para los cuales la utilización de plantas medicinales podría ser una opción eficaz y segura frente a los fármacos de síntesis empleados en la actualidad, siempre y cuando haya supervisión médica adecuada al tratamiento y un correcto diagnóstico de la patología (Castillo & Martinez, 2016).

La Fitoterapia, en el abordaje de las patologías psiquiátricas, es por lo general de transmisión muchas veces oculta, con un ejercicio discreto, práctico y carente de estructura publicitaria y/o marketing internacional. Por otra parte, la medicina clásica con blanco de

acción a nivel del sistema nervioso central ha resultado un tanto invasiva, orientada al síntoma y generadora de dependencia. Sin embargo, el servicio de salud debería complementar lo que la población autóctona misma puede realizar y proporcionar una ayuda para aumentar la eficacia de las iniciativas de la población aproximando ambos saberes. (Fridman *et al.*, 2008).

En el ámbito de la salud mental la existencia de la etnomedicina ha sido esencial para la supervivencia de las comunidades indígenas dado que la atención en salud basada en la tecno- medicina ha llegado en algunos lugares de forma tardía y tangencial (Fridman *et al.*, 2008). En la actualidad, la medicina “moderna” y la tradicional, se interrelacionan y podrían complementarse libremente evitando posible interacciones medicamentosas a partir de los conocimientos etnobotánicos y los estudios científicos que avalen los usos populares.

La utilidad de muchas plantas medicinales en el tratamiento del insomnio, la ansiedad y el nerviosismo está comprobado científicamente, sin embargo, es indispensable establecer la diferencia entre plantas con actividad hipnótica y plantas con actividad sedante. Mientras que las plantas con acción hipnótica contienen principios activos capaces de provocar el sueño con la ventaja adicional de que no alteran la arquitectura del mismo y ayudan a recuperar el sueño de forma adecuada al individuo; las plantas con acción sedante contiene agentes capaces de reducir la actividad y la excitación (Castillo & Martinez, 2016).

Dentro del gran número de especies vegetales que se utilizan con estos fines hay diferentes grupos en función de los datos experimentales y clínicos existentes en la bibliografía que justifiquen su uso tradicional (Castillo & Martinez, 2016).

En un extremo, podemos citar a *Valeriana officinalis* como una de las plantas con más estudios científicos que avalan su actividad inductora del sueño, ansiolítica y sedante (Becker *et al.*, 2014; Neamati *et al.*, 2014). Si bien la OMS la incluye como una planta sedante e inductora del sueño y constituye una alternativa al uso de las benzodiazepinas, es muy difícil la estandarización de los extractos de la misma debido a la variación en la composición de esta especie vegetal (Herrera-Arellano *et al.*, 2001). También especies como *Passiflora incarnata* y *Piper methysticum* cuentan con varios estudios preclínicos y clínicos que avalan su uso como tranquilizantes (Grundman *et al.*, 2008; Sarris *et al.*, 2012; Chua *et al.*, 2016; Gazola *et al.*, 2018).

En el otro extremo hay una gran variedad de plantas de venta libre cuya actividad no está demostrada en absoluto en seres humanos aunque presenten estudios preclínicos que avalen su actividad (Castillo García & Martínez Solís, 2016). Sin embargo, en función de su inocuidad se emplean frecuentemente en estas indicaciones. Dentro de estas especies podemos mencionar *Tilia cordata*, *Lippia citriodora* y *Verbena officinalis*, entre otras.

Como se mencionó anteriormente existen otras especies de *Schinus* que poseen efectos a nivel del sistema nervioso central como sedante y como antidepresivo (Machado, 2008), pero no existen en bibliografía estudios del uso de *S. lentiscifolius* con tales fines, por lo cual resulta de gran interés la evaluación de su posible actividad central.

### **1.2.2.2 Modelos experimentales empleados para el estudio de la actividad sedante y antidepresiva**

Los modelos experimentales que emplean animales se han utilizado para la comprensión de diferentes trastornos de comportamiento en humanos, un ejemplo de estos son los que analizan el miedo y la ansiedad. Puede definirse a la ansiedad como un estado de agitación, inquietud, que se relaciona con la previsión de peligros futuros e indefinibles. Es una respuesta difusa, caracterizada por la intranquilidad e hipervigilancia, que sirve para la adaptación a un entorno desconocido, sin embargo, las variantes patológicas de la misma pueden obstaculizar el desarrollo normal en la cotidianidad de las personas que la padecen. En animales, específicamente en ratas y en ratones, reacciones como la hipervigilancia, la evitación y el escape, se consideran respuestas adaptativas normales, pero podrían convertirse en perjudiciales si se salen de control, por ello los modelos animales son una herramienta clave para dilucidar y entender los mecanismos neurobiológicos que son la base de la ansiedad normal así como de sus variaciones patológicas (Ohl, 2005).

Para que el modelo logre recrear experimentalmente las condiciones que dan lugar a la enfermedad en el hombre, tenga fidelidad en la reproducción de los aspectos generales de la patogenia en el humano y que a la vez la respuesta a los tratamiento prediga los efectos de dichos tratamiento en la clínica; debe reunir tres condiciones a saber: validez de constructo, validez de apariencia y validez predictiva (Consolini & Ragone, 2017).

Para el estudio de la ansiedad existen más de treinta modelos animales, entre los que se distinguen dos tipos: aquellos que recurren a respuestas condicionadas y los que utilizan

respuestas más naturales de la especie, que son considerados modelos etiológicos o de respuesta no condicionada (Cavalehr Machado *et al.*, 2008).

El test utilizado en esta tesis para evaluar los efectos centrales de los extractos de *S. lentiscifolius* fue el **test de campo abierto** (*Open field*). Este test permite evaluar los efectos de fármacos o extractos de plantas en las medidas conductuales de exploración (locomoción, olfateo y enderezamientos) y miedo o emocionalidad (acicalamiento, defecación, micción). Si bien el test de campo abierto es uno de los test más sencillos utilizados para evaluar los efectos centrales de diferentes sustancias, presenta la principal desventaja de que es un test muy sensible ante las variaciones de determinados factores potencialmente estresantes (Cárdenas & Navarro, 2002).

Para evaluar los efectos ansiolíticos de los extractos de *S. lentiscifolius* se utilizó el **test de supresión de alimento** (*novelty suppressed feeding*), el cual se basa en el conflicto de los roedores entre el impulso de comer y el miedo a lo novedoso y a los espacios abiertos. La latencia para comenzar a comer refleja la situación de conflicto a la que se enfrenta el animal; la capacidad para resolver estos dilemas está inversamente relacionada con la ansiedad y el estrés (Oliveira, 2013).

Otro test, no necesariamente etológico, empleado para evaluar los efectos centrales de los extractos de *S. lentiscifolius* es el **test de suspensión por la cola**, relevante para el screening de sustancias con potencial antidepressivo. Esta prueba se fundamenta en la hipótesis de que si un animal normal es sometido a una situación insoluble y aversiva, puede optar entre dos comportamientos, la agitación que es un comportamiento de búsqueda caracterizado por actividad intensa y gasto de energía; o la inmovilidad que por el contrario es un comportamiento de espera con ahorro de energía. Si una sustancia tiene potencial como antidepressivo se espera que modifique el equilibrio de estas formas de comportamiento en

favor de la búsqueda y agitación. (Steru *et al.*, 1985). Las plantas han ofrecido a los seres vivos, y al hombre en especial, innumerables beneficios, entre los cuales cabe resaltar el uso medicinal que se les ha dado desde hace milenios y que por transmisión oral o escrita ha llegado hasta la actualidad. La gran cantidad de sustancias que dentro de la planta tienen este potencial farmacológico, se sabe hoy en día que son producto del metabolismo secundario, y en vista de las múltiples funciones que han reportado, ha sido de interés para la comunidad científica la aplicación de estos como antibióticos, antivirales, pesticidas, entre otros que ofrezcan desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de diversas patologías.

En Argentina existen más de 1500 plantas con referencias de uso medicinal o tóxico (Rondina *et al.*, 2003), sin embargo, sólo un pequeño número de éstas han sido estudiadas y validadas científicamente para conocer tanto su descripción anatómica y morfológica, como su perfil fitoquímico y actividad farmacológica. Es por esto que surge el interés de evaluar experimentalmente las propiedades de especies pertenecientes a la flora nativa y así enriquecer el conocimiento que hasta el momento se tiene de ella, así como avalar o desaconsejar su uso de modo tradicional.

De esta manera, el presente trabajo de investigación contribuirá a la correcta identificación de la especie nativa *Schinus lentiscifolius* Marchand mediante su estudio morfo-anatómico, así como al conocimiento de los principios activos por su perfil fitoquímico, su relevancia para la fitoterapia del sistema nervioso central, gastrointestinal y urinario.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVOS GENERALES

- a) Efectuar estudios botánicos de *S. lentiscifolius* con el fin de contribuir al conocimiento de esta especie nativa de Argentina.
- b) Validar sus usos en medicina popular como antiespasmódico intestinal, vesical y uterino, mediante el estudio farmacológico en diferentes modelos experimentales.
- c) Evaluar si sus extractos tienen acción a nivel del sistema nervioso central, ya sean como posibles indicaciones o como efectos adversos.
- d) Analizar fitoquímica y cromatográficamente el contenido de flavonoides y terpenos en sus extractos polares y no polares, para contribuir al conocimiento de la especie y adjudicar la acción farmacológica a los principales componentes de la misma.



## 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Efectuar estudios morfológicos y anatómicos de sus hojas para caracterizar elementos de diagnóstico, a fin de asegurar la correcta identificación de la especie dado que la misma puede ser utilizada con fines medicinales.
- b) Evaluar la actividad gastrointestinal de sus extractos en duodeno e íleon aislados de rata y de cobayo mediante el uso de curvas concentración- respuesta y estudiar el mecanismo de acción farmacológico.
- c) Evaluar la actividad espasmolítica urinaria y uterina de sus extractos en vejiga y útero aislado de rata mediante el uso de curvas concentración-respuesta y estudiar el mecanismo de acción farmacológico.
- d) Evaluar los efectos de sus extractos en el comportamiento espontáneo de ratones, y en situación de conflicto.
- e) Evaluar el efecto antidepresivo de sus extractos, y compararlo con fármacos de actividad central conocida.
- f) Realizar mediante cromatografía de capa delgada (CCD) y reacciones de caracterización, un estudio fitoquímico con el propósito de obtener información respecto a la presencia y/o ausencia de diferentes metabolitos secundarios en sus extractos.
- g) Analizar la tintura de *S. lentiscifolius* aplicando la técnica de Cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-UV) que permite la determinación del perfil cromatográfico (*finger print*).

h) Analizar el aceite esencial de *S. lentiscifolius* empleando la técnica de Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de Masas y Detector de Ionización de Llama (GC-FID-MS).

# **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 RECOLECCIÓN, ACONDICIONAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL**

El material vegetal fue recolectado en el mes de octubre (primavera) en horas de la mañana. Se recolectaron hojas y tallos frescos provenientes del Jardín Botánico y Arboretum “C. Spegazzini”, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

Hojas en completo estado de desarrollo se herborizaron y se depositaron en el Herbario LPAG (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata) (Holmgren *et al.*, 1990). El material vegetal fresco fue secado a estufa a 40°C y posteriormente triturado a polvo grueso, el cual fue almacenado al abrigo de la luz y la humedad.

#### **3.1.1 Determinación taxonómica**

El material vegetal recolectado fue determinado en el Área de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

#### **3.1.2 Acondicionamiento del material vegetal**

El material fresco se fijó en FAA (solución de formalina: ácido acético glacial: alcohol etílico 50 %, 5:5:90).

Para los estudios posteriores, el material recolectado fue secado en estufa con convección forzada de aire a 40° C, molido a polvo grueso y almacenado al abrigo de la luz y la humedad.

### 3.2 ESTUDIOS ANATÓMICOS

Para el estudio de la anatomía se emplearon hojas en completo estado de desarrollo. La exomorfología foliar fue examinada con un microscopio estereoscópico Wild M8. Los estudios epidérmicos fueron hechos sobre ambas caras del folíolo, en su parte media y sobre ambos lados de la vena media, empleando las hojas transparentes obtenidas aplicando la técnica de diafanización de Dizzeo de Stritmatter (1973) de acuerdo al siguiente protocolo:

1. El material previamente fijado en FAA, se colocó en un vaso de precipitado con alcohol 96° y se llevó a ebullición 10 minutos.
2. Transcurrido ese tiempo se pasó a una solución de alcohol 96° y NaOH al 5% en partes iguales. Se llevó a ebullición durante un minuto.
3. Se efectuaron varios lavados hasta que el agua quedó totalmente limpia.
4. Se pasó el material lavado a agua destilada y se efectuaron dos cambios.
5. El material se introdujo en una solución de NaClO al 50% y se dejó hasta tornarse transparente.
6. Se pasó a agua destilada y se efectuaron 5 cambios de 3 minutos cada uno.
7. El material se colocó en Hidrato de Cloral (5 g en 100 ml de agua destilada) el tiempo necesario hasta quitarle opacidad.
8. El material transparente de hoja fue lavado, coloreado con solución alcohólica de safranina O al 80% y montado con gelatina glicerina.

Para el estudio de las estructuras de folíolo, pecíolo y raquis se efectuaron cortes transversales a mano alzada. Las secciones logradas fueron decoloradas con hipoclorito de sodio al 50 % y lavadas para seguir dos caminos: (1) una parte de las secciones decoloradas

se montaron en gelatina-glicerina incolora; (2) otra parte de las secciones se colorearon con safranina en solución alcohólica al 80% para luego montarlas en gelatina-glicerina.

Se realizaron pruebas histoquímicas con Lugol para almidón, Sudán IV para lípidos y cloruro férrico 10 % + carbonato de calcio para taninos (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Zarlavsky, 2014).

### **3.3 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

#### **3.3.1 Preparación del extracto hidro-alcohólico al 20% (SchT)**

Se pesaron 20 g de polvo de la parte aérea desecada de *S. lentiscifolius* y se agregaron 80 ml de etanol 70°, se dejó en maceración dinámica en un envase ámbar tapado por 48 horas en un lugar fresco, posteriormente se filtró. Para evaluar el rendimiento se pesaron y evaporaron 5ml del extracto hasta obtener peso constante, el cual resulto de un valor de 0.1g por lo que el rendimiento fue del 10%. Por lo tanto la tintura madre del 20% equivale a una concentración de 20 mg de residuo/ml de tintura. Todas las dosis y posteriores diluciones fueron calculadas a partir de este rendimiento.

#### **3.3.2 Obtención del aceite esencial (SchA):**

La metodología propuesta elegida fue la Determinación cuantitativa de esencias (Metodo del National Formulary. XIV, 1975). En el balón de 6 litros de vidrio Pyrex se colocaron 100g de la droga reducida a trozos pequeños, exactamente pesados. Se adicionó agua destilada en cantidad suficiente hasta cubrir la droga, mezclando homogéneamente, y agregando, plato poroso. Se colocó la trampa graduada para esencias menos densas que el agua y el refrigerante. Se adicionó agua destilada por la parte superior del refrigerante hasta el interior del balón. Luego se agregó agua en el tubo graduado hasta que su altura llegó a

la del nivel del pasaje al balón. Se calentó lentamente a ebullición el contenido del balón durante 8 horas. Se dejó transcurrir 3 horas, se realizó la lectura de 1,2 ml de esencia destilada, correspondiente por tanto a un rendimiento de 1,2% (v/p) ml de esencia/100 gramos de hojas.

### **3.3.3 Preparación de la infusión de hojas de *S. lentiscifolius* (SchW):**

Se pesaron 20 g de hojas desecadas y se agregaron 100ml de agua destilada hirviendo, se dejó reposar por 15 minutos luego de los cuales se procedió a colar y filtrar. Posteriormente se rotuló como infusión al 20% p/v (SchW).

### **3.3.4 Preparación del extracto de diclorometano (SchDCM):**

Se pesaron 2 g de droga vegetal pulverizada, se transfirieron a un tubo de ensayo, se agregaron 10 ml de diclorometano y se dejó en maceración por media hora, calentando cuidadosamente en baño María (37°C). Posteriormente se filtró y se rotuló (SchDCM).

### **3.3.5 Preparación del extracto acuoso (decocción) (SchH2O):**

Se efectuó una decocción pesando 2 g de droga vegetal pulverizada, los cuales se transfirieron a un Erlenmeyer con 20 ml de agua destilada, se mantuvo en ebullición por 15 minutos, se enfrió, filtro y se repuso el volumen de 20 ml con agua destilada. Posteriormente se rotuló (SchH2O).

### **3.3.6 Preparación del extracto de acetato de etilo (SchAcEt):**

Se tomaron 6ml del extracto acuoso (SchH2O) los cuales fueron extraídos tres veces con 1ml de acetato de etilo cada vez, se reunieron los extractivos, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se filtró y rotuló (SchAcEt).

### **3.4 ANÁLISIS FITOQUÍMICO: REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN:**

Para caracterizar flavonoides y terpenos se llevaron a cabo las siguientes reacciones (Domínguez, 1973):

#### **3.4.1 Reacción con cloruro férrico (para ácidos hidroxámicos y fenoles):**

Se colocaron 0.5 ml del extracto hidroalcohólico (*SchT*) en un tubo de ensayo se agregaron dos gotas de solución de tricloruro férrico al 1%.

#### **3.4.2 Detección de Flavonoides**

##### **3.4.2.1 Reacción de Shinoda:**

Se colocó 1ml del extracto hidroalcohólico (*SchT*) en un tubo de ensayo, se agregaron granallas de  $Mg^{+2}$  y 0.5 ml de HCl, al enfriar se agregaron 0.5 ml de alcohol amílico y 2 ml de agua destilada, se agitó se dejó en reposo.

##### **3.4.2.2 Reacciones en papel:**

Sobre un papel de filtro se marcaron cinco círculos de 0.5 cm de diámetro aproximadamente, con ayuda de un capilar, se sembraron gotas del extracto hidroalcohólico en cada uno de ellos, se secó y se agregó sobre cada círculo gotas de los siguientes reactivos:

- Solución de hidróxido de sodio al 10% (NaOH)
- Solución de cloruro férrico al 1% ( $FeCl_3$ )
- Solución etanólica de cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ )
- Solución de ácido bórico ( $H_3BO_3$ )

Se secó y se observó a UV a 365nm.



### **3.4.2.3 Reacción de Rosenheim:**

Se tomaron 0.5 ml del extracto hidroalcohólico y se agregaron 0.2 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl<sub>c</sub>), se llevó al baño por 10 minutos, se dejó enfriar, se agregaron 0.2 ml de alcohol amílico y 2 ml de agua destilada, se agitó y se dejó reposar.

### **3.4.3 Detección de Triterpenos/esteroides**

#### **3.4.3.1 Reacción de Liebermann Bouchard:**

Se tomaron 2 ml de los extractos de diclorometano (*SchDCM*) y acetato de etilo (*SchAcEt*). Se evaporaron a sequedad en vidrio de reloj y se retomaron con cloroformo anhidro, se agregaron 1.8 ml de anhidro acético y 0.2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

### **3.4.4 Estudio cromatográfico en capa delgada (CCD)**

Se realizó el estudio cromatográfico a los extractos, en distintas fases móviles que se seleccionaron de acuerdo a los grupos fitoquímicos analizados: flavonoides, terpenos y saponinas.

#### **3.4.4.1 Fase estacionaria:**

Cromatofolios de sílica gel 60 F 254 Merk 0,25mm de espesor.

#### **3.4.4.2 Fases móviles:**

**Fase móvil 1:** Acetato de etilo-metanol-agua (100:13.5:10) para el análisis de flavonoides.

**Fase móvil 2:** Acetato de etilo-ácido fórmico- ácido acético glacial-agua (100:11:11:26) para el análisis de flavonoides.

**Fase móvil 3:** Diclorometano-Metanol (95:5) para el análisis de terpenos.

**Fase móvil 4:** Tolueno-acetato de etilo (80: 20) para el análisis de terpenos.

### **3.4.4.3 Sustancias de Referencia**

Para la identificación de flavonoides se utilizaron: rutina (Reference Substance, Sigma-Aldrich®), quercetina (Reference Substance, Sigma-Aldrich®) e isoquercetina. Mientras que para identificar terpenoides y esteroides los compuestos empleados fueron ácido ursólico (Reference Substance, Sigma-Aldrich®) y  $\beta$ -sitosterol (Reference Substance, Sigma-Aldrich®).

### **3.4.4.4 Reactivos reveladores:**

Luego de la inspección preliminar en visible, luz UV-245 y Luz UV-365nm, cada cromatograma fue analizado para determinar la presencia de los respectivos grupos fitoquímicos por medio de la pulverización del reactivo apropiado, preparados según "Plant Drug Analysis" (Wagner & Bladt, 1996).

#### **3.4.4.4.1 Reactivo de productos naturales:**

Se disolvió 1 g del éster de ácido 2-amino etil difenil bórico (AEDBE) en 100 ml de metanol y se atomizó sobre la placa. Este reactivo se utilizó para la detección de flavonoides.

#### **3.4.4.4.2 Reactivo Vainillin-sulfúrico:**

Se preparó la solución de vainillina etanólica 1 % y la solución de ácido sulfúrico etanólico 10 %. Se atomizó la placa con la primera solución y luego de secar se prosiguió con la segunda, se llevó a la estufa, donde se calentó a 110°C durante 10 minutos.

### **3.4.5 Identificación de compuestos por Cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-UV)**

Los análisis por cromatografía líquida de alta resolución se realizaron en un cromatógrafo líquido Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA), equipado con una bomba terciaria de gradiente dual (DGP-3000) y un detector con arreglo de diodos DAD-3000. Se utilizó un inyector manual Rheodyne, modelo 7725i, con loop fijo de 20  $\mu$ l (Rheodyne, CA, EEUU). La separación se realizó utilizando una columna C18 (250 x 4,6 mm, Lichrospher 5  $\mu$ m, Merck). Se utilizó como fase móvil tetrahidrofurano: metanol: agua (15:5:85 v/v) a la cual se le ajustó el pH a 2.5 con ácido fosfórico, a flujo 1 ml/min. Los datos fueron obtenidos a 330 nm.

Fueron utilizados para realizar el análisis, el extracto hidroalcohólico (*SchT*), obtenido como se describió en 4.3.1, el cual se diluyó 1:5 con la fase móvil anteriormente descrita. Se preparó un estándar triple con los compuestos de referencia rutina, isoquercetina y quercetina.

## **3.5 SCREENING FARMACOLÓGICOS EN PREPARADOS BIOLÓGICOS**

### **3.5.1 Animales utilizados**

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 200-250 g, ratones Swiss de 20-26 g y cobayos de 250- 300 g de peso mantenidos en el bioterio de la cátedra de Farmacología bajo condiciones controladas de 12 hs de luz-12 hs de oscuridad.

El manejo de animales de experimentación se realizó bajo los principios y normas internacionales (publicación del NIH #85-23 revisado en 1985), en cada caso la eutanasia fue realizada según protocolo Nro D01-15-16 aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

### **3.5.2 Preparados biológicos de órganos aislados**

Los experimentos siguieron la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) publicada por el United States National Institute of Health (NIH, 1996).

#### **3.5.2.1 Intestino aislado de rata y cobayo**

Ratas Sprague Dawley de 200-250 g fueron mantenidas en condiciones de ayuno de alimento y agua *ad libitum* durante 24 horas previo al experimento. Los animales fueron anestesiados con sobredosis de tiopental (40 mg/kg vía intraperitoneal, I.P.) previa analgesia con tramadol (10-20 mg/kg S.C). De forma similar fueron las condiciones de mantenimiento y anestesia de los cobayos de 250-300 g. Una vez realizado el sacrificio de los animales se aislaron los duodenos e íleons. Se cortaron trozos de 2 a 3 cm de longitud y se mantuvieron en

solución Tyrode (ver composición sección 3.5.4.1) termostatzada y aireada. Estos preparados biológicos se montaron encubas de doble camisa termostatzadas a 37°C, conteniendo 20 ml de solución Tyrode y bajo burbujeo constante de aire (pH 8.2) (Livingstone & Livingstone, 1970; Ragone *et al.*, 2007; Consolini *et al.*, 2011; Blanco *et al.*, 2013). Fueron sujetados de ambos extremos longitudinalmente manteniendo el tubo intestinal abierto para facilitar la circulación de solución y la oxigenación en su interior (**Fig. 7**).



**Figura 7:** Foto de una cuba termostatzada de doble camisa en cuyo interior se encuentra montado un duodeno aislado de rata el que se encuentra sujeto a un transductor de fuerza. El preparado se encuentra sumergido en solución Tyrode y aireado

### **3.5.2.2 Vejiga aislada de rata**

De igual manera se aislaron las vejigas de las ratas sacrificadas. Se cortaron tiras en el eje longitudinal de 2 mm de ancho y 5mm de longitud aproximadamente, cada una de las cuales se montó en una cuba de doble camisa termostatzada a 37°C, conteniendo 20 ml de solución Tyrode modificada (ver composición en sección 4.5.4.1 .Soluciones y drogas empleadas) y burbujeo constante con aire (Hamada *et al.*, 1997).

### **3.5.2.3 Útero aislado de rata**

Además se aislaron los úteros de las ratas sacrificadas como se describió anteriormente (sección 3.5.2.2) Cada útero fue dividido en dos ramas las que fueron montadas

longitudinalmente en cubas de doble camisa termostatizadas a 32°C conteniendo 20 ml de solución de Jalon (ver composición en sección 4.5.4.1) y burbujeadas constantemente con aire (Kitchen, 1984).

### **3.5.3 Ratones utilizados para la realización de test para evaluar comportamiento.**

Se utilizaron ratones Swiss albinos (20-30 g) mantenidos bajo condiciones controladas de 12hs luz- 12hs oscuridad, con 24 horas de ayuno y agua *ad libitum* (Ragone *et al.*, 2010). Los ratones fueron inyectados intraperitonealmente y mantenidos en casilleros individuales durante el desarrollo del protocolo en condiciones ambientales de luz y sonido.

### **3.5.4 Soluciones y drogas empleadas**

#### **3.5.4.1 Solución empleada para las medidas de contractilidad de duodeno, ileon y vejiga**

Solución Tyrode (concentraciones en mM): 8.0 NaCl, 2.0 KCl, 2,6 MgCl<sub>2</sub>, 1.0 NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 1.0 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub> para intestino y 2.5 CaCl<sub>2</sub> para vejiga (Hamada *et al.*, 1997). El burbujeo se efectuó con aire lo cual determina un pH de 8.2 que es considerado el óptimo para el intestino aislado (Livingstone & Livingstone, 1970; Hamada *et al.*, 1997).

Tyrode sin Calcio (0-Ca<sup>2+</sup>): misma composición que el Tyrode sin agregado de CaCl<sub>2</sub>.

Tyrode 0-Ca<sup>2+</sup> 40mM K<sup>+</sup>: con agregado de 0.6 ml de solución de KCl 10% en cada cuba de 20 ml de Tyrode 0-Ca<sup>2+</sup>.

Tyrode modificada para vejiga (composición, en mM): 150 NaCl, 2.7 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 12 NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 5.5 D-glucosa, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, pH 8.2. (Hamada *et al.*, 1997).

Curvas concentración respuesta de carbacol (Cbl) (Sigma®): Se preparó una solución madre de 2000 µg/ml y a partir de la misma se realizaron diluciones de forma de obtener las siguientes concentraciones de carbacol 1, 2, 7, 20, 70, 200, 700 y 1000 µg/ml para la realización de las curvas concentración respuesta. Para ello, un volumen de 0,2 ml de cada una de estas soluciones de carbacol fueron agregadas de forma sucesiva y acumulativa en forma creciente en 20 ml de Tyrode (dilución 1/100 en cuba).

Curvas concentración respuesta de calcio: Se preparó una solución madre de 500 µg/ml de Cl<sub>2</sub>Ca (Anedra®) y a partir de la misma se realizaron diluciones de forma de obtener las siguientes concentraciones de calcio 0.882, 1.75, 5.3, 18.5, 56, 186 µg/ml en solución para la realización de las curvas concentración respuesta. Para ello, un volumen de 0,2 ml de cada una de estas soluciones de calcio fueron agregadas de forma sucesiva y acumulativa en forma creciente en 20 ml de Tyrode sin Ca<sup>2+</sup> previo agregado de 0.6 ml de ClK al 10% (dilución 1/100 en cuba).

Curvas concentración respuesta de histamina: Se preparó una solución madre de 2000 µg/ml de Histamina (Sigma®) y a partir de la misma se realizaron diluciones de forma de obtener las siguientes concentraciones de histamina 1, 2, 7, 20, 70 y 200 µg/ml para la realización de las curvas concentración respuesta. Para ello, un volumen de 0.2 ml de cada una de estas soluciones de histamina fueron agregadas de forma sucesiva y acumulativa en forma creciente en 20 ml de Tyrode (dilución 1/100 en cuba).

### **3.5.4.2 Soluciones utilizadas para la medida de contractilidad en útero aislado de rata**

Solución de Jalon (concentraciones en mM): 9.0 NaCl, 0.5 NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 0.4 KCl, 0.1 CaCl<sub>2</sub>. La solución fue burbujeada con aire y mantenida a 32 °C.

Curvas concentración respuesta de carbacol (Cbl) (Sigma®): Se preparó una solución madre de 2000 µg/ml y a partir de la misma se realizaron diluciones de forma de obtener las siguientes concentraciones de Cbl 1, 2, 7, 20, 70, 200, 700 y 1000 µg/ml para la realización de las curvas concentración respuesta. Para ello, un volumen de 0.2 ml de cada una de estas soluciones de carbacol fueron agregadas de forma sucesiva y acumulativa en forma creciente en 20 ml de Jalon (dilución 1/100 en cuba).

Curvas concentración respuesta de calcio: Se preparó una solución madre de 500 µg/ml de Cl<sub>2</sub>Ca (Anedra®) y a partir de la misma se realizaron diluciones de forma de obtener las siguientes concentraciones de calcio 0.882, 1.75, 5.3, 18.5, 56, 186 µg/ml en solución para la realización de las curvas concentración respuesta. Para ello, un volumen de 0.2 ml de cada una de estas soluciones de calcio fueron agregadas de forma sucesiva y acumulativa en forma creciente en 20 ml de Jalon sin Ca<sup>2+</sup> con previo agregado de 0.6 ml de ClK 10% (dilución 1/100 en cuba).

Curvas de concentración respuesta de oxitocina (Drawer ®): Se preparó una madre de de 2000 µg/ml a partir de la misma se realizaron diluciones de forma de obtener las siguientes concentraciones de oxitocina: 1, 2, 7, 20, 70 y 200 µg/ml para la realización de las curvas concentración respuesta. Para ello, un volumen de 0.2 ml de cada una de estas soluciones de oxitocina fueron agregadas de forma sucesiva y acumulativa en forma creciente en 20 ml de Jalon (dilución 1/100 en cuba).



### **3.5.4.3 Soluciones y drogas empleadas para la medida de test de comportamiento**

Solución fisiológica: solución estéril de cloruro de sodio al 0.9% (p/v)

Vehículo etanólico: solución acuosa de etanol al 70% sin el agregado de la parte aérea de *S. lentiscifolius*. La concentración de etanol 70% utilizada fue equivalente a la concentración presente en el extracto hidroalcohólico de *S. lentiscifolius*.

Vehículo oleoso: se utilizó dimetilsulfóxido en ausencia de aceite esencial de *S. lentiscifolius*.

Diazepam (Roche®, Argentina): a partir de ampollas de 10 mg / 2 ml, se inyectaron dosis de 0,3 y 5 mg/kg de acuerdo al test en el que se utilizó como testigo.

Clomipramina (Novartis®, Argentina): a partir de ampollas de 25 mg/ 2ml se inyectaron intraperitonealmente dosis de 1.25 mg /kg.

### **3.5.5 Estudio de actividad antiespasmódica en órgano aislado**

#### **3.5.5.1 Estudio de la actividad antiespasmódica en intestino delgado aislado de rata y cobayo:**

La actividad antiespasmódica se evaluó en estudios “ex vivo” mediante la realización de curvas concentración-respuesta (CCR) acumulativas con carbacol (Cbl) como agonista muscarínico. Las porciones de duodeno e íleon aislados de rata montados en las cubas de doble camisa y sumergidos en solución Tyrode a 37°C burbujeadas con aire; fueron expuestas a concentraciones crecientes de carbacol en ausencia y presencia de diversas concentraciones de la tintura de *S. lentiscifolius* (*SchT*).

A partir de los resultados obtenidos en las CCR de carbacol y con el fin de evaluar posibles mecanismos de acción de *SchT*, se efectuó un protocolo de CCR de calcio en medio despolarizante de alta  $[K^+]$  (40 mM). Los agregados de las distintas concentraciones de calcio a la cuba en forma acumulativa y creciente fueron realizados en ausencia y presencia de las mismas concentraciones de *SchT* 0.3, 1, 3, 10 y 20 mg de residuo/ml de tintura empleadas en las CCR de Cbl.

Con el fin de evaluar el posible mecanismo de acción de la tintura sobre los receptores de histamina, se efectuó un protocolo de CCR de histamina en ileon de cobayo. Los agregados de las distintas concentraciones de histamina a la cuba en forma acumulativa y creciente fueron realizados en ausencia y presencia de las mismas concentraciones de extracto hidroalcohólico 0.3, 1, 3, 10 y 20 mg de residuo/ ml empleadas en las CCR realizadas en el intestino aislado de rata para las CCR de Cbl y de calcio. La elección del íleon de cobayo para la realización de las CCR de histamina se fundamenta en el hecho de que esta especie es más sensible a la respuesta frente a histamina y la cantidad de receptores para histamina en los órganos del cobayo son notablemente mayores que en la rata (Livingstone & Livingstone, 1971; Hill & Young, 1980).

Los duodenos e ileons aislado de rata e ileon de cobayo fueron sujetados con hilos en ambos extremos y sumergidos en solución Tyrode dentro de una cuba de doble camisa. Mientras que uno de los extremos se mantuvo fijo a la cuba el otro fue conectado a un transductor de fuerza isométrico (WPI Instruments, USA) acoplado a un amplificador de 4 canales (TBM4M, Instruments, USA) para la adquisición de la fuerza de contracción desarrollada por el músculo en computadora mediante tarjeta A/D Eagle (USA).

### **3.5.5.2 Estudio de la actividad antiespasmódica en vejiga aislada de rata**

Un protocolo análogo al utilizado en intestino se efectuó en los preparados aislados de vejiga contenidos en una solución Tyrode modificada (Hamada *et al.*, 1997). Se realizaron CCR de carbacol en ausencia y presencia de concentraciones únicas y crecientes de *SchT*. También se evaluaron en vejiga los efectos de la misma en CCR de  $Ca^{2+}$  en medio despolarizante de alta  $[K^+]$  (40 mM), con un procedimiento análogo al utilizado para intestino delgado.

### **3.5.5.3 Estudio de la actividad antiespasmódica en útero aislado de rata**

La actividad antiespasmódica en útero aislado de rata se evaluó en primera medida mediante la realización de CCR acumulativas de Cbl en ausencia y presencia del vehículo etanólico como control negativo y de únicas y crecientes concentraciones de *S. lentiscifolius*, (0.3 a 20 mg/ml). Se realizaron dos CCR control (sin pretratamiento), controles con vehículo etanólico, y las sucesivas CCR de CbL con el previo agregado (5 a 10 min antes) de concentraciones crecientes de *SchT*. Dado que el útero posee una actividad espontánea de espigas de gran amplitud, los efectos del agonista se midieron como valores máximos de dichas espigas. Al finalizar cada CCR se efectuaron 3 lavados consecutivos con solución de Jalon y se esperó 10 minutos de estabilización. También se evaluaron en útero los efectos de *SchT* en CCR de  $Ca^{2+}$  en medio despolarizante de alta  $[K^+]$  (40 mM), con un procedimiento análogo al utilizado para intestino delgado.

Además, se evaluaron CCR acumulativas del agonista oxitocina, en ausencia y presencia del vehículo etanólico, como control negativo y de únicas y crecientes concentraciones de *SchT* (0.3 a 20 mg/ml). Se realizaron dos CCR control (sin pretratamiento), un control-vehículo con el previo agregado de 0.2 ml del vehículo

etanólico y las sucesivas CCR de oxitocina con el previo agregado (5 a 10 min antes) de una concentración única de *SchT* (en orden creciente de concentración).

Se sumergieron en la solución, sujetos mediante hilo de cirugía del extremo inferior a un soporte fijo y en el extremo superior a un transductor de fuerza isométrico MLT0210/A (Power Lab, AD Instruments) conectado al amplificador y registrador digital LabChart (AD Instruments, USA).

### **3.5.6 Medidas de actividad central**

#### **3.5.6.1 Mediciones de la movilidad espontánea en ratones:**

##### **3.5.6.1.1 Test de campo abierto en ratones**

Se evaluó la locomoción espontánea, la actividad exploratoria y emocionalidad como número de acicalamientos de ratones mediante el test de campo abierto, el cuál consistente en una caja blanca de 30 x 50 cm con paredes de 27 cm de altura dividida en 15 cuadrados de 10 cm<sup>2</sup> por líneas negras (**Fig. 8**). La locomoción espontánea se estimó a partir del número de líneas cruzadas por ambas patas delanteras del animal, mientras que la actividad exploratoria se estimó mediante el número de veces que el ratón mantuvo su cuerpo erguido apoyado en sus patas traseras. Se mantuvieron condiciones ambientales adecuadas para la realización del test.



**Figura 8:** Campo abierto usado en la medición de la movilidad espontánea en ratones.

Se evaluaron separadamente los efectos del extracto hidroalcohólico (*SchT*), de la infusión (*SchW*) y del aceite esencial (*SchA*).

Para evaluar los efectos de *SchT* los ratones fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos. Se realizaron los siguientes tratamientos: solución fisiológica (control negativo), diazepam 5 mg /kg (Roche, Argentina) (control positivo), vehículo etanólico (ver sección 3.5.4.3 de Materiales y métodos), *SchT* 12 y 40 mg de residuo /kg de ratón respectivamente.

La medida de la actividad de *SchA* se realizó con 4 grupos de ratones de acuerdo al siguiente tratamiento: vehículo oleoso (control negativo), diazepam 5 mg /kg (Roche, Argentina) (control positivo), *SchA* 10 y 30  $\mu$ g de hoja /kg de ratón. Para el estudio de los efectos del *SchW* se dividieron los ratones en 4 grupos: solución fisiológica (control negativo), diazepam 5 mg /kg (Roche, Argentina) (control positivo), *SchW* en dosis de 200 y 400 mg de hoja /kg de ratón.

Todos los fármacos se administraron por inyección intraperitoneal. Antes de la inyección cada animal se colocó en la misma esquina del campo abierto permitiendo la libre exploración durante 5min. De esta manera se comprobó que todos los animales utilizados tenían el mismo comportamiento conductual.

Luego de 30 min desde la administración, cada animal se colocó en la misma esquina del campo abierto, y durante 5 min se registró el número de líneas cruzadas en 5 minutos. Simultáneamente se registró el número de enderezamientos. (Choleris *et al.*, 2001; Ragone *et al.*, 2010) El mismo protocolo se repitió a los 60, 90 y 120 minutos después de la administración. Se realizaron 6 a 13 determinaciones en cada grupo.

#### **Tratamiento estadístico de los resultados:**

Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 6.1. Se utilizó el método estadístico ANOVA de dos vías seguido por el test de Bonferroni o Tukey. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

#### **3.5.6.2 Evaluación de la actividad ansiolítica de los extractos de *S. lentiscifolius***

##### **3.5.6.2.1 Método de supresión de alimento:**

El test de supresión se basa en el conflicto de los roedores entre el impulso de comer y el miedo a lo novedoso y a los espacios abiertos. La latencia para comenzar a comer refleja la situación de conflicto a la que se enfrenta el animal; la capacidad para resolver estos dilemas esta inversamente relacionada con la ansiedad y el estrés (Oliveira, *et.al*, 2013). El dispositivo para realizar el test consiste en un campo abierto de 40 \* 40 \* 30 cm

(Fig. 9), en el centro se colocó un papel filtro circular de color blanco (diámetro=8cm) con un trozo de comida de ratón (Mineur *et al.*, 2007).

Para esta prueba los ratones permanecieron en ayuno por 24 horas, luego de las cuales se administró a cada uno las sustancias a evaluar y fueron dispuestos en jaulas individuales.



**Figura 9:** Foto del sistema empleado para la realización del test de supresión de alimento.

Se evaluaron separadamente los efectos del extracto hidroalcohólico (*SchT*), de la infusión (*SchW*) y del aceite esencial (*SchA*).

Para evaluar los efectos de *SchT* los ratones fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos. Se realizaron los siguientes tratamientos: solución fisiológica (control negativo), diazepam 0.3 mg//kg) (Roche, Argentina) (control positivo), vehículo etanólico (ver sección 3.5.4.3 de Materiales y métodos), *SchT* 12 y 40 mg de residuo/kg de ratón respectivamente.

La medida de la actividad de *SchA* se realizó con 4 grupos de ratones de acuerdo al siguiente tratamiento: vehículo oleoso (control negativo), diazepam 0.3 mg/kg (Roche, Argentina) (control positivo), *SchA* 10 y 30 µg de hoja/kg de ratón. Para el estudio de los efectos del *Sch*, se dividieron aleatoriamente los ratones en 4 grupos: solución fisiológica (control negativo), diazepam 0.3 mg /kg (Roche, Argentina) (control positivo), *SchW* en dosis de 200 y 400 mg de hoja /kg de ratón.

Todos los fármacos se administraron por inyección intraperitoneal. Luego de 1 hora desde la administración, cada animal se colocó en la misma esquina de la caja, y se registró el tiempo hasta el primer momento de alimentación, inmediatamente después de empezar a comer, cada ratón fue removido y colocado en su jaula original junto con un trozo de comida previamente pesado, transcurridos 5 minutos se determina la cantidad de alimento consumido y los ratones se trasladan a su casa-jaula. (Mineur *et al.*, 2007).

#### **Tratamiento estadístico de los resultados:**

Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 6.1. Se utilizó el método estadístico ANOVA de una vía seguido por el test a posteriori Tukey o Sidak. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .



### 3.5.6.3 Evaluación de la actividad antidepresiva de los extractos

#### 3.5.6.3.1 Test de suspensión de cola

Esta prueba se realizó según bibliografía (Steru *et al.*, 1985) que se basa en la observación de los periodos de agitación e inmovilidad que presenta un ratón suspendido por la cola. Para esto se utilizó una estructura de 50 cm de alto, 12 cm de profundidad y 60 cm de ancho, dividida en 4 secciones de 15 cm cada una (**Fig. 10**). Los ratones se suspendieron 50 cm sobre el piso con cinta adhesiva colocada a 2 cm de la base de su cola. Se registró el tiempo de inmovilidad en un periodo de 6 minutos.



**Figura 10:** Foto del sistema empleado para la realización del test de suspensión de cola en ratones.

Se evaluaron los efectos del extracto hidroalcohólico (*SchT*) en primera instancia y luego se realizó el mismo test con dos concentraciones diferentes de *SchW* y de *SchA*.

Para evaluar *SchT* se dividieron los ratones en 4 grupos de forma aleatoria y se realizaron los siguientes tratamientos: 1.25 mg /kg clomipramina (Novartis, Argentina) (control positivo), vehículo etanólico (ver sección 3.5.4.3 en materiales y métodos), *SchT* 12 y 40 mg de residuo/kg de ratón.

Para la evaluación de los efectos antidepresivos de *SchW* se utilizó solución fisiológica como control negativo y 1.25 mg /kg clomipramina (Novartis, Argentina) como control positivo. Se ensayaron dosis de infusión de 200 y 400 mg/kg. De manera similar, se evaluaron los efectos de *SchA* 10 y 30 µg de hoja/kg de ratón, usando 1.25 mg /kg clomipramina (Novartis, Argentina) como control positivo y vehículo oleoso como control negativo.

Todas las sustancias se administraron por inyección intraperitoneal 60 minutos antes de la prueba.

#### **Tratamiento estadístico de los resultados:**

Los datos obtenidos fueron analizados usando el programa Graph Pad Prisma versión 6.1. Se utilizó el método estadístico ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey o Sidak. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

# **4.RESULTADOS**

## 4.1 ESTUDIOS BOTÁNICOS

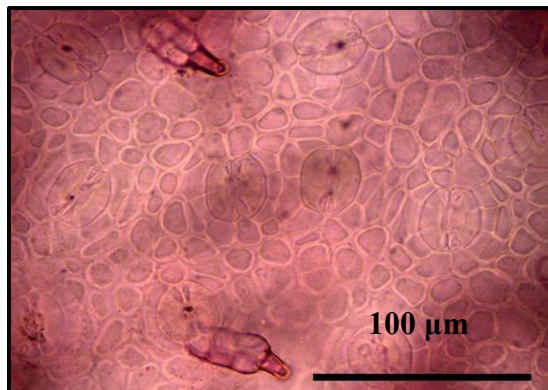
### 4.1.1 Morfología foliar

*S. lentiscifolius* se caracteriza por presentar hojas alternas, pecioladas, impari o paripinadas, de 8-12cm de largo, compuestas por 4-7 pares de foliolos, raramente más, opuestos o subopuestos, sésiles, enteros o con algún diente, lanceolados a ovales, de 1,5 a 2,5 cm de largo, con el raquis alado, de color verde grisáceo y de consistencia coriácea, generalmente glabros al tacto (**Fig. 5**).

### 4.1.2 Anatomía Foliar

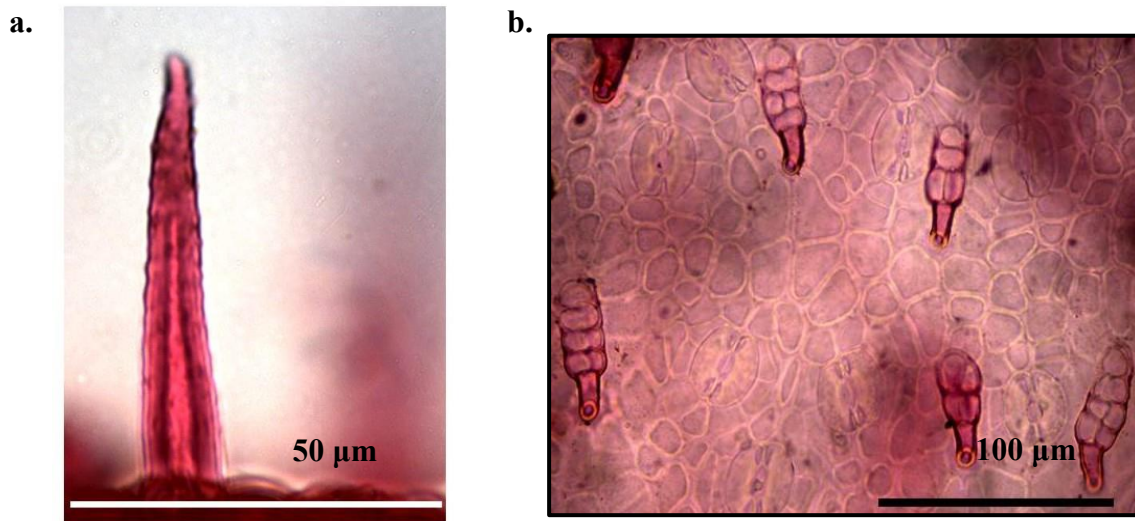
#### 4.1.2.1 Epidermis vista en superficie (VS)

Ambas epidermis presentan células de contornos poligonales con paredes rectas y gruesas. Los estomas hallados son de tipo ciclocítico, con escasa presencia de estomas anomocíticos, dispuestos al mismo nivel o levemente elevados con respecto a las restantes células epidérmicas; las células oclusivas, de forma arriñonada, presentan un conspicuo engrosamiento masivo polar (**Fig. 11**).



**Figura 11.** Aparato estomático, vista del engrosamiento masivo en las células oclusivas

En ambas caras del foliolo se presentan tricomas de dos tipos: eglandulares y glandulares: los eglandulares son simples, unicelulares, con paredes gruesas ornamentadas con ceras. Los glandulares están formados por un pie unicelular y una cabeza formada por un número variable de células (**Fig. 12**).



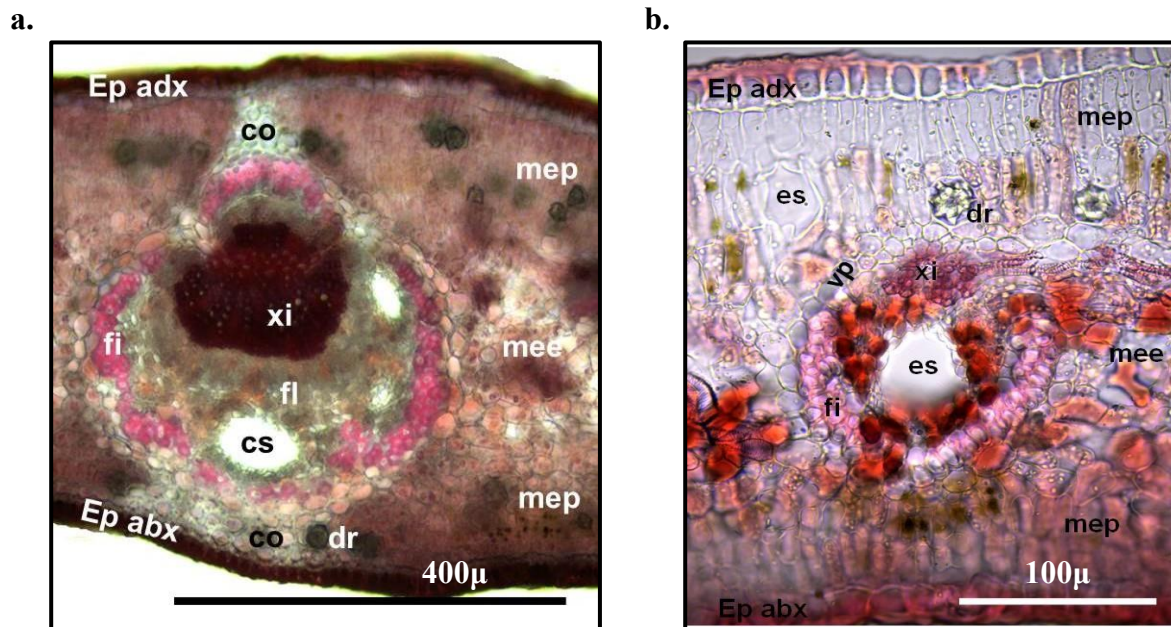
*Figura 12. (a)Tricoma eglandular (b) Tricomas glandulares.*

#### 4.1.2.2 Corte transversal del foliolo

Presenta estructura isobilateral, anfiestomático. Ambas epidermis son uniestratificadas formadas por células rectangulares alargadas; se observa una cutícula lisa y gruesa que cubre la pared periclinal externa y las anticlinales. El mesófilo presenta 2-3 capas de parénquima en empalizada hacia la cara adaxial, 6-8 capas de parénquima esponjoso y 1-2 capas de parénquima en empalizada hacia la cara abaxial (**Fig. 13**).

La vena media es ligeramente biconvexa, con 3-6 capas de colénquima hacia ambas epidermis y un haz colateral con floema hacia ambas caras en el cual se observan 2-3 conspicuos canales esquizolisígenos. Los haces vasculares secundarios son colaterales con vaina parenquimática y con un canal esquizolisígeno asociado al floema, al igual que en la

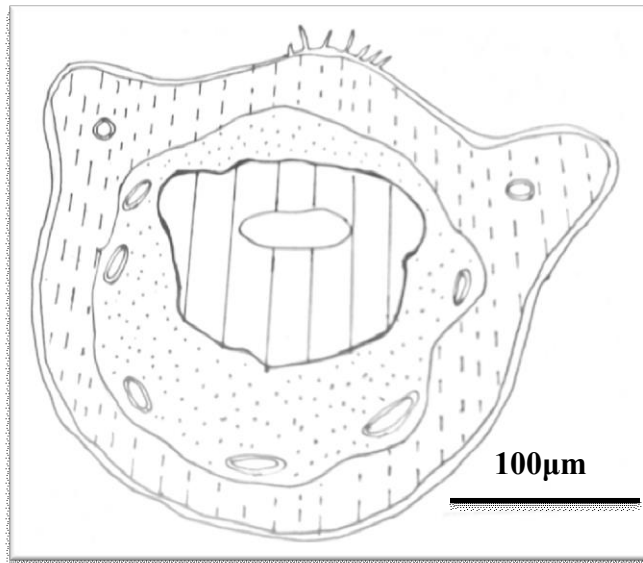
vena principal. En el mesófilo se observa la presencia de idioblastos cristalíferos de oxalato de calcio conteniendo drusas y cristales rómbicos y tánicos. Esto último fue confirmado por la reacción positiva de cloruro férrico, mientras que las pruebas histoquímicas para detección de almidón y lípidos dieron negativas.



**Figura 13:** Corte transversal de la hoja (a) Vena media (b) Mesófilo isolateral: células epidérmicas abaxiales y adaxiales, *Ep adx*: epidermis adaxial, *Ep abx*: epidermis abaxial *co*: colénquima, *mep*: parénquima en empalizada, *mee*: parénquima esponjoso, *xi*: xilema, *fl*: floema, *cs*: canales esquizolisígenos *dr*: drusas.

#### 4.1.2.3 Corte transversal del peciolo:

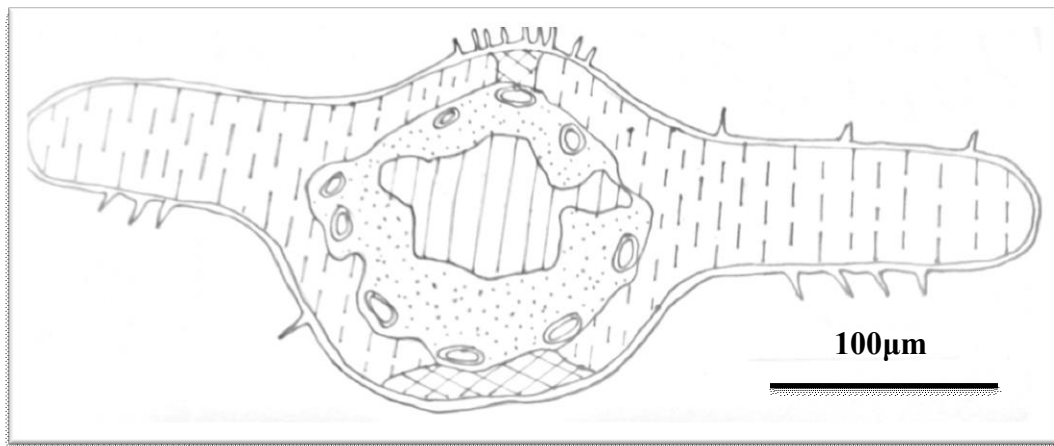
El transcorte del peciolo en su tercio medio muestra una sección biconvexa, con alas adaxiales, llevando en cada una de ellas un canal esquizolisígeno de escaso desarrollo. La epidermis uniestratificada muestra escasos pelos glandulares, por debajo se observa la presencia de parénquima clorofiliano con idioblastos cristalíferos conteniendo drusas. El sistema vascular está formado por 5-7 haces colaterales cerrados enfrentados, con médula central. Al igual que en la lámina, los conspicuos canales esquizolisígenos se hallan a nivel del floema (Fig. 14).



*Figura 14: Esquema de corte transversal de peciolo*

#### 4.1.2.4 Corte transversal del raquis:

El transcorte del raquis en el tercio medio de la hoja presenta una sección alada con disposición de tejidos similar a lo observado en la lámina (**Fig. 15**)



*Figura.15: Esquema de corte transversal de raquis*

## 4.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO:

Se llevó a cabo el análisis fitoquímico y cromatográfico de flavonoides y terpenos aplicando la técnica de cromatografía de capa delgada detallada por Wagner y Bladt (1996) en “Plant Drug Analysis”, así como reacciones generales para la detección de estos grupos fitoquímicos presentes en los extractos de la parte aérea como se detalla a continuación.

## 4.3 ÁCIDOS HIDROXÁMICOS Y FENOLES:

Al agregar dos gotas de solución acuosa de tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 1% al extracto acuoso e hidroalcohólico se observó una coloración negra (figura 16), indicativo de la presencia de polifenoles con tres oxidrilos (OH) adyacentes (Tolivia, 2014).



*Figura 16: Reacción del extracto acuoso *S. lentiscifolius* con tricloruro férrico al 1%*

### 4.3.1 Flavonoides:

La detección de flavonoides se realizó por medio de la reacción de Shinoda, las reacciones de caracterización en papel y la técnica de cromatografía de capa delgada. (Descritas en el apartado de materiales y métodos numeral 3.4.1.2 y 3.4.2.2 respectivamente)



### 4.3.2 Reacción de Shinoda:

El extracto hidroalcohólico (*SchT*) generó una coloración roja que se interpretó como respuesta positiva. En la reacción de Shinoda, el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, dando como productos al H<sub>2</sub>, el cual es capaz de reducir el flavonoide originando una coloración roja característica en fase amilica por formación de antocianidinas.

Si en estas condiciones se observa la aparición de coloración rojiza, violeta o naranja, se considera positivo para compuestos con el núcleo de  $\gamma$ - benzopirona (flavonas, flavonoles, flavononas, flavanoles) (Markham, 1982).

#### 4.3.2.1 Reacciones sobre papel:

Al poner en contacto el extracto hidroalcohólico (*SchT*) con los correspondientes reactivos se obtuvieron los resultados que se indican en la tabla 1

**Tabla 1** Reacciones sobre papel para (*SchT*)

<b>Extracto hidroalcohólico de <i>S.lenticifolius</i></b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Resultado</b>
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Coloración negra
<b>NaOH</b>	Coloración naranja
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Fluorescencia al UV
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	Coloración amarilla

La reacción con tricloruro de hierro (FeCl<sub>3</sub>) dio color negro indicativo de la presencia de polifenoles con tres oxidrilos (OH-) adyacentes (Cartaya & Reynaldo, 2001).

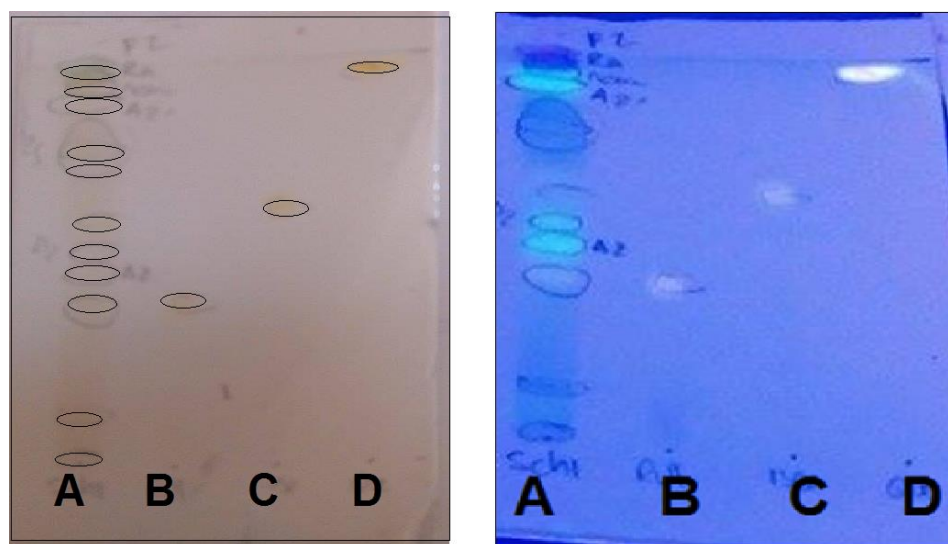
El color naranja producido por el extracto con hidróxido de Sodio (NaOH) es indicativo de la presencia de flavononas y flavonoles los cuáles forman estructuras resonantes de dicho color (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Al contacto con ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) se presentó coloración amarilla con fluorescencia verde lo cual confirma la presencia de flavonas y flavonoles, que en medio alcalino forman quelatos con dos hidroxilos fenólicos en posición relativa en orto, así como para flavonoides con un grupo carbonilo en 4 y un oxidrilo en posición 5.

El Cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) forma complejos o lacas de intensa fluorescencia a la luz de Wood, con hidroxilos en posición orto hidroxil-cetonas vecinos, los primeros son lábiles ante el agregado de HCl, mientras los últimos son estables, se produjo la formación de dichas lacas observando fluorescencia con los extractos. (Domínguez, 1973).

#### 4.3.2.1.1 Cromatografía en capa delgada (CCD) para flavonoides:

Se realizó CCD sobre cromatofolios de gel de sílice 60 F254 de Merck® del extracto hidroalcohólico (SchT), utilizando la fase móvil (Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua 100: 11: 11: 26) en presencia de soluciones de referencia de rutina, isoquercetina y quercetina. Se observó a luz UV 365 nm, después del revelado con RPN.



**Figura 17.** perfil cromatográfico del extracto SchT. a) Visible. b) Luz UV 354nm. A : Extracto SchT B: Rutina C: Isoquercetina D: Quercetina

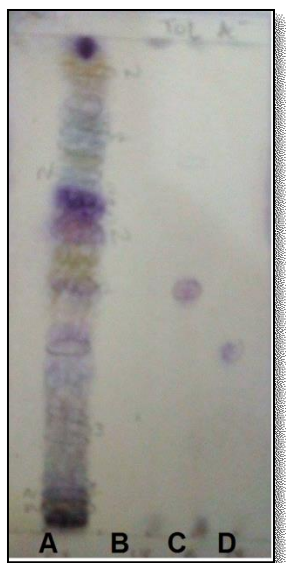
En este sistema (**Fig. 17**) se observó un perfil cromatográfico con bandas coincidentes en RF y color a los testigos de Rutina (0.43) e Isoquercetina (0.65). Además se aprecia la presencia de diversas bandas amarillas al visible con  $R_f \sim 0.07, 0.15, 0.72, 0.76$  y dos bandas fluorescentes al UV en  $\sim 0.5$  y  $0.55$ .

### 4.3.3 Terpenos:

En la reacción de Lieberman-Burchard con *SchDCM* se observó una coloración verde al minuto que se mantuvo después de los 30 minutos. Este complejo coloreado (verde-azul) se forma al reaccionar el anhídrido acético con el grupo hidroxilo en la posición C3 del anillo de los esteroides (Bruneton, 1995).

El extracto *SchDCM* (obtenido por extracción con solvente de polaridad creciente como se describió en el apartado de materiales y métodos) se sembró junto con las soluciones de referencia de  $\beta$ -sitosterol, ácido ursólico y oleanólico disueltos en DCM, utilizando como fase móvil (Tolueno: Acetato de etilo 80: 20). Se observó al visible después del revelado con AS (**Fig. 18**).

En esta fase móvil, el extracto *SchDCM* evidenció dos bandas marrones en un  $R_f \sim 0.12$  y  $0.20$  respectivamente, seguidas de dos bandas marrones en un  $R_f \sim 0.27$  y  $0.32$  justo por debajo de la banda azul violáceo del ácido oleanólico en un  $R_f \sim 0.34$ . Después se pudo observar una banda violeta en un  $R_f \sim 0.47$ , a la misma altura de la banda violeta del  $\beta$ -sitosterol. Se puede por lo tanto afirmar que esta sustancia se encuentra en el extracto *SchDCM*.

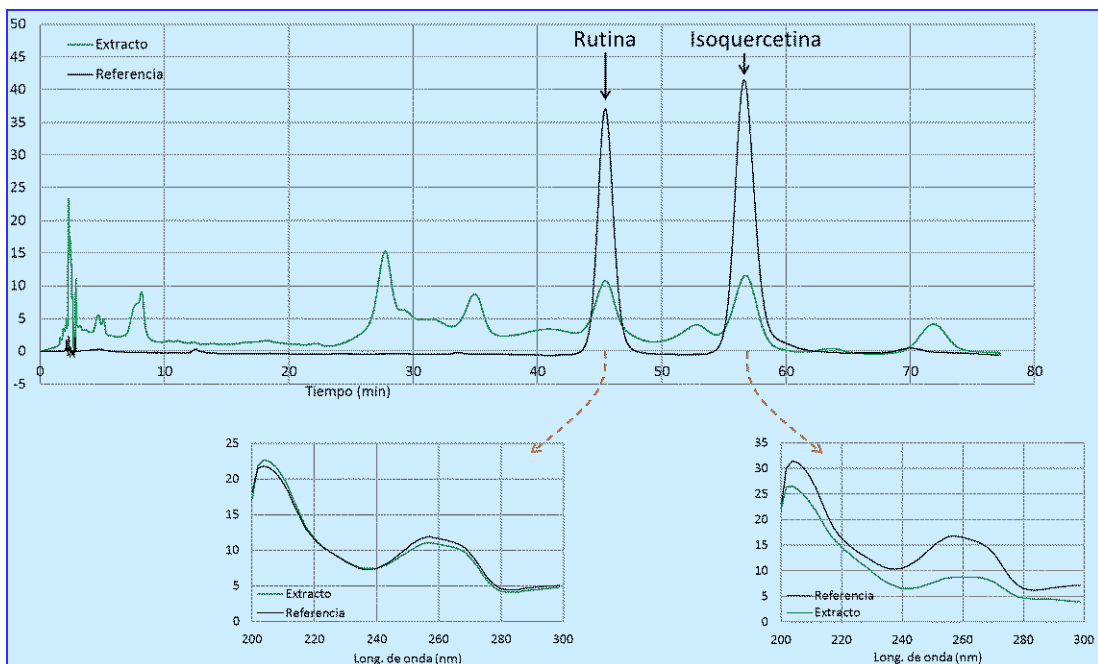


**Figura 18.** perfil cromatográfico del extracto SchDCM. A : SchDCM. B: Acido Ursólico C:  $\beta$ -sitosterol D: Acido Oleanolico F. Movil: tolueno: Ac. etilo (8:2)

#### 4.3.3.1 Cromatografía líquida de alta resolución con detección de absorción ultravioleta (HPLC-UV)

Se analizó el extracto SchT por HPLC en las condiciones descritas en el apartado de materiales y métodos, se obtuvo el perfil cromatográfico correspondiente a los mismos. Se evidenciaron dos picos en un tiempo de retención (Tr) de 45 y 55 minutos respectivamente, los cuales se correspondieron con las sustancias de referencia del estándar: rutina (Tr: 45) e isoquercetina (Tr: 55) (**Fig. 19**).

En el espectro de absorción UV correspondiente a los dos de los picos observados en el cromatograma en HPLC, se evidenciaron dos bandas dentro del rango 200nm-280nm, valores que corresponden al rango de los flavonoides de referencia empleados: rutina e isoquercetina.



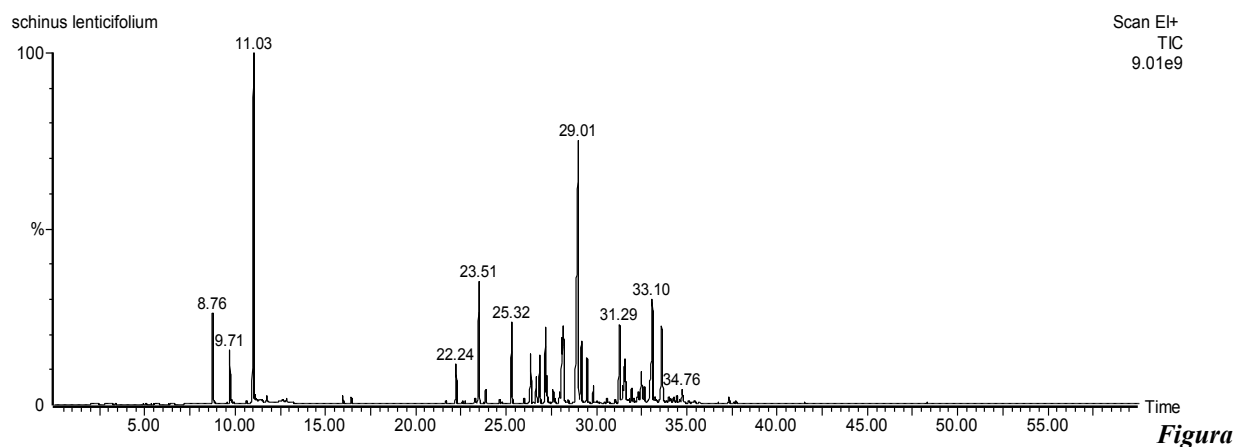
**Figura 19.** Analisis por HPLC-UV del extracto etanólico de *S.lentiscifolius* (SchT)

#### 4.3.3.2 Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de Masas y Detector de Ionización de Llama (GC-FID-MS)

Se analizó el aceite esencial por GC-FID-MS, en las condiciones descritas en el apartado de Materiales y Métodos. Se presentan a continuación la tabla de compuestos encontrados (**Tabla 2**) y el cromatograma (**Fig. 20**).

**Tabla 2** Composición porcentual relativa del aceite esencial de *S.lenticifolius*

Compuestos	%	Compuestos	%
cis-3-hexenol	tr	alfa humuleno	0,9
alfa pineno	2,4	allooromadendreno	2,5
Canfeno	tr	trans cadina-1(6),4-dieno	1,7
metil heptenona	tr	gamma muuroleno	0,2
Sabineno	1,4	10,11-oxi calameneno	
alfa terpineno	0,1	germacreno D	0,1
p-cimeno	tr	epi bicicosesquifelandreno	1,7
Limoneno	12,9	biciclogermacreno	1,4
1,8-cineol	0,1	alfa muuroleno	2,6
trans beta ocimeno	tr	cis calameneno	tr
gamma terpineno	0,1	delta cadineno	21,0
Terpinoleno	tr	zonareno	0,9
Linalol	tr	trans cadina-1,4-dieno	1,4
terpinen-4-ol	0,3	alfa calacoreno	0,2
alfa terpineol	0,3	beta calacoreno	0,3
Bicicloelemeno	0,1	espatulenol	4,1
alfa cubebeno	1,2	oxicariofileno	0,9
alfa longipineno	0,1	copaborneol	1,0
Ciclosativeno	0,2	1-epi cubenol	4,7
alfa copaeno	4,4	globulol	0,2
beta bourboneno	0,1	ledol	tr
beta cubebeno	0,4	tau muurolol	0,6
alfa gurjuneno	0,1	alfa cadinol	0,2
beta cariofileno	2,7	mustakona	0,4
gamma maalieno	tr	cetil alcohol	0,1
guaya-6,9-dieno	0,1	isocalamendiol	0,2
beta copaeno	0,1	trans phytol	0,1
Aromadendreno	0,2	hidrocarburo 25	0,1
cadina-3,5-dieno	1,7	<b>TOTAL</b>	<b>76,5</b>
tr: <0,05			



20. Análisis por GC-FID-MS) del aceite esencial de *S.lenticifolius*

## 4.4 ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS

### 4.4.1 Estudio de la actividad antiespasmódica sobre el músculo liso intestinal del extracto hidroalcohólico (*SchT*)

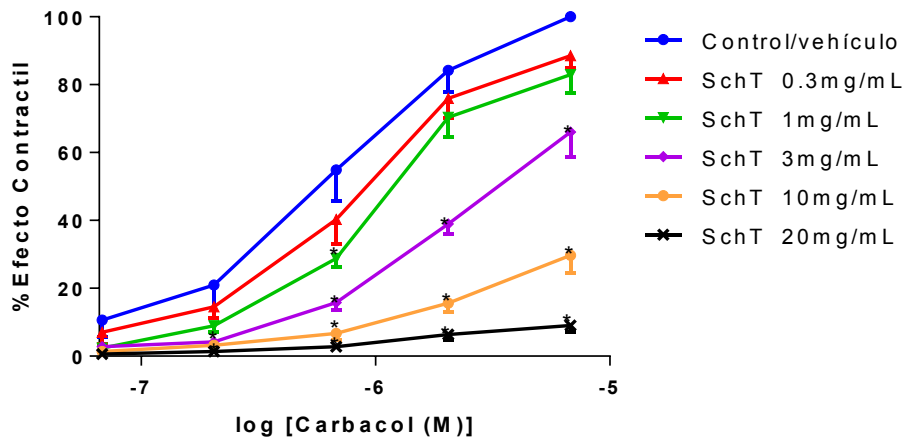
#### 4.4.1.1 Efectos de *SchT* sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Carbacol (Cbl)

Para evaluar el efecto de *SchT* sobre el músculo liso gastrointestinal, se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) de carbacol en duodeno e ileon aislado de rata. El extracto hidroalcohólico produjo una caída en el efecto máximo de la contracción producida por Cbl en las CCR. Por lo tanto, *SchT* produjo una inhibición en forma no-competitiva sobre las CCR de carbacol en intestino aislado de rata.

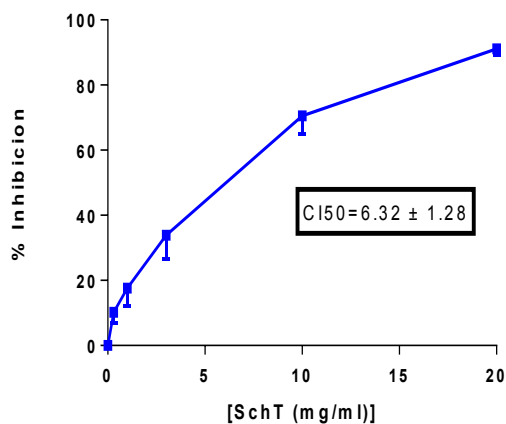
Este efecto fue dependiente de la concentración en un rango de 0.3 a 20 mg de residuo seco/ml de *SchT* ( $pCE_{50}$  (M) =  $6.17 \pm 0.16$ ; n=6) (**Fig. 21**). La concentración inhibitoria de la tintura de que inhibe a la mitad el efecto máximo producido en el intestino aislado (Concentración inhibitoria 50%=  $CI_{50}$ ) resultó de  $6.32 \pm 1.2$  mg de residuo seco /ml.

En todos los casos se realizó una CCR de Cbl en presencia de vehículo etanólico (n=7). No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de efecto máximo de contracción para las curvas en presencia o en ausencia del vehículo (no se muestran). Por lo que los % obtenidos en cada CCR fueron calculados usando el control (CCR de carbacol en ausencia del extracto).

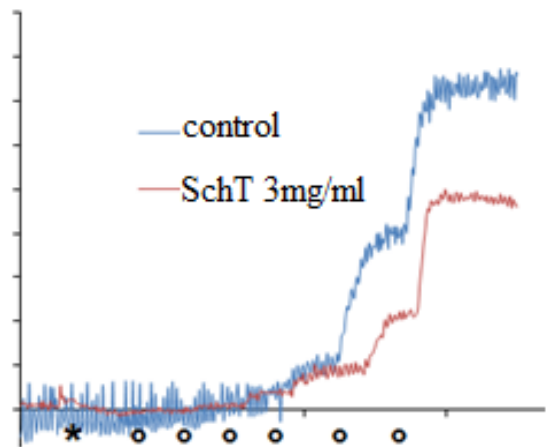
a.



b.



c.



**Figura 21:** (a) Curva concentración respuesta carbacol en ausencia y presencia de la tintura de *S lentiscifolius* ( $n=6$ ) ANOVA de dos vías: Por tratamiento:  $F=105.5$ ,  $DFn=5$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=209.2$ ,  $DFn=4$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=12.69$ ,  $DFn=20$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs control/vehículo (b) Cálculo de la concentración inhibitoria 50% (CI50) de la tintura de *S lentiscifolius*. (c) Registro original de CCR de carbacol en ausencia y en presencia de 3mg de residuo seco /ml de SchT.

Dado que el efecto de *SchT* no es debido a una acción directa sobre los receptores muscarínicos (por su acción antagonista no competitivo de carbacol) surge la hipótesis de que *SchT* podría ejercer su efecto antiespasmódico por actuar como inhibidor del influjo de



Ca<sup>2+</sup> en músculo liso gastrointestinal. Para probar esta hipótesis se realizaron CCR de Ca<sup>2+</sup> en medio despolarizante de alto K<sup>+</sup> en presencia de distintas concentraciones de *SchT*.

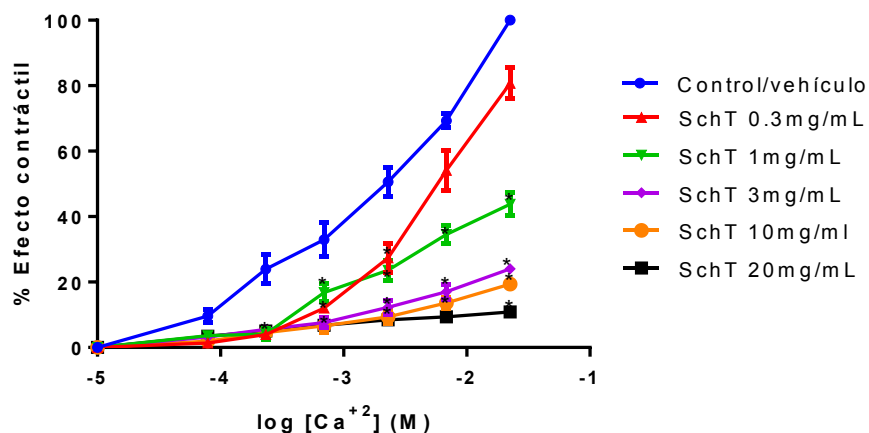
#### 4.4.1.2 Efectos de *SchT* sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Calcio (Ca<sup>+2</sup>)

Como se describió en el apartado anterior, para evaluar si los efectos de la tintura (*SchT*) son debidos a la inhibición de canales de Ca<sup>+2</sup> se ensayaron sus efecto sobre las CCR de Ca<sup>+2</sup> (pCE50= 2.64 ± 0.12 M).

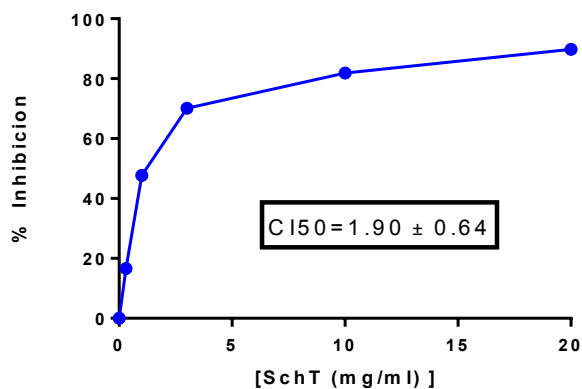
La Figura 22a muestra que *SchT* inhibió no-competitivamente las CCR de Ca<sup>2+</sup>, con una CI50 de 1.90 ± 0.64 mg de residuo seco/ml (n = 6), logrando la máxima inhibición a una concentración de 20 mg de residuo seco/ml. En la figura 20c se muestra un registro de la CCR-Ca<sup>2+</sup> en presencia de *SchT* 10 mg residuo seco/ml comparado con la CCR control (en ausencia de *SchT*).

De forma similar a lo realizado en las CCR de Cbl, en todos los casos se realizó una CCR de Ca<sup>+2</sup> en presencia de vehículo etanólico (n=6). No se encontró diferencias significativas en el porcentaje de efecto máximo de contracción obtenido para las curvas en presencia del vehículo comparado con las curvas en ausencia del mismo. Por lo que los % obtenidos en cada CDR fueron calculados usando el control (CCR de Calcio en ausencia del extracto).

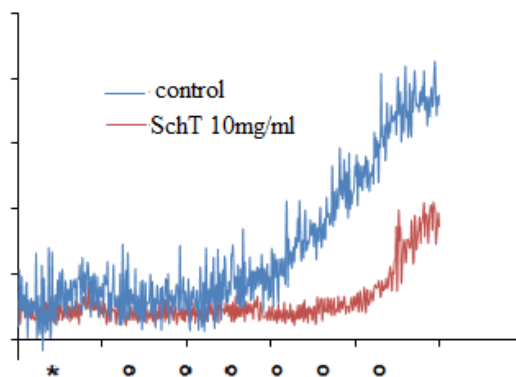
a.



b.



c.



**Figura 22:** (a) Efectos del extracto de *S. lentiscifolius* sobre la CCR de calcio en ausencia y presencia de SchT ( $n=6$ ) ANOVA de dos vías: Por tratamiento:  $F=354.4$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=486.1$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=39.22$ ,  $DFn=36$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs Control/vehículo (b) Cálculo de la concentración inhibitoria 50% ( $CI_{50}$ ) de la tintura de *S. lentiscifolius*. (c) Registro original de CCR de  $Ca^{+2}$  en ausencia y en presencia de 10 mg de residuo seco/ml de SchT.

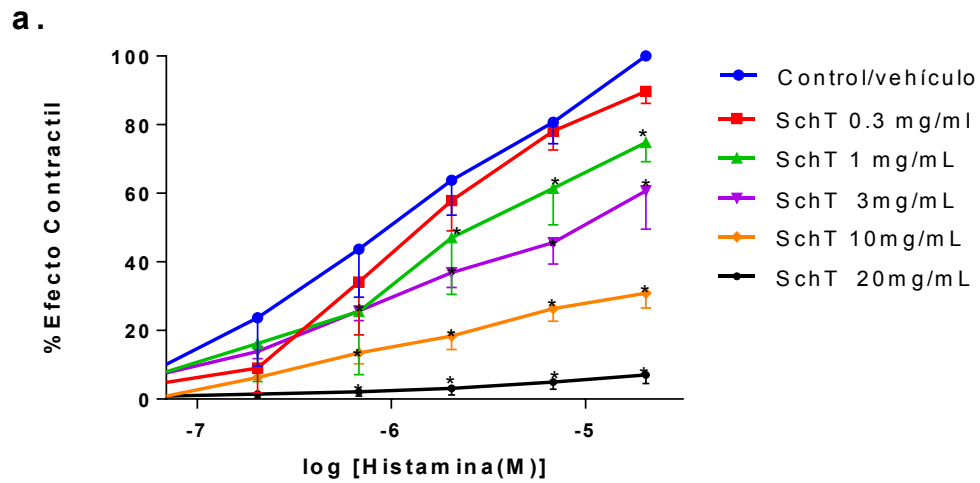
#### 4.4.1.3 Efectos de *SchT* sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Histamina (His) en ileon de cobayo.

Para evaluar los efectos de la tintura sobre los receptores de histamina se utilizó el ileon de cobayo, dado que dicha especie expresa mayor cantidad de receptores para histamina. (Livingstone, 1971; Hill & Young, 1980).

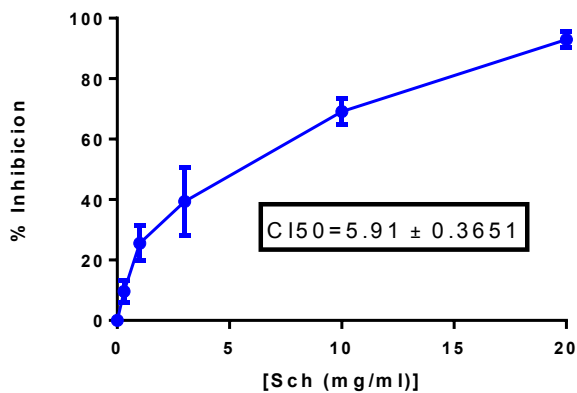
*SchT* disminuyó el efecto máximo de la contracción inducida por histamina en las curvas concentración respuesta (CCR) realizadas en el íleon aislado de cobayo, sugiriendo un efecto no competitivo de *SchT* sobre los receptores de histamina presentes en este tejido (mayoritariamente H<sub>1</sub>). Este efecto fue dependiente de la concentración en un rango de 0.3 a 20 mg de residuo seco/ml de *SchT* (pCE50 Histamina =  $5.79 \pm 0.18$  M, n=6) (**Fig 21 a**). La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de *SchT* resultó de  $5.91 \pm 0.36$  mg de residuo seco/ml de *SchT* (**Fig 23 b**).

En todos los casos se realizó una CCR de Histamina en presencia de vehículo etanólico (n=6). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de efecto máximo de contracción para las curvas en presencia del vehículo en comparación con las curvas en ausencia del mismo. Por lo que los % obtenidos en las CDR de histamina fueron calculados usando el control (CCR de Histamina en ausencia del extracto).

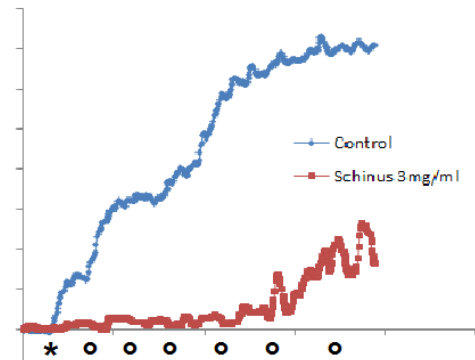
En la figura 23c se puede observar un registro original en ausencia y en presencia de una concentración de 3 mg de residuo seco/ml de *SchT*.



**b.**



**c.**



**Figura 23:** (a) Efectos del extracto de *S. lentiscifolius* sobre la CCR de Histamina en ausencia y presencia de SchT ( $n=6$ ) ANOVA de dos vías: Por tratamiento:  $F=211.0$ ,  $DFn=5$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=276.9$ ,  $DFn=5$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=17.17$ ,  $DFn=25$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs Control/vehículo. (b) Curva de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *S. lentiscifolius* (CI50:  $5.91 \pm 0.36$  mg/ml) frente a Histamina en el intestino aislado de cobayo. c) Registro original en ausencia y en presencia de 3mg/mL de SchT

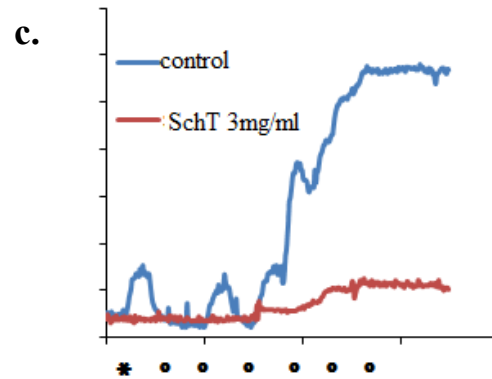
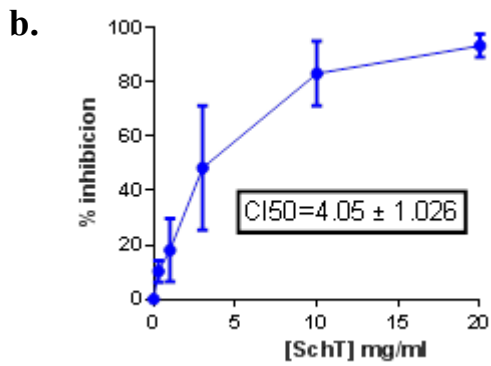
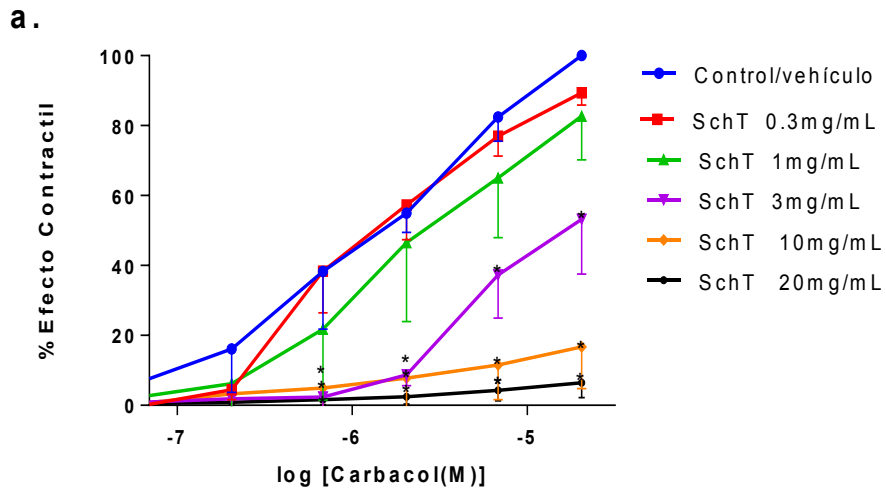
#### **4.4.2 Estudio de la actividad antiespasmódica sobre el útero del extracto hidroalcohólico (*SchT*)**

##### **4.4.2.1 Efectos de *SchT* sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Carbacol (Cbl) en el útero aislado de rata**

Para evaluar el efecto de *SchT* sobre el músculo liso uterino, se realizaron curvas concentración respuesta (CCR) de carbacol en útero aislado de rata, encontrando que *SchT* produjo una caída en el efecto máximo de la contracción producida por dicho agonista muscarínico. Estos resultados sugieren que *SchT* produjo una inhibición en forma no-competitiva sobre las CCR de carbacol en este tejido.

Este efecto fue dependiente de la concentración en un rango de 0.3 a 20 mg de residuo seco/ml de *SchT* ( $pCE_{50} = 5.88 \pm 0.10$  M,  $n=6$ ) (**Fig. 24 a**). La concentración inhibitoria al 50% ( $CI_{50}$ ) de *SchT* resultó de  $4.05 \pm 1.026$  mg de residuo seco/ml (**Fig. 24 b**)

En todos los casos se realizó una CCR de Cbl en presencia de vehículo etanólico ( $n=7$ ). Solo para el vehículo etanólico con concentración más alta de etanol 70° al 20% se encontró diferencias en el porcentaje de efecto máximo de contracción entre la curva en ausencia o presencia del diluyente. Por lo que los porcentajes obtenidos en cada CCR fueron calculados usando el control (CCR de carbacol en ausencia del extracto), excepto para la concentración de *SchT* de 20 mg de residuo seco /ml donde se calculó en base a su vehículo etanólico.

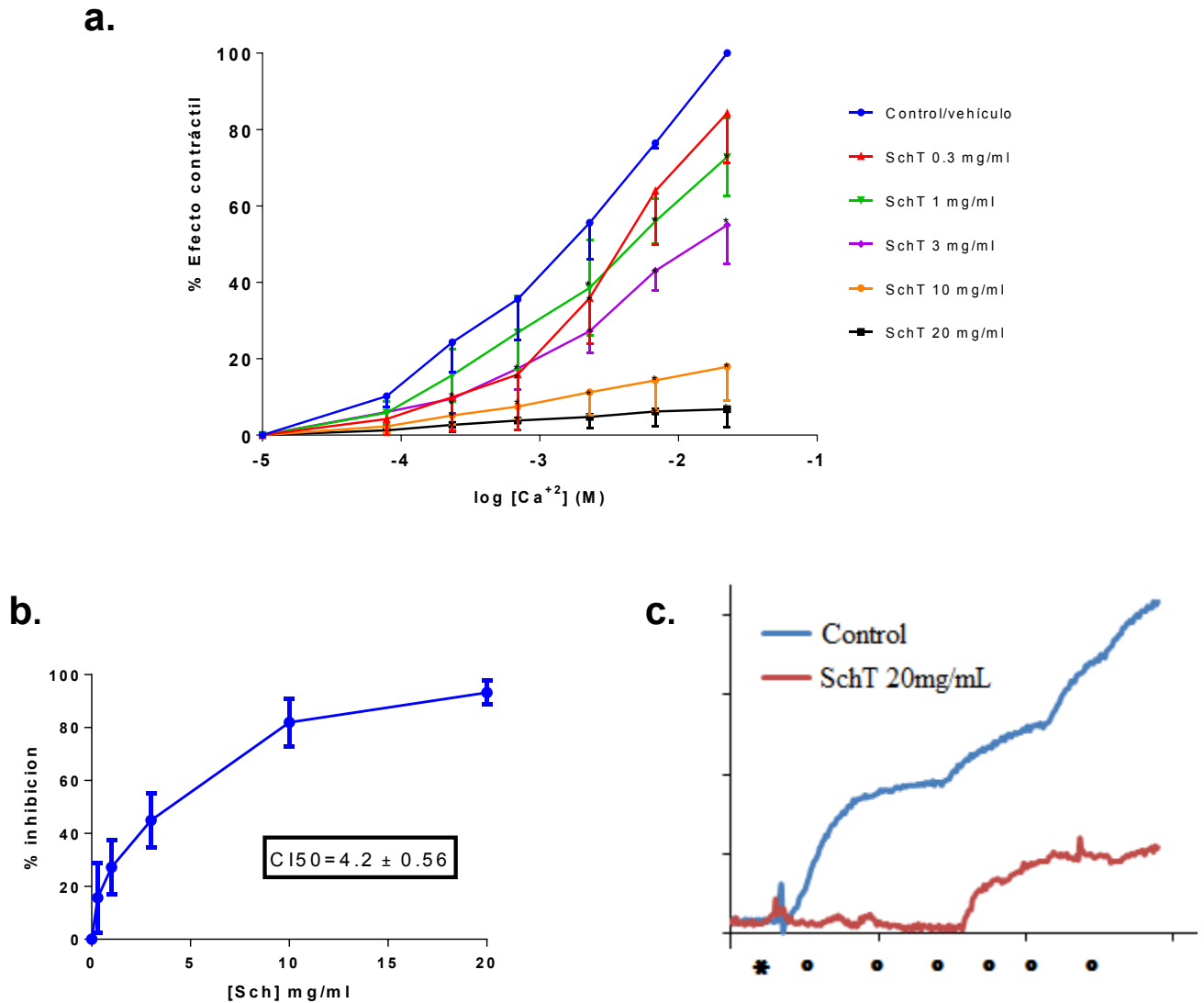


**Figura 24:** (a) Curva concentración respuesta carbacol en ausencia y presencia de la tintura de *S lentiscifolius* ( $n=6$ ) Anova de dos vías: Por tratamiento:  $F=169.5$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=304.8$ ,  $DFn=5$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=13.35$ ,  $DFn=3$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs control/vehículo. (b) Cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *S lentiscifolius*. (c) Registro original de CCR de carbacol en ausencia y en presencia de 3 mg/ml de SchT

#### 4.4.2.2 Efectos de *SchT* sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) en útero aislado de rata

A partir de los resultados obtenidos en la CCR de Cbl realizadas en útero (interacción del tipo antagonismo no competitivo), hipotetizamos que *SchT* podría producir un efecto relajante del músculo liso uterino mediante la inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$ . Para evaluar esta hipótesis se ensayaron los efecto de *SchT* sobre las CCR de  $\text{Ca}^{+2}$  (pCE50=  $2.76 \pm 0.08$  M, n=6). La figura 25a muestra que *SchT* disminuye el efecto máximo contráctil del músculo uterino en las CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  logrando la máxima inhibición a una concentración de 20 mg de residuo seco/ml con una CI50 de  $4.20 \pm 0.56$  mg de residuo seco/ml (n = 6) y mostrando por lo tanto un efecto de antagonismo no competitivo con el influjo de calcio.

En todos los casos se realizó una CCR de  $\text{Ca}^{+2}$  en presencia de vehículo etanólico (n=6). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de efecto máximo de contracción obtenido para las curvas en presencia del vehículo comparado con las curvas en ausencia del mismo. Por lo que los % obtenidos en cada CCR fueron calculados usando el control (CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia del extracto).



**Figura 25:** (a) Efectos del extracto de *S. lentiscifolius* sobre la CCR de calcio en ausencia y presencia de SchT ( $n=6$ ) Anova de dos vías: Por tratamiento:  $F=207.4$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=417.8$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=22.54$ ,  $DFn=36$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs control/vehículo. (b) Curva de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *S. lentiscifolius* (CI50:  $4.2 \pm 0.56$  mg/ml) frente a calcio en el útero de rata aislado. (c) Registro original de CCR de  $Ca^{+2}$  en ausencia y en presencia de 20 mg/mL de SchT



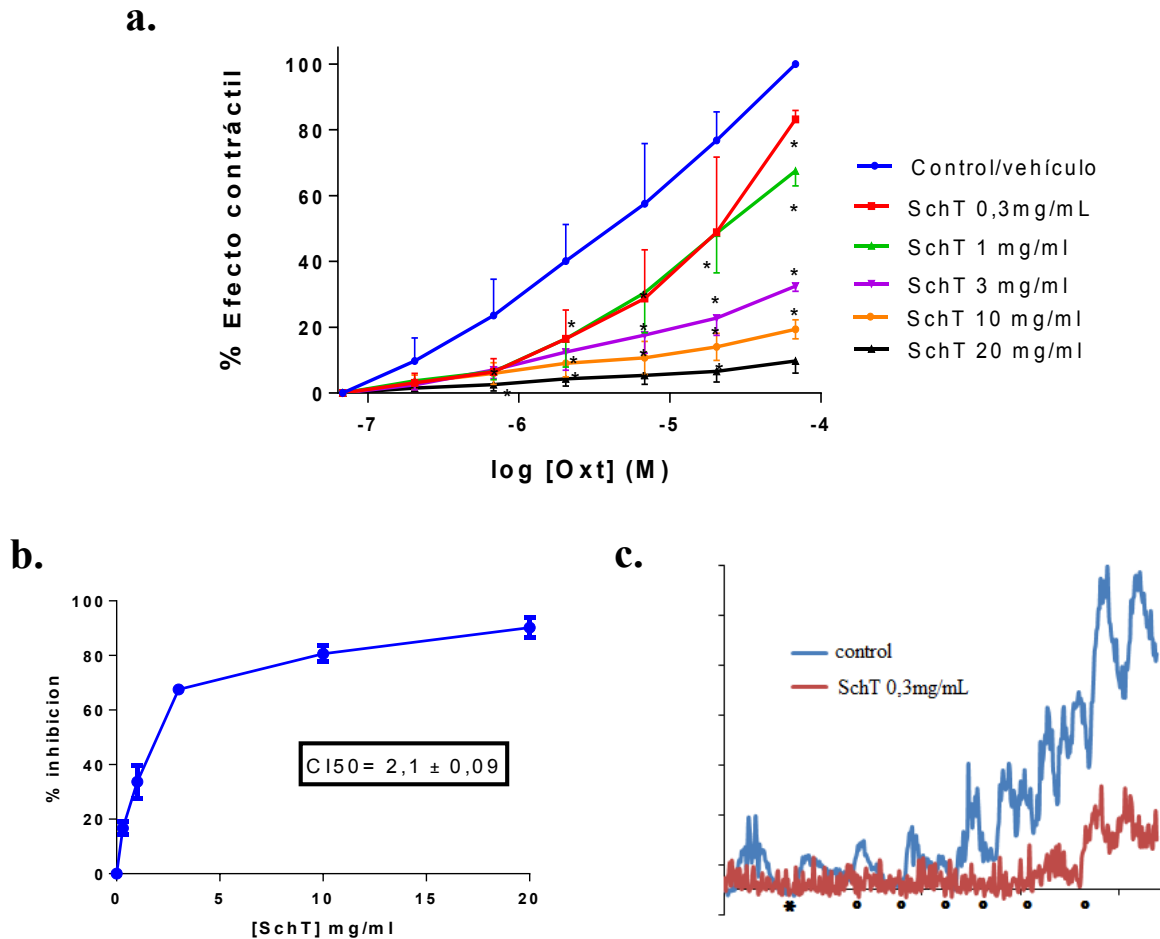
#### 4.4.2.3 Efectos de *SchT* sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de oxitocina en útero aislado de rata

En base a los resultados anteriores y considerando la importancia de los receptores de oxitocina en el músculo liso uterino (Darios *et al.*, 2012), es posible hipotetizar una acción antagonista de dichos receptores. Para evaluar esta hipótesis, realizamos CCR de oxitocina en útero aislado de rata.

*SchT* disminuyó el efecto máximo de la contracción producida por oxitocina en las curvas concentración respuesta (CCR) realizadas en el útero aislado de rata, mostrando un efecto de antagonismo no competitivo dependiente de la concentración de tintura en un rango de 0.3 a 20 mg de residuo seco/ml de *SchT* ( $pCE_{50} = 5.52 \pm 0.06$  M  $n=6$ ) (**Fig. 26a**) y muestra una inhibición no competitiva de *SchT* frente a la acción contráctil de la oxitocina en dicho músculo uterino. La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de *SchT* resultó de  $2.1 \pm 0.09$  mg/ml (**Fig 26 b**). En la figura 26 c se puede observar un registro original de una CCR de oxitocina en ausencia y en presencia de 0.3 mg/ml de *SchT*.

En todos los casos se realizó una CCR de oxitocina en presencia de vehículo etanólico ( $n=6$ ). Sólo para las concentraciones de etanol 70° equivalentes a las presentes en los extractos de *SchT* de 10 y 20 mg de residuo seco/ml se encontraron diferencias en el porcentaje de efecto máximo de contracción entre las curvas con y sin vehículo etanólico. Por lo que los porcentajes de efecto contráctil obtenidos en las CCR de oxitocina en presencia de 0.3; 1 y 3 mg de residuo seco/ml fueron calculados usando el control (CCR de oxitocina en ausencia del extracto), mientras que los porcentajes de efecto contráctil

obtenidos en las CDR de oxitocina en presencia de 10 y 20 mg de residuo seco/ml de *SchT* fueron calculados con respecto a su propio control (vehículo etanólico correspondiente).



**Figura 26:** (a) Efectos del extracto de *S. lentiscifolius* sobre la CCR de oxitocina en ausencia y presencia de *SchT* ( $n=6$ ) Anova de dos vías: Por tratamiento:  $F=10.58$ ,  $DFn=42$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=219.3$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=10.58$ ,  $DFn=42$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs control/vehículo (b) Curva de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *S. lentiscifolius* ( $CI_{50}$ :  $2.10 \pm 0.09$  mg/ml) frente a oxitocina en el útero de rata aislado. (c) Registro original en ausencia y en presencia de 0.3mg/ml de *SchT*

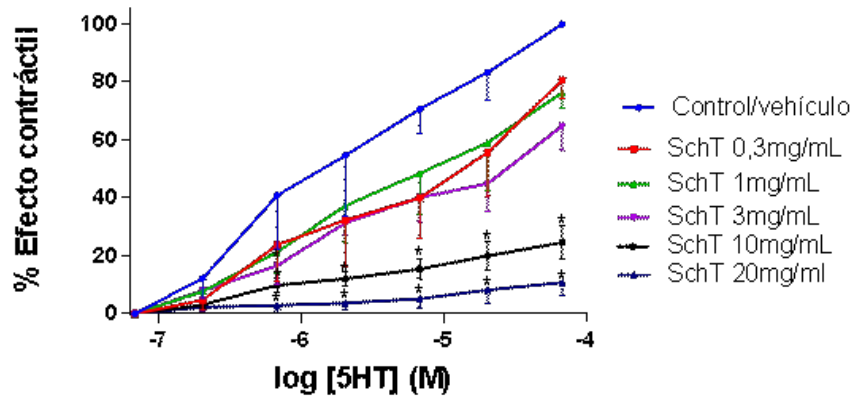
#### 4.4.2.4 Efectos de *SchT* sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de serotonina (5-HT) en útero aislado de rata:

La serotonina también ejerce un efecto modulador en las contracciones uterinas (Darios *et al.*, 2012), para evaluar si *SchT* actúa a nivel de los receptores de serotonina (5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>) realizamos CCR de serotonina en útero aislado de rata.

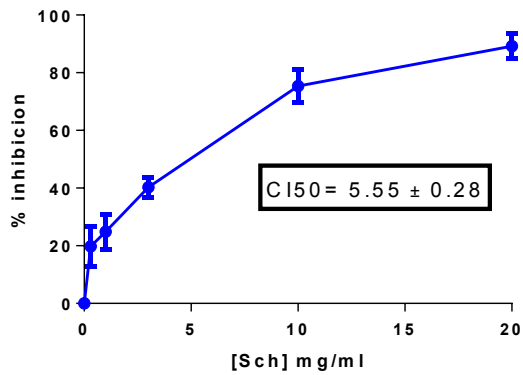
*SchT* disminuyó el efecto máximo de la contracción inducida por serotonina (5-HT) en las curvas concentración respuesta (CCR) realizadas en el útero aislado de rata, mostrando también un efecto de antagonismo no competitivo. Efecto que resultó dependiente de la concentración de *SchT* (pCE50 = 5.79 ± 0.18 M, n=4) (**Fig. 27a**). La concentración inhibitoria al 50% (CI50) de *SchT* resultó de 5.55 ± 0.28 mg de residuo seco /ml (**Fig 27b**).

En todos los casos se realizó una CCR de 5-HT en presencia de vehículo etanólico (n=4). Solo para las concentraciones de etanol 70° equivalentes a las presentes en los extractos de *SchT* de 10 y 20 mg de residuo seco /ml se encontraron diferencias en el porcentaje de efecto máximo de contracción para las curvas en presencia del vehículo en comparación con las curvas en ausencia del mismo. Por lo tanto, los porcentajes de efecto contráctil obtenidos en las CDR de 5-HT en presencia de 0.3; 1 y 3 mg de residuo seco /ml fueron calculados usando el control (CCR de 5-HT en ausencia del extracto), mientras que los porcentajes de efecto contráctil obtenidos en las CDR de 5-HT en presencia de 10 y 20 mg de residuo seco /ml de *SchT* fueron calculados con respecto a su propio control (vehículo etanólico correspondiente).

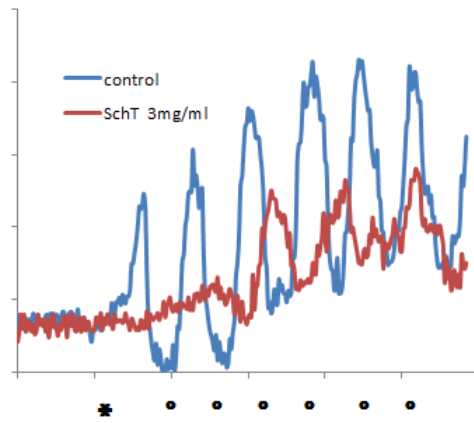
a.



b.



c.



**Figura 27:** (a) Efectos del extracto de *S. lentiscifolius* sobre la CCR de 5-HT en ausencia y presencia de SchT (n=4) Anova de dos vías: Por tratamiento:  $F=67.89$ ,  $DFn=7$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=185.2$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=5.877$ ,  $DFn=42$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs control/vehículo (b) Curva de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *S. lentiscifolius* frente a 5-HT en el útero de rata aislado. (c) Registro original en ausencia y en presencia de 3mg/ml de SchT

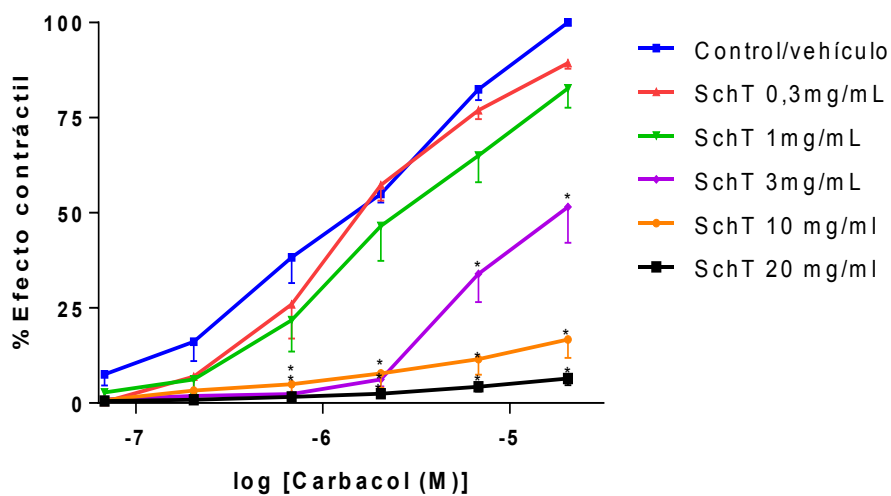
### **4.4.3 Estudio de la actividad antiespasmódica sobre la vejiga aislada de rata del extracto hidroalcohólico (*SchT*)**

#### **4.4.3.1 Efectos de *SchT* sobre las curvas Concentración Respuesta (CCR) de carbacol (Cbl) en vejiga aislada de rata**

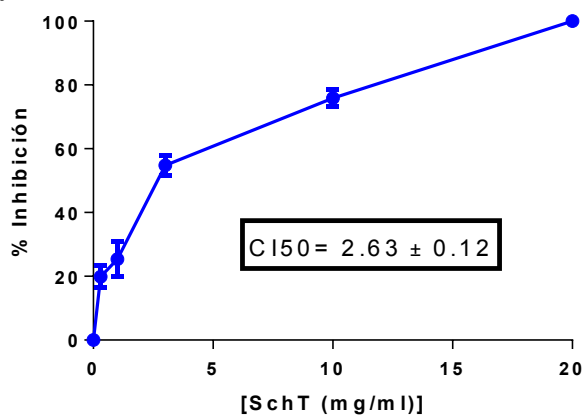
*SchT* produjo una inhibición en forma no-competitiva sobre las CCR de carbacol en vejiga dado que disminuyó el efecto máximo de la contracción producida por Cbl ( $pCE_{50} = 6.47 \pm 0.08$  M,  $n=6$  de forma dependiente de la concentración en un rango de 0.3 a 20 mg de residuo seco/ml de *SchT* (**Fig. 28a**). La concentración inhibitoria 50% ( $CI_{50}$ ) de *SchT* resultó de  $2.63 \pm 0.12$  mg de residuo seco/ml (**Fig. 28b**).

En todos los casos se realizó una CCR de Cbl en presencia de vehículo etanólico ( $n=6$ ). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de efecto máximo de contracción para las curvas en presencia del vehículo en comparación con las curvas en ausencia del mismo, por lo que se calcularon los efectos máximos contráctiles de cada curva en presencia de las distintas concentraciones de tintura en función de la curva control en ausencia de vehículo etanólico.

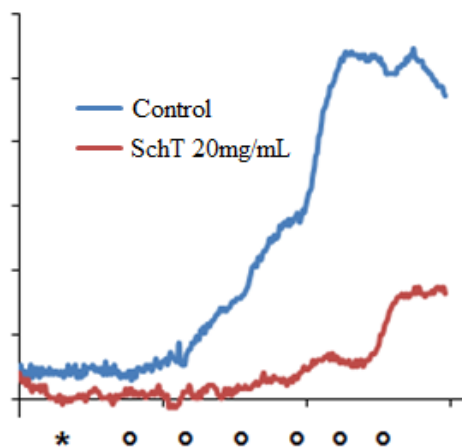
a.



b.



c.



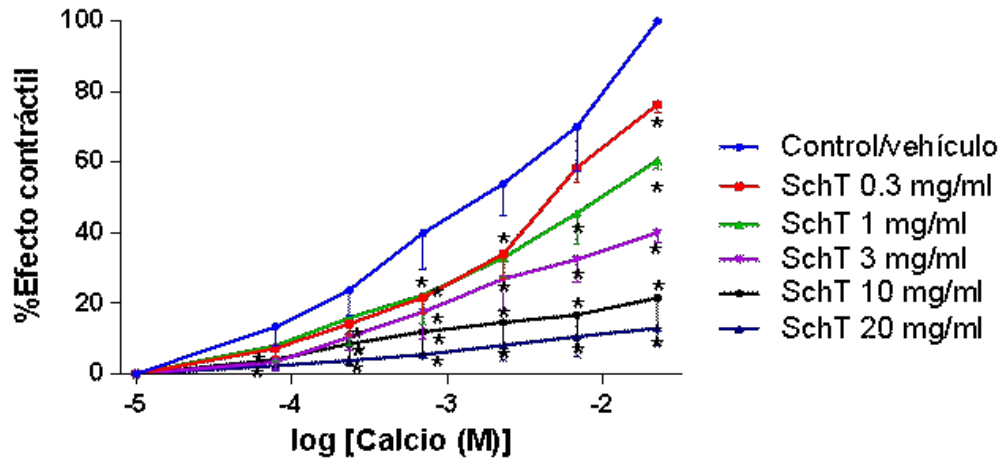
**Figura 28:** (a) Curva concentración respuesta carbacol en ausencia y presencia de la tintura de *S lentiscifolius* ( $n=6$ ) Anova de dos vías: Por tratamiento:  $F=124.9$ ,  $DFn=5$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=157.8$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=13.69$ ,  $DFn=25$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs control/vehículo. b) Cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *S lentiscifolius* (c) Registro original de CCR de carbacol en ausencia y en presencia de 20 mg/ml de SchT

#### 4.4.3.2 Efectos de *SchT* sobre las Curvas Concentración Respuesta (CCR) de Calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) en vejiga aislada de rata

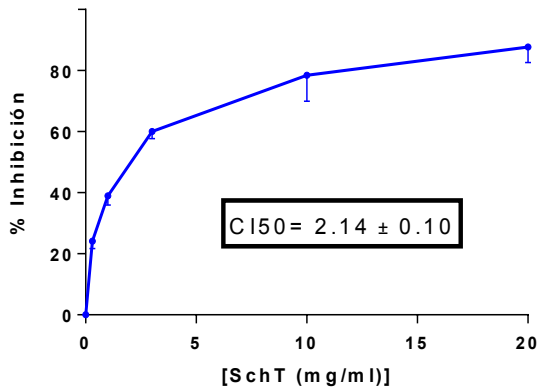
Para evaluar si los efectos de *SchT* son debidos a la inhibición de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  se ensayó su efecto sobre las CCR de  $\text{Ca}^{+2}$  (pCE50:  $2.7 \pm 0.06$  M, n=6). La figura 29a muestra que *SchT* inhibió no-competitivamente las CCR de  $\text{Ca}^{2+}$ , con una CI50 de  $2.14 \pm 0.10$  mg de residuo seco /ml (n = 6), logrando la máxima inhibición a una concentración de 20 mg de residuo seco/ml. En la figura 29 c se muestra un registro de la inhibición del efecto de la CCR- $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de *SchT* 20 mg/ml comparado con la CCR control (en ausencia de *SchT*).

En todos los casos se realizó una CCR de  $\text{Ca}^{+2}$  en presencia de vehículo etanólico (n=6). Los porcentajes obtenidos en las CCR de calcio en presencia de 0.3; 1 y 3 mg de residuo seco /ml fueron calculados usando el control (CCR de calcio en ausencia del extracto) dado que no hubo diferencias significativas entre la curva control y las curvas con vehículo etanólico a la concentración correspondiente. Mientras que los porcentajes contráctiles obtenidos en las CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de a las dos concentraciones mayores de *SchT* fueron calculados con respecto a su propio control (vehículo etanólico correspondiente).

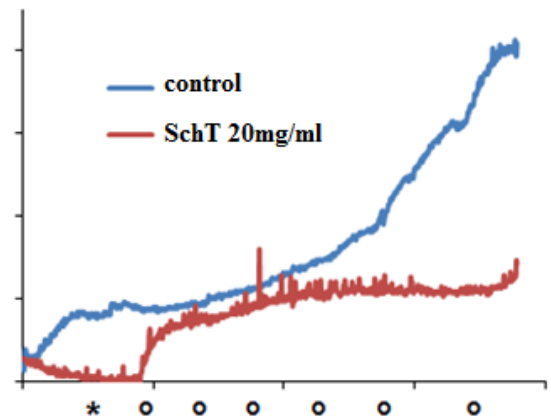
a.



b.



c.



**Figura 29:** (a) Efectos del extracto de *S. lentiscifolius* sobre la CCR de calcio en ausencia y presencia de SchT ( $n=6$ ) Anova de dos vías: Por tratamiento:  $F=231.7$ ,  $DFn=5$ ,  $P<0.0001$ ; Por tiempo:  $F=370.6$ ,  $DFn=6$ ,  $P<0.0001$ . Interacción:  $F=25.82$ ,  $DFn=30$ ,  $P<0.0001$ . Tukey Pos-test:  $p<0.001$  vs control/vehículo (b) Curva de inhibición y cálculo de la concentración inhibitoria 50% de la tintura de *S. lentiscifolius* frente a calcio en vejiga de rata aislada. (c) Registro original de CCR de  $Ca^{+2}$  en ausencia y en presencia de 20mg/ml de SchT



#### **4.4.4 Estudio de los efectos sobre la actividad central en ratones de los extractos obtenidos a partir de hojas**

##### **4.4.4.1 Efectos sobre la movilidad espontánea y enderezamientos en ratones**

###### **4.4.4.1.1 Test de campo abierto:**

Para evaluar los efectos de los extractos sobre la locomoción espontánea y la actividad exploratoria de los ratones se realizó el test de campo abierto. Para ello, se utilizaron tres extractos diferentes obtenidos a partir de las hojas: tintura, infusión y aceite esencial.

Previo a cualquier administración, los ratones fueron observados durante 5 minutos en el campo abierto. Se midió el número de líneas cruzadas, el número de enderezamientos, acicalamientos, micciones y defecaciones durante 5 minutos (ver datos correspondientes al tiempo cero). No se encontraron diferencias significativas entre los ratones ensayados por lo cual fueron divididos al azar en los distintos grupos a ensayar.

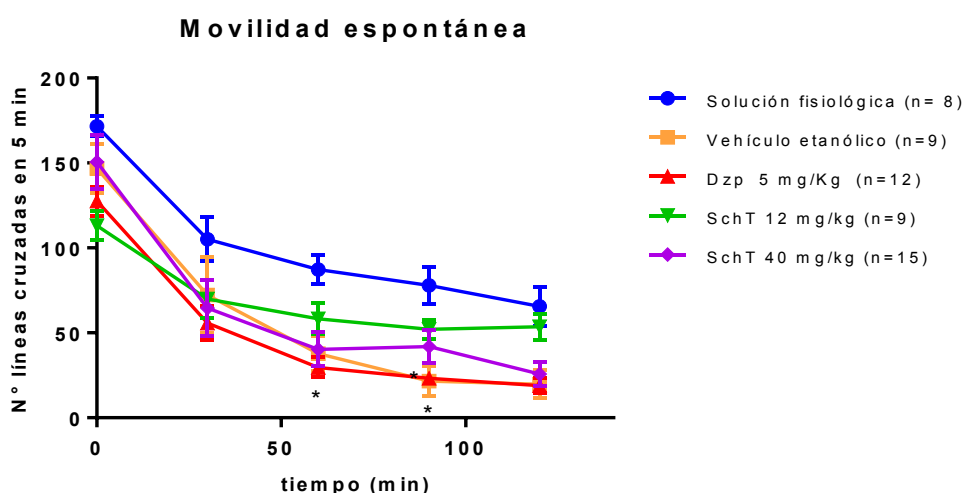
Para realizar el test se administraron en forma intraperitoneal distintas dosis de los extractos, diazepam (5 mg/kg) como control positivo y el vehículo correspondiente a cada extracto como control negativo.

En primera instancia se realizó el test con la tintura (*SchT*)

Para ello, se administraron en dosis de 12 y 40 mg de residuo seco/kg de ratón de *SchT* y se registraron las mediciones en cada ratón cada 30 min como se describió en la sección de materiales y métodos.

*SchT* no modificó significativamente el número de líneas cruzadas durante 5 minutos en el tiempo total del experimento en comparación con el vehículo etanólico en ambas dosis ensayadas (**Fig. 30**).

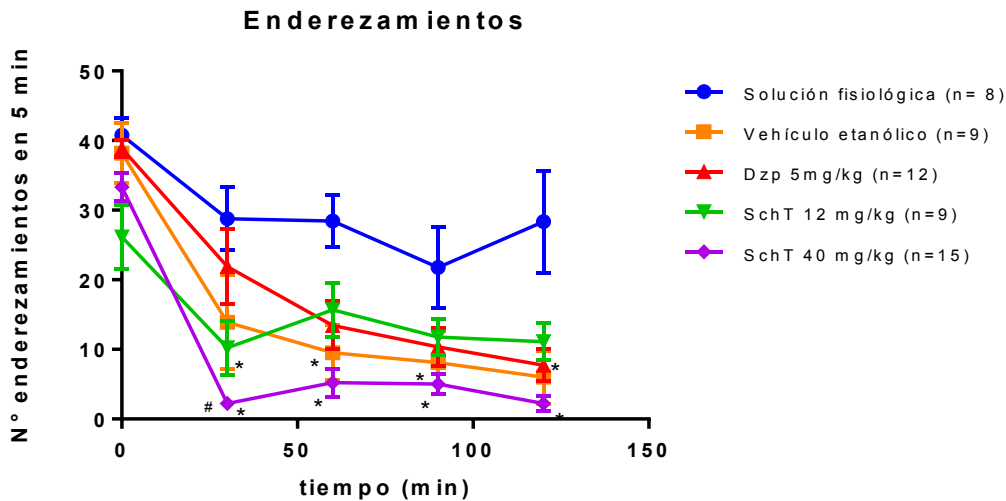
Los ratones tratados con diazepam (Dzp) 5 mg/kg disminuyeron el número de líneas cruzadas durante 5 minutos en las mediciones realizadas a los 60 y 90 minutos, resultado que muestra los efectos sedantes de Dzp a esta dosis validando su uso como control positivo en el test empleado (**Fig. 30**).



**Figura 30:** Efecto de *SchT* sobre la movilidad espontánea de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vía. Por tratamiento:  $F=13,81$ ;  $P<0.0001$ ; por tiempo:  $F63,69$ ;  $P<0.0001$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=228$ . Test a posteriori: Bonferroni  $*p<0.05$  vs SF

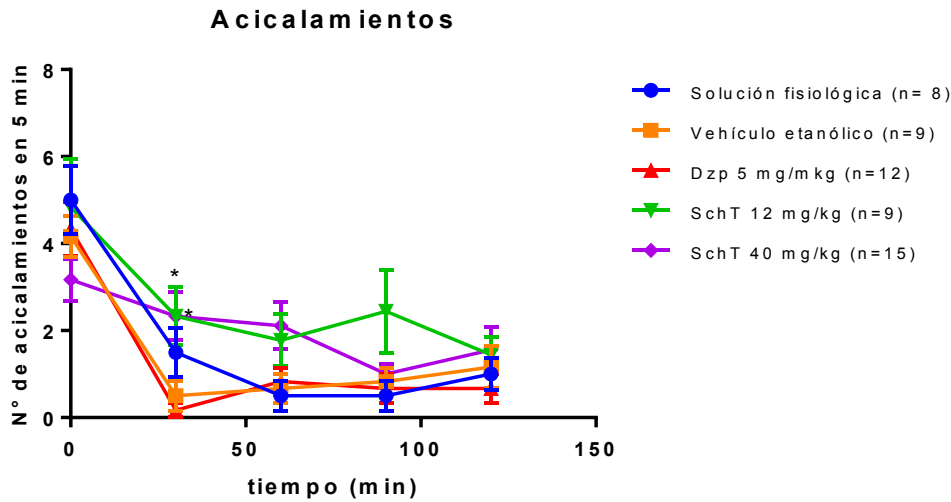
Por otra parte, *SchT* 40 mg/kg disminuyó el número de enderezamientos con respecto a la solución fisiológica durante los 120 minutos de medición, mientras que *SchT* 12 mg/kg sólo disminuyó este parámetro a los 30 min. Por otra parte, el vehículo etanólico disminuyó el número de exploraciones a los 60, 90 y 120 minutos con respecto a la

solución fisiológica pero no mostró diferencias con respecto a ambas dosis de *SchT*. Sólo *SchT* 40 mg/kg disminuyó significativamente el número de enderezamientos a los 30 min con respecto al *Dzp* (control positivo) (**Fig.31**)



**Figura 31:** Efecto de *SchT* sobre capacidad exploratoria de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vía. Por tratamiento:  $F=16,91$ ;  $P<0.0001$ ; por tiempo:  $F=29,54$ ;  $P<0.0001$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=228$ . Test a posteriori: Bonferroni  $*p<0.05$  SF;  $\#p<0.05$  vs *Dzp*

Además, *SchT* 12 y 40 mg/ kg aumentaron significativamente el número de acicalamientos comparado con los ratones tratados con *Dzp* a los 30 minutos del experimento (**Fig.32**); mientras que no hubo diferencias significativas en el número de micciones y defecaciones para todos los tratamientos en el tiempo total del experimento. (datos no mostrados).



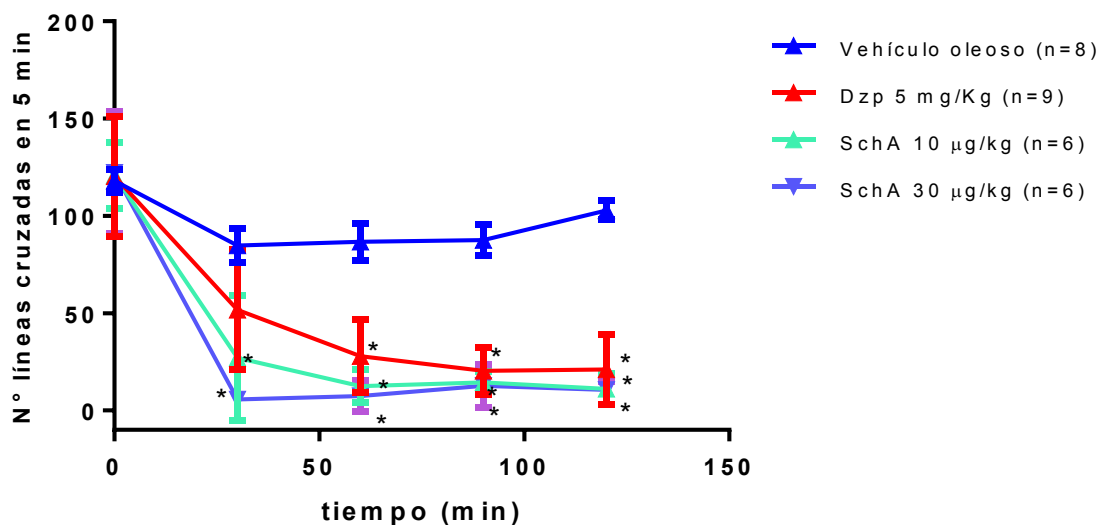
**Figura 32:** Efecto de *SchT* sobre el número de acicalamientos de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vía. Por tratamiento:  $F=4,007$ ;  $P=0.0041$ ; por tiempo:  $F=27,05$ ;  $P<0.0001$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=228$ . Test a posteriori: Tukey:  $*p<0.05$  vs Dzp.

Dado que no se evidenciaron diferencias significativas en la movilidad espontánea ni en el número de exploraciones entre los ratones tratados con vehículo etanólico y ambas dosis de *SchT* resultó de nuestro interés evaluar los efectos centrales de otro tipo de preparación de las hojas para independizar los efectos de los principios activos de nuestra especie vegetal de los efectos centrales conocidos del etanol.

Para ello, en otro grupo de experimentos se evaluaron los efectos del aceite esencial (*SchA*) sobre la conducta de ratones expuestos al test de campo abierto.

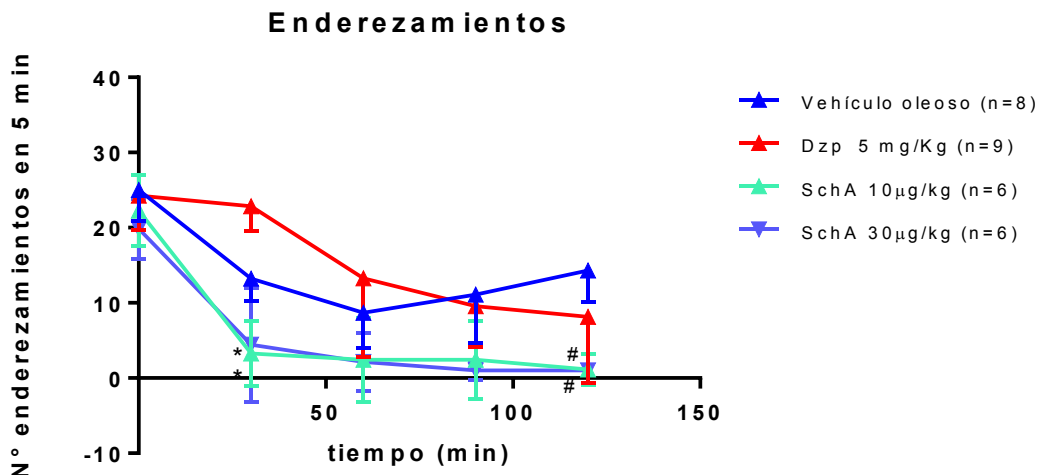
Ambas dosis de *SchA* disminuyeron significativamente el número de líneas cruzadas durante 5 minutos desde los 30 min a los 120 min del experimento en comparación con valores obtenidos en ratones tratados con vehículo oleoso, de forma similar al Dzp. (Fig. 33).

### Movilidad espontánea



**Figura 33:** Efecto de *SchA* sobre el número de líneas cruzadas en 5 minutos de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vía. Por tratamiento:  $F=27.81$ ;  $P<0.001$ ; por tiempo:  $F=37.28$ ;  $P<0.0001$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=135$ . Test a posteriori: Tukey:  $*p<0.05$ : Vehículo

Por otra parte, *SchA* 10 y 30 µg/kg disminuyó el número de enderezamientos con respecto al Dzp a los 30 min. Los ratones tratados con *SchA* también mostraron menor número de enderezamientos que el vehículo oleoso a los 120 min del experimento sin embargo, los ratones tratados con vehículo no mostraron comportamiento diferente al Dzp (Fig. 34).



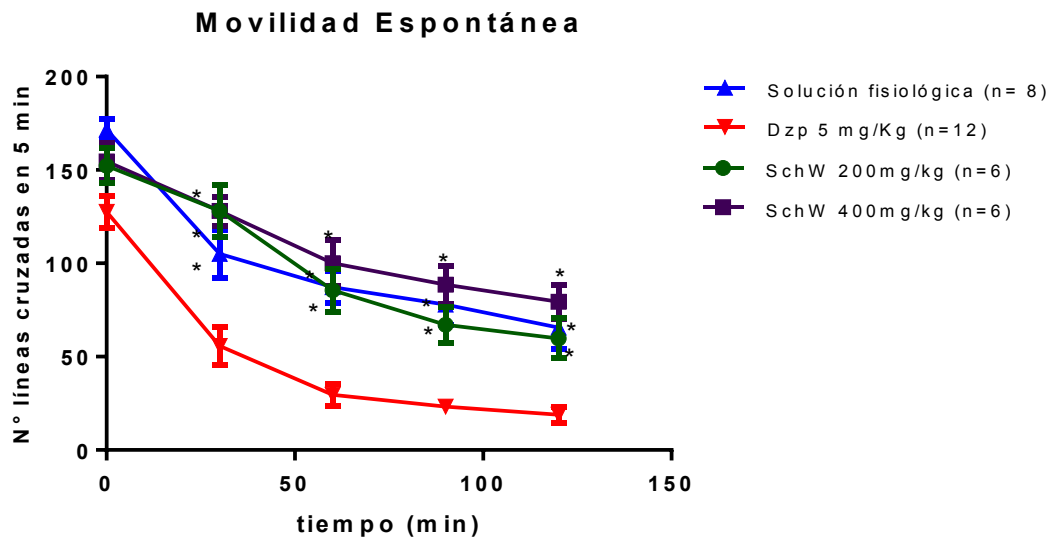
**Figura 34:** Efecto de *SchA* sobre el número de enderezamientos en 5 minutos de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vías. Por tratamiento:  $F=27.81$ ;  $P<0.001$ ; por tiempo:  $F=37.28$ ;  $P<0.0001$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=135$ . Test a posteriori: Tukey: \* $p<0.05$  vs Dzp, # $p<0.05$  vs Vehículo.

Los ratones tratados con *SchA* no mostraron diferencias significativas en el número de acicalamientos a las dosis ensayadas.

Estos resultados sugieren que el aceite esencial extraído a partir de las hojas muestra un efecto sedante en el test de campo abierto.

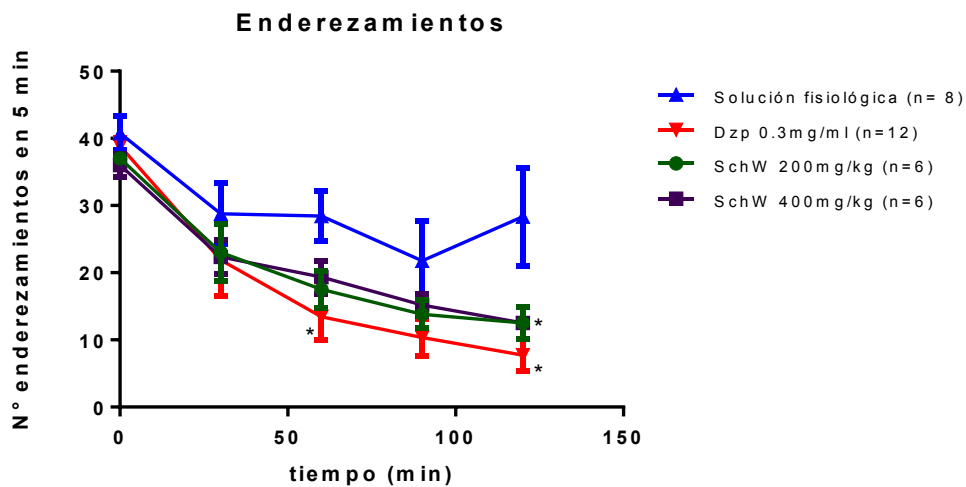
Puesto que la forma más común de consumo de una planta medicinal es en infusión, ensayamos ésta preparación realizada a partir de las hojas (*SchW*) en el test de campo abierto.

Los ratones tratados con *SchW* 200 y 400 mg/kg aumentaron significativamente el número de líneas cruzadas durante 5 minutos en todo el tiempo del experimento en comparación con los valores obtenidos de ratones tratados con diazepam al igual que los ratones tratados con solución fisiológica (Fig. 35).



**Figura 35:** Efecto de SchW sobre el número de líneas cruzadas en 5 minutos de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vía. Por tratamiento:  $F=51,26$ ;  $P<0.001$ ; por tiempo:  $F=65,51$ ;  $P<0.0001$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=100$ . Test a posteriori: Tukey:  $*p<0.05$  vs Dzp.

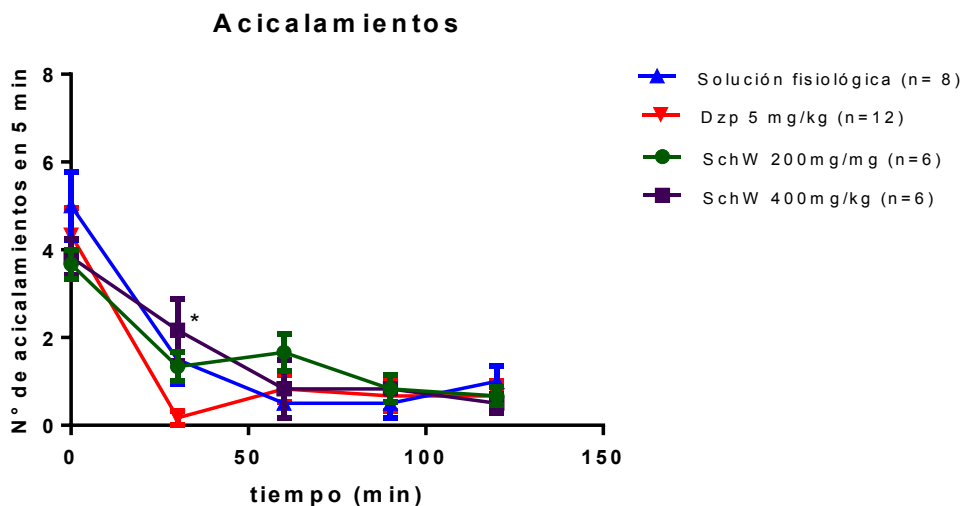
Por otra parte, SchW 200 y 400 mg/kg disminuyeron el número de enderezamientos con respecto al control con solución fisiológica a los 120 min del experimento (**Fig. 36**).



**Figura 36:** Efecto de SchW sobre el número de enderezamientos en 5 minutos de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vía. Por tratamiento:  $F=9.134$ ;  $P<0.001$ ; por tiempo:  $F=22.12$ ;  $P<0.0001$ . Test a posteriori: Tukey:  $*p<0.05$  vs SF

Por otra parte, sólo los ratones tratados con *SchW* 400mg/kg mostraron un aumento significativo en el número de acicalamientos a los 30 minutos del ensayo (**Fig. 37**).

Estos resultados sugieren que la infusión no modificó la movilidad de los ratones en las dosis utilizadas pero si la capacidad exploratoria de los mismos disminuyéndola.



**Figura 37:** Efecto de *SchW* sobre el número de acicalamientos en 5 minutos de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vía. Por tratamiento:  $F=0.7143$ ;  $P=0.5457$ ; por tiempo:  $F=47.17$ ;  $P<0.0001$ . Test a posteriori: Tukey:  $*p<0.05$  vs *Dzp*

#### 4.4.5 Estudios de los efectos ansiolíticos de los extractos

##### 4.4.5.1 Test de supresión de alimento:

Para evaluar el efecto ansiolítico de los extractos se evaluaron los mismos mediante el test de supresión de comida. Para ello, los ratones permanecieron en ayuno durante 24 horas, luego de las cuales se administró vía intraperitoneal distintas dosis de los tres extractos de esta especie: infusión (*SchW*), tintura (*SchT*) y aceite esencial (*SchA*) obtenidos a partir de las hojas.

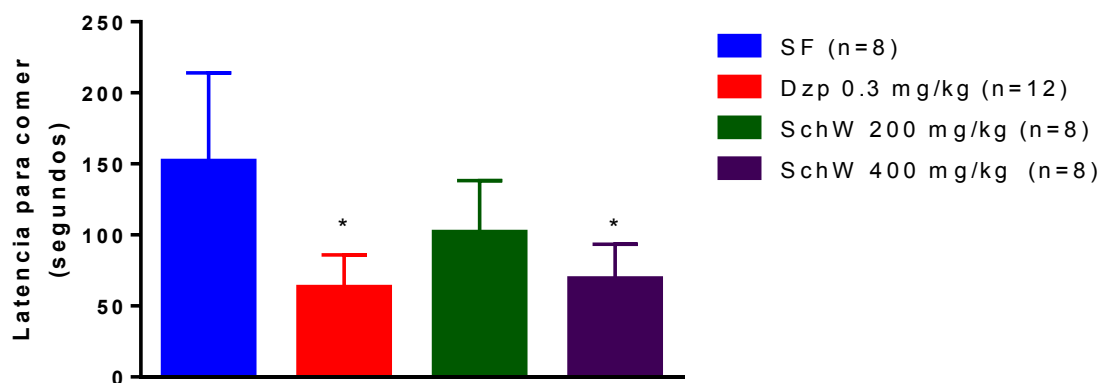


En primera instancia se realizó el test con la infusión (*SchW*). Para ello los ratones se dividieron en cuatro grupos aleatoriamente a los que se les administraron intraperitonealmente solución fisiológica, diazepam 0.3 mg/kg y *SchW* en dosis de 200 y 400 mg/Kg.

Los ratones se mantuvieron aislados en jaulas individuales sin comida ni agua por 60 minutos. Luego de este período se introdujo cada ratón en la caja y se registró el tiempo de latencia desde que se depositó el ratón en el recinto hasta el primer momento de alimentación. Además se midió la cantidad de alimento ingerido por los mismos tal como se describió en la sección de materiales y métodos 3.5.6.2.

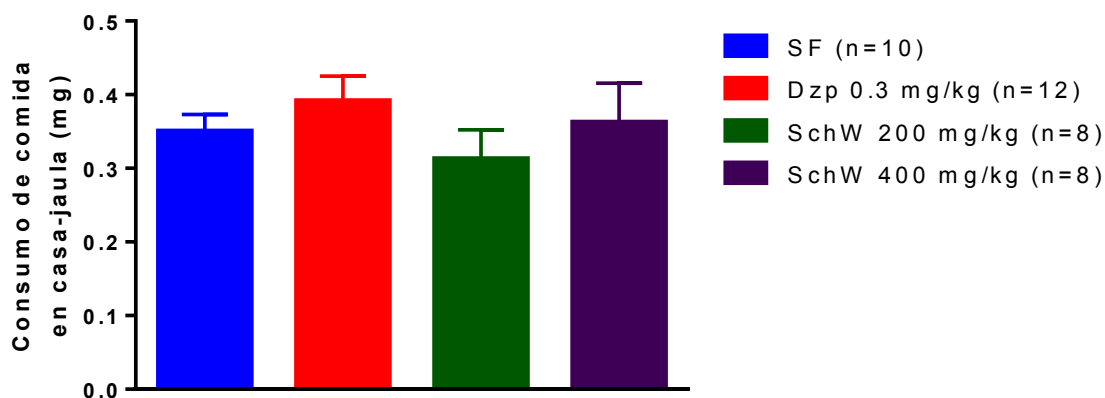
En este test utilizamos diazepam (Dzp) a dosis ansiolíticas (0.3 mg/kg) como testigo. Dzp 0.3 mg/kg disminuyó significativamente la latencia para comenzar a comer con respecto a la solución fisiológica (SF), validando de esta forma el test empleado para medir actividad ansiolítica de los extractos a evaluar. (**Fig 38**).

En los ratones tratados con *SchW* 400 mg/kg disminuyó significativamente la latencia para comer comparado con los ratones tratados con SF y este efecto fue similar al obtenido con Dzp. Por su parte, *SchW* 200 mg/Kg no presentó este efecto (**Fig. 38**).



**Figura 38:** Efecto de *SchW* sobre la latencia para comer en el test de supresión de alimento. Test ANOVA de una vía.  $F=10.55$ ,  $P<0.0001$ . Test a posteriori: Tukey:  $*p<0.05$ : SF

Ni diazepam, ni *SchW* (ambas dosis) mostraron diferencias significativas en la cantidad de comida consumida a las dosis ensayadas (**Fig. 39**).



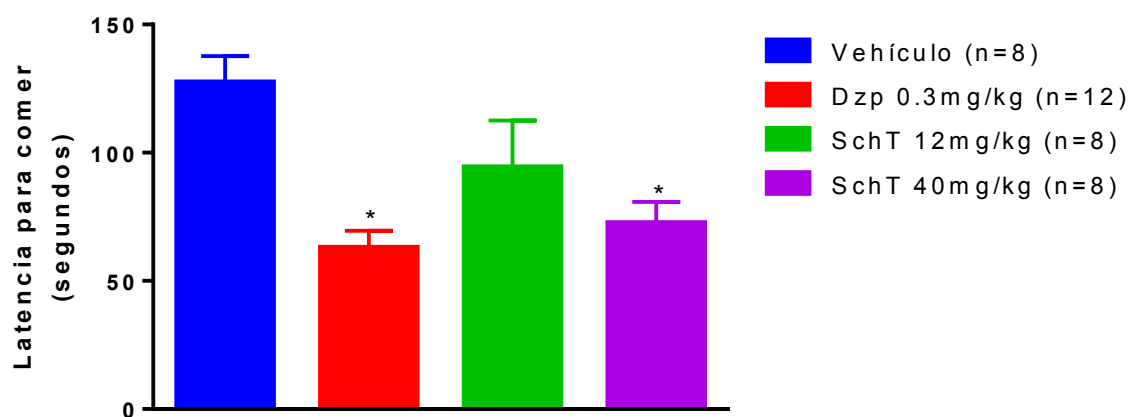
**Figura 39:** Efecto de *SchW* sobre el consumo de comida en 5 minutos en el test de supresión de alimento. Test ANOVA de una vía.  $F=0.7993$ ;  $P=0.5024$ , NS vs SF

Teniendo en cuenta que la menor latencia para comer muestra un menor estado de ansiedad en el ratón, estos resultados sugieren que la infusión de hojas de *SchW* 400 mg/kg muestra un efecto ansiolítico en el test de supresión del alimento.

Dado que el consumo de comida fue similar para todos los tratamientos, el efecto en el tiempo de latencia no es debido a un efecto de la infusión sobre el apetito de los ratones tratados.

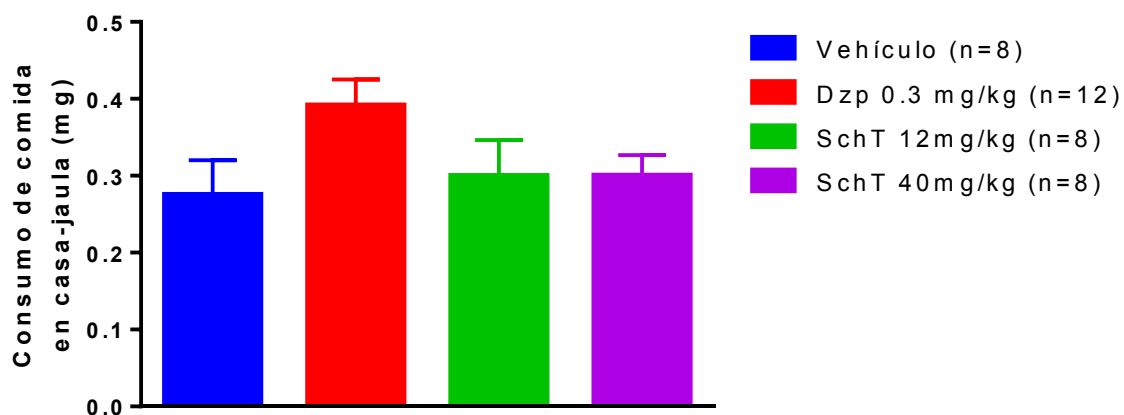
De igual manera se evaluaron los efectos de *SchT*. Para ello se administraron intraperitonealmente dosis de 12 y 40 mg/kg de *SchT* a ratones en las mismas condiciones descriptas para la infusión. Se realizó un control con vehículo etanólico y se utilizó el mismo testigo. Los ratones fueron agrupados aleatoriamente para su tratamiento.

*SchT* 40 mg/kg y Dzp presentaron la misma latencia para comer siendo este parámetro significativamente menor al valor obtenido con el vehículo etanólico. Los ratones tratados con *SchT* 12 mg/kg mostraron un comportamiento similar al del vehículo (Fig. 40).



**Figura 40:** Efecto de *SchT* sobre la latencia para comer en el test de supresión de alimento. Test ANOVA de una vía. Por tratamiento:  $F=27.81$ ;  $P<0.001$ ; por tiempo:  $F=37.28$ ;  $P<0.0001$ ,  $DFn=4$ ,  $DFd=135$ . Test a posteriori: Tukey:  $*p<0.05$ : Vehículo

Ni los ratones tratados con ambas dosis de *SchT* ni el vehículo etanólico mostraron diferencias significativas en la cantidad de comida consumida a las dosis ensayadas en comparación con el testigo utilizado (Fig. 41).

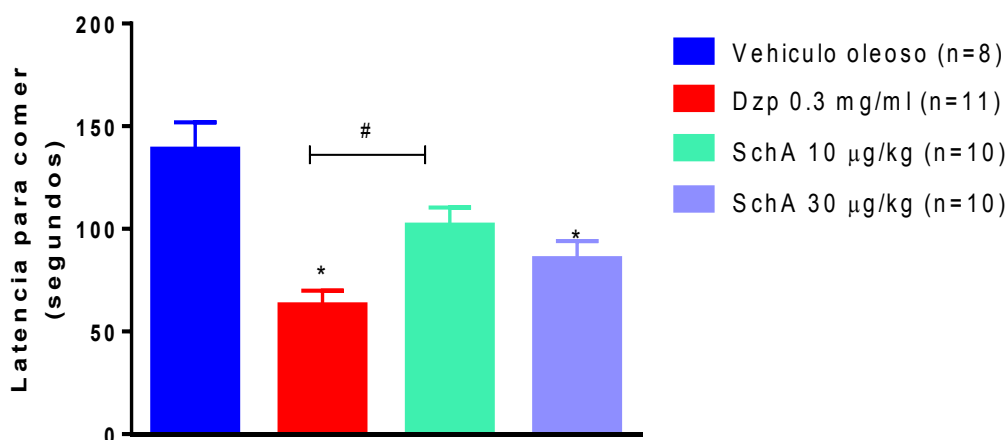


**Figura 41:** Efecto de *SchT* sobre el consumo de comida en 5 minutos en el test de supresión de alimento. Test ANOVA de una vía.  $F=2.096$ ;  $P=0.1203$ , Post- test Tukey: NS vs vehículo

Tal como lo encontrado con la infusión de las hojas, estos resultados sugieren que *SchT* 40 mg/kg muestra un efecto ansiolítico en el test de supresión del alimento.

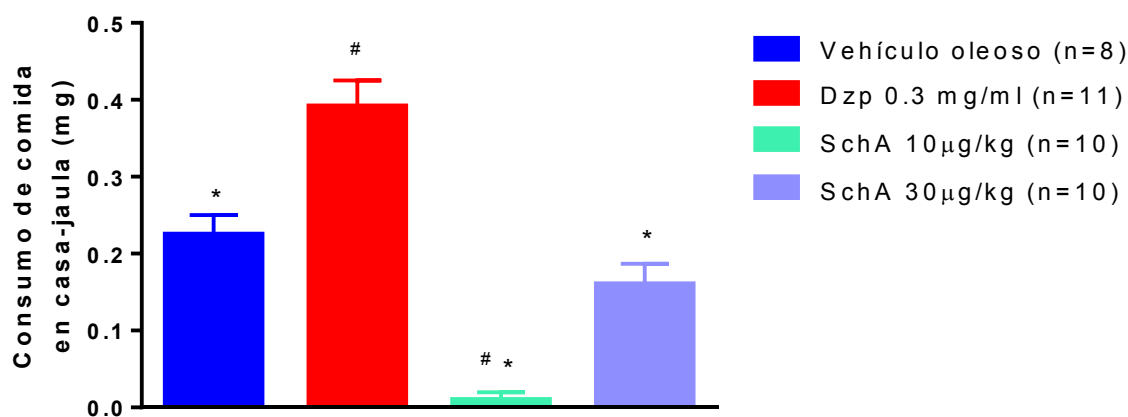
Por último se ensayaron los extractos de aceite esencial extraído de las hojas.

Los ratones tratados con *SchA* 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y con Dzp 0.3 mg/kg disminuyeron la latencia para comer con respecto al control con vehículo oleoso. Mientras que *SchA* 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  mostró una latencia significativamente mayor a los ratones tratados con Dzp pero no fue diferente a la obtenida con el vehículo oleoso (**Fig. 42**).



**Figura 42:** Efecto de *SchA* sobre la latencia para comer en el test de supresión de alimento. Test ANOVA de una vía.  $F=10.89$ ;  $P<0.001$ ; por tiempo: Test a posteriori: Tukey:  $*p<0.05$ : Vehículo, # vs Dzp.

Todos los tratamientos realizados (vehículo y ambas dosis de *SchA*) mostraron menor consumo de alimento que Dzp. Sin embargo sólo *SchA* 10 µg/kg fue significativamente menor que el vehículo oleoso (**Fig. 43**).



**Figura 43:** Efecto de *SchA* sobre el consumo de comida en 5 minutos en el test de supresión de alimento. Test ANOVA de una vía.  $F=38.38$ ;  $P<0.0001$ . Test a posteriori: Tukey: # $p<0.05$  vs Vehículo,  $*p<0.05$  vs Dzp

Los resultados obtenidos con *SchA* en el test de supresión del alimento muestran que a dosis de 10 µg/kg el aceite produce un efecto ansiogénico en los ratones dado que aumenta el tiempo de latencia para comer; mientras que a 30 µg/kg el efecto es contrapuesto dado

que se comporta de forma similar a diazepam en la medida del tiempo de latencia. Los cambios en la cantidad de comida consumida sugieren que el aceite esencial modifica los estados de apetito de los ratones tratados.

#### **4.4.5.2 Estudios de los efectos antidepresivos de los extractos**

##### **4.4.5.2.1 Test de suspensión de cola:**

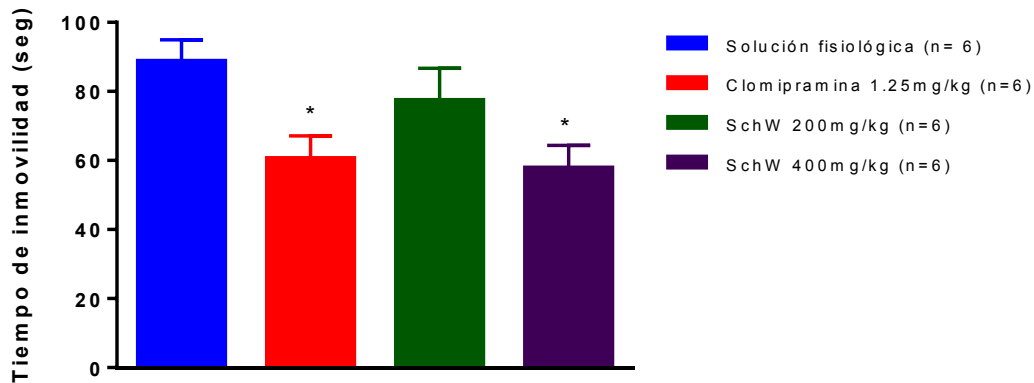
Para evaluar el efecto antidepresivo de los extractos se evaluaron los mismos mediante el test de suspensión de la cola.

Para ello, se administraron vía intraperitoneal distintas dosis de los tres extractos de esta especie: infusión (*SchW*), tintura (*SchT*) y aceite esencial (*SchA*) obtenidos a partir de las hojas.

En primera instancia se realizó el test con la infusión. Para ello se administraron dosis de 200 y 400 mg/kg de *SchW* y se mantuvieron los ratones aislados sin comida ni agua por 60 minutos luego de los cuales se procedió a suspender cada ratón y registrar el tiempo de inmovilidad como se describió en la sección de materiales y métodos.

Clomipramina (antidepresivo tricíclico: control positivo) disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad con respecto a la solución fisiológica, validando de esta forma el test empleado para medir actividad antidepresiva (**Fig. 44**).

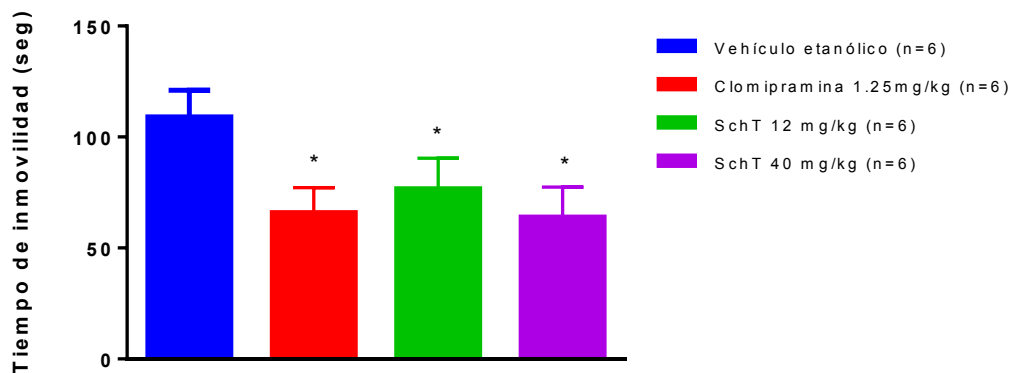
Mientras que *SchW* 200 mg/kg no presentó disminución significativa con respecto al control, *SchW* 400mg/kg disminuyó significativamente el tiempo de inmovilidad al igual que clomipramina, mostrando un efecto antidepresivo de la infusión de hojas a la dosis mayor ensayada (**Fig. 44**).



**Figura 44:** Efecto de SchW sobre el tiempo de inmovilidad de ratones en el test de suspensión de cola. Test ANOVA de una vía  $F=0.6477$ ;  $P=0.5935$ . Test a posteriori: Sidak  $*p<0.05$  vs Solución fisiológica

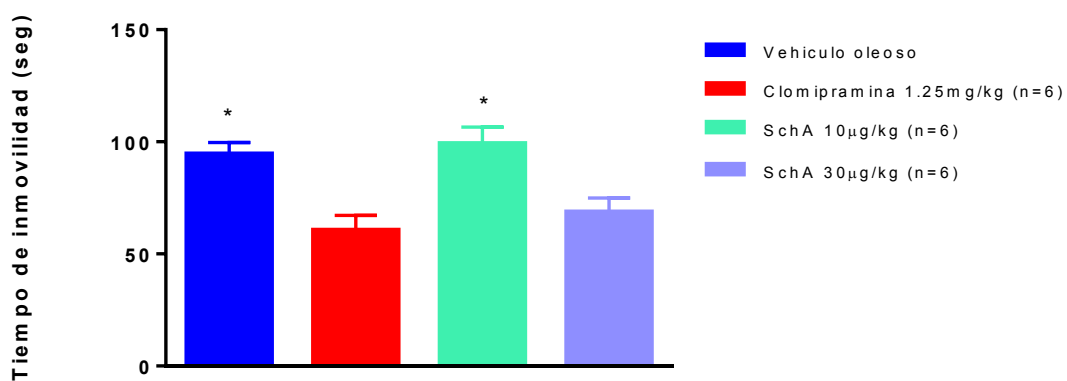
Para evaluar los efectos de SchT, se administraron intraperitonealmente dosis de 12 y 40 mg/kg de SchT a ratones en las mismas condiciones descriptas para la infusión. Se realizó un control con vehículo etanólico. Los ratones fueron agrupados aleatoriamente para su tratamiento.

Los ratones tratados con clomipramina 1.25mg/kg disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad con respecto al control con vehículo etanólico. Además, ambas dosis de SchT mostraron un comportamiento similar al de clomipramina (**Fig. 45**). Por lo tanto estos resultados sugieren un efecto antidepressivo de SchT a las dosis ensayadas.



**Figura 45:** Efecto de SchT (Tintura de Schinus lentifolius) sobre el tiempo de inmovilidad de ratones en el test de suspensión de cola. Test ANOVA de una vía ( $F= 1.4$ ,  $P=0,2798$ ) Test a posterior: Tuckey  $*p<0.05$  vs vehículo etanólico

De igual manera se realizaron ensayos con los extractos de aceite esencial extraído de las hojas. Tanto los ratones tratados con vehículo oleoso como los tratados con *SchA* 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  presentaron un tiempo de movilidad significativamente mayor que clomipramina, mientras que *SchA* a dosis mayor (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) no mostró diferencias con respecto al antidepresivo de síntesis (**Fig. 46**). Estos resultados sugieren que la mayor dosis de *SchA* muestra efectos antidepresivos que no son evidenciados a la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



**Figura 46:** Efecto de *SchA* sobre el tiempo de inmovilidad de ratones en el test de suspensión de cola. Test ANOVA de una vía ( $F= 0.3$ ,  $P=0,2798$ ) Test a posterior: Tuckey  $*p<0.05$  vs clomipramina



# **5.DISCUSIÓN**

## 5.1 ESTUDIO ANATÓMICO

El presente trabajo describe por primera vez los caracteres epidérmicos y anatómicos de peciolo, raquis y foliolo de *Schinus lentiscifolius* Marchand.

En términos generales, los caracteres anatómicos encontrados son coincidentes con los descritos por Metcalfe & Chalk (1950) para la familia Anacardiaceae, a la cual pertenece la especie objeto de estudio.

Con respecto a los caracteres epidérmicos, en ambas caras del foliolo se encontraron células epidérmicas con paredes anticlinales de contorno recto tal como describen para *S. molle* Ferreira *et al.* (2015).

En relación a los estomas, Metcalfe & Chalk (1950) citan para la familia Anacardiaceae sólo el tipo anomocítico, aconsejando un estudio más completo de los mismos. Ese único tipo fue el encontrado por Perrotta & Arambarri (2004) en *S. longifolia* var. *longifolia*, en tanto que en trabajos sobre otras especies como *S. molle* (Ferreira *et al.*, 2015) y *S. areira* (Ruiz *et al.*, 2009) se describen estomas de tipo ciclocítico y anomocíticos, tal lo encontrado y descrito en el presente trabajo para *S. lentiscifolius*. En coincidencia con los autores citados precedentemente, los foliolos son anfistomáticos.

La presencia de tricomas es una característica de importancia en el diagnóstico de las drogas, sobre todo cuando éstas se presentan fragmentadas o pulverizadas. En este trabajo se han encontrado tricomas eglandulares y glandulares tanto en el haz como en el envés del peciolo, raquis y foliolo, lo cual concuerda con los registrados para *S. longifolia* var. *longifolia* por Perrotta & Arambarri (2004).

El mesofilo de *S. lentiscifolius* presenta una estructura isobilateral, en concordancia con lo observado en *S. molle*, mientras que los conspicuos canales esquizolisígenos asociados al floema coinciden con lo mencionado por Ruiz (2009) para *Schinus areira*, al igual que la presencia de idioblastos cristalíferos y tánicos en el mesofilo, características mencionadas por Metcalfe & Chalk (1950) para la familia Anacardiaceae.

El peciolo, en cuanto a su sección y caracteres anatómicos, es similar al descrito por Ruiz et al. (2009) para *Schinus areira*, mientras que las características del raquis se describen por primera vez.

## **5.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO**

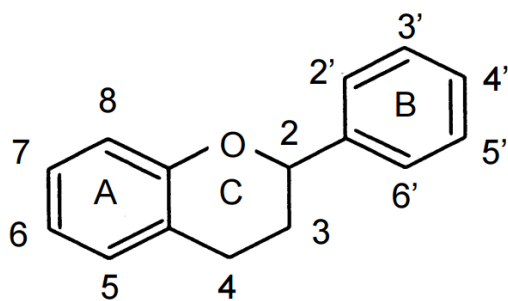
De forma complementaria, se realizó el estudio fitoquímico de *S. lentiscifolius* caracterizando e identificando algunos metabolitos secundarios. La identificación de los mismos junto a la validación de los usos tradicionales de esta especie nos da la posibilidad de adjudicar los efectos farmacológicos encontrados a tales componentes.

Los ensayos fitoquímicos son de gran importancia al ser un primer paso para caracterizar los metabolitos secundarios presentes en una planta. No figuran en la literatura reportes de los grupos fitoquímicos o caracterización de los metabolitos presentes en esta especie, razón por la cual esta tesis aborda el estudio de los mismos.

Principalmente, nos enfocamos en los siguientes grupos: flavonoides y terpenoides. Estos grupos fitoquímicos son de especial interés por estar presentes en otras especies de este género y presentan propiedades farmacológicas avaladas científicamente en dichas especies. Estos fueron estudiados utilizando estándares de referencia y la metodología propuestos en “Plant Drug Analysis” (Wagner & Bladt, 1996).

### 5.2.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Se hallan presentes en todas las partes de las plantas, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, chalconas y auronas, de acuerdo con Luckner (1990). Se caracterizan de forma general por su solubilidad en agua y etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región UV y visible del espectro, debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados. Además, contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante, tal lo reportado por Kühnau (1976).



*Fig 47. Estructura general de los flavonoides*

La reacción de Shinoda positiva en *SchT*, es indicativo de la posible presencia de flavonoides (excepto del tipo isoflavonas, chalconas y auronas). Los resultados positivos de las reacciones de toque sobre papel con: Hidróxido de Sodio (NaOH) indicó la posible presencia de flavonas y/o flavanoles debido a la coloración presentada por formación de estructuras resonantes de color amarillo en los extractos. La reacción con tricloruro de

hierro ( $\text{FeCl}_3$ ) dio coloración negra indicativo de la presencia de polifenoles con tres oxidrilos ( $\text{OH}$ -) adyacentes según datos aportados por Cartaya & Reynaldo (2001).

Al contacto con ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) se presentó coloración amarilla con fluorescencia verde lo cual confirma la presencia de flavonas y flavonoles, que en medio alcalino forman quelatos con dos hidroxilos fenólicos en posición relativa en orto, así como para flavonoides con un grupo carbonilo en 4 y un oxidrilo en posición 5. El Cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) forma complejos o lacas de intensa fluorescencia a la luz de Wood, con hidroxilos en posición orto hidroxil-cetonas vecinos, los primeros son lábiles ante el agregado de  $\text{HCl}$ , mientras los últimos son estables, se produjo la formación de dichas lacas observando fluorescencia con los extractos, de acuerdo con Dominguez (1973).

Por cromatografía de capa fina, frente a los testigos usados se pudo sospechar la presencia de rutina e isoquercitrina. Debido a la baja resolución de los sistemas cromatográficos, para confirmar su presencia fue necesario el uso de HPLC. El perfil cromatográfico obtenido por HPLC confirma la presencia de rutina e isoquercetina en *SchT*, corroborado por su espectro UV que presenta los picos característicos de los flavonoides en el rango de 200-280nm y que concuerdan con las sustancias de referencia. Lo anterior coincidiría con los compuestos reportados por Alonso (2005) para *S. molle*, en el que además se reporta quercetina y quercitrina.

### **5.2.2 Triterpenos y esteroides**

Los triterpenos y esteroides son compuestos de  $\text{C}_{30}$  procedentes de la ciclación del escualeno, los triterpenos poseen una estructura siempre policíclica, normalmente tetra o pentacíclica. No existe una diferencia fundamental entre los triterpenos y los esteroides,

considerándose estos últimos triterpenos tetracíclicos que han perdido, como mínimo tres metilos, tal lo manifestado por Bruneton (1995).

La reacción de Lieberman-Bouchard mostró la presencia de núcleos esteroideos en el extracto de diclorometano de *S. lentiscifolius*. Entre los esteroides hallados en otras especies de este género se encuentra el  $\beta$ -sitosterol presente en *S. molle*. Por medio de CCD se pudo corroborar la presencia de este compuesto en el extracto no polar de *S. lentiscifolius* (*SchDCM*).

### 5.2.3 Análisis del aceite esencial

En la Tabla 3 se presenta la composición porcentual del aceite esencial de ejemplares de *S. lentiscifolius* originarios de Brasil y Uruguay, según trabajos de Rossini *et al.* (2011) y Pawloski *et al.* (2013), adjuntando el análisis realizado en esta investigación. De los compuestos hallados en *SchA* cabe resaltar la presencia de  $\delta$ -cadineno (21%) y limoneno (12.9%), sus componentes mayoritarios, que se encuentran también presentes en los ejemplares de Uruguay y Brasil, aunque en menor proporción que los estudiados en esta tesis. De igual manera se hallan en mayor proporción  $\alpha$ -Copaeno (4.4%),  $\alpha$ -Muroleneo (2.6%) y Espatuleno (4.1%), este último no aparece reportado para el ejemplar de Uruguay.

Por otra parte, en comparación con el aceite esencial de otras especies de este género como *S. molle* se puede decir que en éste se destacan principalmente el  $\alpha$ -Pineno (21-32%),  $\beta$ -Pineno (14-26%) y cariofileno (3-12%) reportado por Atti dos Santos & Rossato (2005) y Doleski *et al.* (2015), compuestos que como se puede apreciar tienen un porcentaje mucho menor o no se registran en *S. lentiscifolius*.

**Tabla 3** Composición porcentual relativa del aceite esencial de *S.lentiscifolius* ejemplares de Uruguay, Brasil y Argentina

Compuestos	%Uru	%Brs	%Arg	Compuestos	%Uru	%Brs	%Arg
Triciclono		0.18		Cadina-3,5-dieno			1.7
cis-3-hexenol			tr	trans-Cadina-1(6),4-dieno			1.7
$\alpha$ -Tujeno		0.23		trans-Murolo-3,5-dieno		0.30	
$\alpha$ -Pinoeno	1.11	4.80	2.4	epi Bicioesquifelandreno			1.7
Metilheptona			tr	$\alpha$ -Humuleno		0.66	0.9
Camfeno	0.79	1.38	tr	Aloaromadendreno		0.38	2.5
Sabineno	1.58	5.08	1.4	cis-Murolo-4(14),5-dieno		0.24	
$\beta$ -Pinoeno		2.82		$\gamma$ -Gurjuneno		1.12	0.1
Mirceno	1.58	1.39		$\alpha$ -Amorfeno		0.94	
$\alpha$ -Felandreno		0.12		Germacreno D	2.09	1.65	0.1
$\alpha$ -Terpineno		0.70	0.1	$\beta$ -Selinene		0.47	
Para-cimeno		1.08	tr	Biciclogermacreno	6.93	2.15	1.4
Limoneno	10.36	8.14	12.9	$\alpha$ -Muroleneo	1.26	2.28	2.6
1,8 Cineol		0.10	0.1	Germacreno		0.52	
cis-Ocimeno		0.09		$\gamma$ -Cadineno		1.04	
trans-Ocimeno		0.10	tr	$\gamma$ -Muroleneo	3.82		0.2
$\gamma$ -Terpineno		1.15	0.1	Cis-Calameneno			tr
Terpinoleno		0.32	tr	$\delta$ -Cadineneo	16.79	14.21	21
Linalool		0.06	tr	Zonareno			0.9
Ment-2-em-1-ol		0.13		Trans-Cadina-1(2),4-dieno		0.40	1.4
Terpineol		0.08		Oxicariofileno			0.9
Terpinen-4-ol		3.85	0.3	$\alpha$ -Cadineno		0.38	
$\alpha$ -Longipinoeno	0.65		0.1	Copaborneol			1.0
$\alpha$ -Terpineol		0.40	0.3	$\alpha$ -Calacoreno		3.33	0.2
Isobornil acetato		0.03		Bourbonanono		0.17	
Bicicloelemeno			0.1	Ledol		0.50	tr
Ciclosativeno			0.2	Espatuleno		1.39	4.1
$\alpha$ -Cubebeno		0.37	1.2	Cariofileno	5.73		
$\alpha$ -Copaeno	1.14	1.21	4.4	$\tau$ -Murolol			0.6
$\beta$ -Cubebeno			0.4	Mustakona			0.4
$\beta$ -Bourboneno		2.37	0.1	Globulol		2.11	0.2
$\beta$ -Elemene		0.45		cetil alcohol			0.1
$\alpha$ -Gurjunene		0.07	0.1	Isocalamendio			0.2
$\beta$ -Cariofileno	4.84	0.59	2.7	Viridiflorol	1.23	1.19	
$\gamma$ -Maaleno			tr	trans-fitol			0.1
guaya-6,9-dieno			0.1	$\alpha$ -Cadinol		4.91	0.2
$\beta$ -Copaeno			0.1	Cadalene		0.18	
Aromadendreno			0.2	Germacron	7.86		

### **5.3 ESTUDIO FARMACOLÓGICO**

Este trabajo de tesis presenta un estudio de las actividades de extractos obtenidos a partir de las hojas de *S. lentiscifolius*. Este estudio de las propiedades farmacológicas de esta especie vegetal se realizó mediante la utilización de diversos modelos experimentales en distintos sistemas biológicos.

En primera instancia se evaluaron los efectos de la tintura de *Schinus* (*SchT*) sobre el músculo liso visceral con el fin de validar su uso en medicina popular como antiespasmódico. Además, dado que varias especies del género *Schinus* son de amplio uso etnomedicinal por sus efectos antidepresivos y sedantes, y no hay estudios científicos de estas actividades farmacológicas, resultó de interés el estudio de las mismas. Es por ello que en este trabajo se evaluaron los efectos a nivel del sistema nervioso central de diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas.

#### **5.3.1 Estudio del efecto de la tintura de sobre el músculo liso gastrointestinal.**

Las plantas antiespasmódicas son hierbas medicinales que ayudan a prevenir o a calmar los espasmos o calambres por producir relajación del músculo liso gastrointestinal. Los principales agentes antiespasmódicos incluyen compuestos extraídos de especies vegetales como por ejemplo los alcaloides de *Atropa belladonna* (atropina, belladona, hiosciamina, y escopolamina) los que han dado lugar a un importante número de derivados sintéticos los que se comercializan como productos farmacéuticos en la actualidad.

El mecanismo de acción que hace útiles a tales compuestos como antiespasmódicos es la disminución del tono y la motilidad intestinal por antagonizar los receptores



muscarínicos en el músculo liso intestinal. Este efecto promueve el alivio del dolor tipo cólico del tracto gastrointestinal y otras vísceras.

Existen varios reportes epidemiológicos y encuestas etnofarmacológicas en toda Latinoamérica, por ejemplo: Zoila (1980), Campos Navarro (1997), que coinciden en destacar el uso de las plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades del aparato digestivo, debido en parte a que el tratamiento con un remedio herbolario implica relativamente poco costo y bajo riesgo para la salud en cuanto a efectos adversos y contraindicaciones.

En bibliografía se encuentran varios reportes acerca de las propiedades a nivel del sistema gastrointestinal de distintas especies del género *Schinus* siendo los mismos bastante diversos. Mientras que *S. areira* y *S. bumeliodes*, según Barboza & Cantero (2006), son empleados etnofarmacológicamente como emenagogo, estomáquicos y laxante, existen estudios que han demostrado una actividad relajante del músculo liso intestinal a de los extractos de *S. molle* en los trabajos de Gundidza (1993), Bello (1996), Bello *et al.* (1998), Beltrán & Moreno (1998), Machado *et al.* (2008) y Bendaoud & Romdhane (2010).

Sin embargo, no hay estudios preclínicos ni clínicos que aborden los efectos de extractos de *S. lentiscifolius* sobre el músculo liso gastrointestinal. En esta tesis, estudiamos este efecto mediante el uso de curvas concentración respuesta en duodeno e ileon aislado de rata, como se describió previamente.

Los resultados obtenidos sugieren que la tintura tiene acción antiespasmódica intestinal por acción directa sobre la contracción del músculo liso intestinal.

Tras el mismo objetivo, Shirole *et al.* (2015) estudiaron los efectos gastrointestinales de *Pistacia integerrima*, una especie utilizada etnofarmacológicamente en India para los trastornos gastrointestinales y que pertenece, al igual que *S. lentiscifolius*, a la familia Anacardiaceae. Esta investigación no sólo reafirmó su uso folclórico como antiespasmódico sino que también demostró que su acción relajante en el músculo liso intestinal de conejo y de cobayo está mediada por la activación de los receptores beta adrenérgicos y bloqueo de los canales de calcio; sin participación de los receptores nicotínicos, canales de sodio, prostaglandinas ni óxido nítrico, tal lo expuesto por Shirole *et al.* (2015).

En este sentido, en nuestro trabajo, no encontramos una relajación directa del músculo liso intestinal con el agregado de las distintas concentraciones de *SchT* por lo que descartamos un posible mecanismo de activación de los receptores beta adrenérgicos ( $\beta_2$  en este caso, ver figura 6. Sección Introducción). Sin embargo, mediante el uso de curvas concentración respuesta mostramos que la *SchT* actúa como antagonista no competitivo frente a carbacol. Por lo tanto, la acción de *SchT* sobre el duodeno e ileon de rata no es debida a una acción antimuscarínica directa de sus componentes. En base a estos resultados hipotetizamos un posible boqueo de los canales de  $Ca^{+2}$  tipo L del músculo liso. En este caso, *SchT* mostró también un antagonismo no competitivo en las CCR de  $Ca^{+2}$ , sugiriéndonos que *SchT* no posee efecto directo a nivel del influjo de calcio.

La CI50 de *SchT* frente a la contracción inducida por carbacol ( $6.32 \pm 1.20$ , n=6) resultó significativamente mayor que la CI50 sobre la CCR de calcio ( $1.90 \pm 0.64$ , n=6, \*p<0.05 Test t: t=3.250, df=10). Este resultado sugiere que el efecto antiespasmódico de

*SchT* involucra una vía más sensible al influjo de calcio que a una vía exclusiva de la activación de los receptores muscarínicos.

Blanco *et al.* (2013) encontraron que verapamil, un conocido bloqueante de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  disminuye el efecto máximo en las CCR de  $\text{Ca}^{+2}$  en intestino aislado de rata. Dado que el verapamil se une desde el interior de la célula en un sitio diferente al de unión del  $\text{Ca}^{2+}$ , los autores sugieren que este modo de interacción con los canales podría ser el causante de que no se comporte como antagonista competitivo desplazando la curva hacia la derecha sin afectar el efecto máximo de contracción. Las CCR de *SchT* tienen un patrón similar a las de verapamil encontradas, por lo que es posible que *SchT* actúe a nivel del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  de manera similar.

Además, considerando que las pruebas fitoquímicas establecieron la presencia de flavonoides en los extractos ensayados de *S. lentiscifolius* y que este grupo fitoquímico es ampliamente conocido por su capacidad de bloquear canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , tal lo reportado por Macedo *et al.* (2014) y Wang *et al.* (2017), es posible entonces que *SchT* impida el influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  por estos canales tal como lo hace verapamil. Existen estudios que muestran que varias especies vegetales (*Rosmarinus officinales*, *Alternanthera sessilis*, *Gomphrena perennis* entre otras) son antiespasmódicas por poseer componentes que bloquean los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  los que son al menos en parte responsables de esta actividad a nivel del músculo liso gastrointestinal, tal como lo expresan Ventura *et al.* (2011), Saqib & Janhaz, (2016) y Bonilla (2017).

Estudios de los efectos farmacológicos de flavonoides muestran que rutina no tiene efecto significativo sobre la contractura del ileon aislado de rata dado que la presencia de la

sustitución del azúcar (Glucosa- ramnosa) reduce la actividad biológica de los flavonoides, mientras que isoquercetina causa inhibición de la contracción fásica y tónica en el mismo tejido, como lo reporta Hammad & Abdalla (1997). Dado que confirmamos la presencia de isoquercetina y rutina en el extracto etanólico de hojas de *S. lentiscifolius* mediante HPLC, es posible asociar el efecto antiespasmódico de la *SchT* sobre el músculo liso gastrointestinal, al menos en parte, a la presencia de isoquercetina.

Sin embargo, el comportamiento no competitivo frente a la CCR de Cbl también nos podría indicar la posible acción de los componentes de la *SchT* en otro receptor presente en el músculo liso intestinal.

Nielsen Kudsk, (1996) establece otro mecanismo que conduce a la contracción del músculo liso intestinal es la activación de los canales de  $K^+$ . Sin embargo, dado que las CCR de  $Ca^{2+}$  fueron realizadas en medio despolarizante de 40 mM  $K^+$  donde no hay gradiente para el eflujo de  $K^+$ , no sería posible proponer este mecanismo como responsable de la actividad antiespasmódica de la *SchT*.

Existen estudios de Nunes Neto *et al.* (2017) que muestran que extractos de *S. terebinthifolius* poseen un perfil de efectos similares a hidroxicina (un conocido agente antihistamínico de primera generación a nivel del receptor de histamina  $H_1$ ) sobre la contractilidad en ileon de cobayo sugiriendo un efecto antiespasmódico por posible acción antagonista de los receptores  $H_1$  en el tracto gastrointestinal. Si bien la hidroxicina tiene actividad antagonista muscarínico por ser un antihistamínico de primera generación, los autores mostraron que a las concentraciones utilizadas de hidroxicina no se observó acción sobre las contracciones inducidas por carbacol.

En base a los resultados obtenidos en nuestros experimentos, es posible hipotetizar una acción antiespasmódica de la *SchT* por acción antagonista sobre los receptores H<sub>1</sub> tal como lo reportado para *S terebinthifolius*. Por el contrario, *SchT* mostró un comportamiento antagonista no competitivo en la CCR de Histamina en ileon de cobayo. Dado que la activación de los canales de Ca<sup>+2</sup> es un mecanismo común involucrado en las contracciones inducidas por histamina y por carbacol, los resultados de *SchT* en las CCR de Histamina son compatibles con nuestra hipótesis de la acción de *SchT* a nivel del canal de Ca<sup>+2</sup> de manera similar al verapamil.

Por lo tanto, nuestros resultados avalan el uso de *SchT* como antiespasmódico intestinal.

### **5.3.2 Estudio del efecto de la tintura sobre el músculo liso uterino**

Los efectos del género *Schinus* sobre el músculo liso uterino son variados. Por un lado se han descrito usos etnobotánicos de *S. bumeliodes* como abortivo, mientras que hay reportes de efectos relajantes del útero para los extractos de *S. molle* en los trabajos de Barboza & Cantero (2006) y Bendaoud & Romdhane (2010).

Tal como ocurre con el músculo liso intestinal, no hay reportes sobre la acción en el músculo liso uterino de extractos de *S. lentiscifolius*, por lo que el estudio de esta actividad es muy importante para completar el screening farmacológico de esta planta medicinal. El hallazgo de actividad uterotónica podría determinar una posible contraindicación del uso durante el embarazo, mientras que un posible efecto espasmolítico de *SchT* podría avalar el uso para el tratamiento de diferentes desordenes que afecten estos órganos tales como la dismenorrea.

Otras especies vegetales han sido estudiadas por sus efectos a nivel del músculo liso uterino encontrándose resultados diversos que han sido muy importantes para la salud comunitaria. Entre ellos, encontramos estudios realizados con extractos de *Sclerocarya birrea*, también conocida como “marula”. Esta especie pertenece a la familia de las Anacardiaceae como el *S. lentiscifolius*. Los autores Mawosa *et al.* (2015), mostraron que los extractos acuosos obtenidos a partir de la corteza y del tallo de “marula” causan contracción del músculo liso uterino por efecto sobre los receptores muscarínicos, de serotonina y de oxitocina, advirtiéndose su uso a personas que sufren de dismenorrea o a mujeres embarazadas.

Como es ampliamente conocido, el útero es un músculo liso con gran densidad de receptores muscarínicos  $M_3$ , los cuales al ser activados por un agonista colinérgico activan las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo L, se acoplan a proteína Gq y aumentan el influjo de este ion al interior celular, originando así la contracción del mismo, mecanismo intracelular común al músculo liso intestinal, tal lo reportado por Pennefather *et al.* (1994) y Brunton(2014).

De acuerdo a Bulleti *et al.* (2000), el útero aislado, al igual que el músculo liso gastrointestinal, de forma independiente al estímulo nervioso u hormonal, grávido o no grávido, presenta contracciones regulares espontáneas. *SchT* produjo una leve disminución de las contracciones espontáneas uterinas sin embargo esta caída no fue significativa en las concentraciones de tintura ensayadas. Dado que esta actividad espontánea del útero depende de la entrada de calcio externo, tal lo expuesto por Chien *et al.* (1966), estos resultados sugieren que la tintura de *S. lentiscifolius* produce un leve bloqueo del influjo de  $Ca^{+2}$  vía canales de  $Ca^{+2}$  tipo L cuya potencia no es tan elevada como para evidenciar una diferencia estadísticamente significativa.

Cuando se realizaron las CCR de carbacol y calcio en presencia de *SchT*, ésta se comportó como antagonista no competitivo muscarínico y del  $\text{Ca}^{2+}$  en ratas jóvenes no grávidas. Estos resultados validan el uso de los extractos de *Schinus* como antiespasmódico uterino.

Puesto que el mecanismo contráctil del músculo liso es común a todos los preparados y depende del influjo de calcio, es posible inferir que, al igual que en el intestino, la *SchT* interfiere con el mismo en útero, por lo que dicho efecto podría estar asociado a la presencia de flavonoides identificados en esta especie, tal como lo detallado para el músculo liso gastrointestinal. En concordancia con esto, existen trabajos experimentales de Lanuzza *et al.* (2017) que prueban que los flavonoides pueden suprimir la contractilidad del músculo liso uterino debido a su habilidad para inhibir el influjo de calcio.

Brunton *et al.* (2014), encontraron que existen otros agonistas, además de agentes colinomiméticos, que producen la contracción uterina. Entre ellos se destacan por su importancia funcional la serotonina (5HT) la cual ejerce un rol modulador en condiciones de no gestación similar al de acetilcolina y los receptores de oxitocina (Oxt), cuya acción es de suma importancia para desencadenar el parto de forma natural. También las prostaglandinas tienen receptores que al ser activados desencadenan cascadas intracelulares que tienen como finalidad aumentar el influjo de calcio por medio de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Es por ello que en esta tesis fue de interés también evaluar la acción de la *SchT* frente a la respuesta del tejido uterino a la oxitocina y a la serotonina mediante las respectivas CCR. Tal como los agonistas de los receptores muscarínicos  $\text{M}_3$  en el útero, el

mecanismo de dichos agonistas (oxitocina y serotonina), en la activación de sus respectivos receptores activan las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

De acuerdo a lo reportado por Consolini & Ragone (2017) la serotonina ejerce una acción estimulante a nivel uterino en los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, que están acoplados a Gq y al aumento de los niveles de PLC y PLA<sub>2</sub>. Ambos segundos mensajeros incrementarán el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol y mientras que al estimular a la PLA<sub>2</sub> resultará en un aumento de la formación de ácido araquidónico lo que se traduce en un aumento en la síntesis de prostaglandinas. Nuestros resultados muestran que *SchT* presenta una acción antagonista no competitiva en la CCR de serotonina.

También evaluamos la acción de *SchT* en CCR de oxitocina. En particular los receptores de oxitocina (Oxt) en el miometrio se acoplan a Gq/G11 y activan la vía PLC-IP3-DAG dando como respuesta en concentraciones medias un aumento de la fuerza y frecuencia de las contracciones rítmicas por aumento del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. De forma simultánea la acción de oxitocina en sus propios receptores aumenta la producción local de prostaglandinas con acción contráctil por estimular a la PLA<sub>2</sub>, lo que resulta en mayor formación del ácido araquidónico, sustrato de las ciclooxigenasa (COX), tal lo manifestado por Consolini & Ragone (2017).

Si bien los receptores específicos para oxitocina se encuentran expresados en útero independientemente si el mismo es gestante o no según Soloff *et al.* (1979), la oxitocina produce mayor fuerza de contracción en útero grávido debido a un aumento en el número de receptores específico en la etapa final de la pregnancy. Esto es de suma importancia



dado que esta hormona tiene un rol destacado y primordial en la iniciación y mantenimiento del trabajo de parto, como se expresa en el trabajo de Kim *et al.* (1998).

En nuestros experimentos encontramos que *SchT* disminuyó el efecto de contracción máxima de las CCR de oxitocina mostrando un efecto antagonista no competitivo. En bibliografía, existen estudios experimentales que muestran un efecto antagonista no competitivo de verapamil (inhibidor de canales de  $Ca^{+2}$  tipo L) frente a las CCR de oxitocina y de acetilcolina (agonista muscarínico) en útero aislado de rata, como el trabajo de Bafor *et al.* (2011), tal como el encontrado para la *SchT* en las CCR de Oxt y carbacol respectivamente. Estos antecedentes, concuerdan con nuestra hipótesis de la acción de los flavonoides presentes en la tintura de *S.lentiscifolius* como responsables de la acción antiespasmódica uterina.

En consistencia a lo encontrado en la tintura de *S.lentiscifolius* Marchand hay varios reportes en bibliografía internacional acerca de los efectos relajantes del músculo liso uterino de distintos flavonoides extraídos de diversas especies vegetales como lo describen Amos *et al.*, (1998) y Shi *et al.* (2012).

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que *SchT* tiene efecto relajante del músculo liso uterino actuando como antagonista no competitivo de todos los agonistas ensayados (carbacol, oxitocina y serotonina) y del influjo de  $Ca^{+2}$ . Además, puesto que el mecanismo contráctil del músculo liso uterino es similar al intestinal e independiente del agonista empleado sumado a los reportes realizados por otros autores, es posible inferir que este efecto antiespasmódico uterino podría estar asociado a la presencia de flavonoides identificados en esta especie y su acción bloqueante leve de los canales de  $Ca^{+2}$  tipo L.

Estos hallazgos avalan el uso como antiespasmódico uterino de *SchT* para trastornos leves como la dismenorrea primaria y advierten de su uso en mujeres embarazadas dado que podrían retrasar el trabajo de parto.

### **5.3.3 Estudio del efecto de la tintura sobre el músculo liso urinario (vesical)**

Dado que la tintura de *S. lentiscifolius* mostró efectos antiespasmódicos en el músculo liso intestinal y uterino, hipotetizamos que tal efecto podría ser observado en el músculo liso de la vejiga. Para ello evaluamos distintas concentraciones de *SchT* en CCR de carbacol y CCR de  $Ca^{+2}$  en medio de alto  $K^{+}$  en vejigas aisladas de rata.

*SchT* no produjo relajación directa del músculo liso de la vejiga, sin embargo disminuyó el efecto de la contracción máxima alcanzada en las CCR de Cbl de forma concentración dependiente. Este resultado sugiere que los principios activos presentes en *SchT* actúan como antagonistas no competitivos de los receptores muscarínicos.

Además, efecto similar fue evidenciado en las CCR de  $Ca^{+2}$  en medio de alto  $K^{+}$ . De forma similar a lo descrito en el músculo liso intestinal o uterino, si bien la *SchT* muestra un antagonismo no competitivo al calcio, es posible que sus componentes inhiban el canal de  $Ca^{+2}$  tipo L, de forma similar al verapamil.

La identificación de flavonoides en el extracto hidroalcohólico soporta el efecto inhibitorio sobre el canal de calcio. De acuerdo con esto, hay estudios de Furer *et al.*, (2015), que muestran el efecto inhibitorio de la contracción del detrusor aislado de porcinos de las fracciones de flavonoides de *Bryophyllum pinnatum*. Otros trabajos, como los de Dambros *et al.* (2005), muestran que los efectos relajantes de los flavonoides en la vejiga

implican múltiples vías entre las que se destacan el antagonismo no competitivo muscarínico y el efecto a nivel del bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$ .

Por otra parte, Lee *et al.* (2016) encontraron que el flavonoide kurarinona produce relajación del músculo detrusor en vejigas de ratas por actuar directamente potenciando los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de  $\text{Ca}^{+2}$ . En este trabajo se desestimó la acción de *SchT* sobre los canales de  $\text{K}^+$ , dado que las CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron realizadas en medio despolarizante de 40 mM  $\text{K}^+$  donde no hay gradiente para el eflujo de  $\text{K}^+$  (Nielsen Kudsk, 1996), tal como fue descrito para el músculo liso intestinal.

Este efecto antiespasmódico sobre la vejiga de ratas valida el uso de los extractos de *S. lentiscifolius* para el tratamiento de la hiperreactividad o inestabilidad vesical.

#### **5.3.4 Estudio de los efectos de la tintura, aceite e infusión sobre la conducta de ratones**

Con el objetivo de realizar un screening de actividades biológicas de los extractos de *S. lentiscifolius* y dado que otros autores, tales como Machado *et al.* (2008) han reportado efectos a nivel del sistema nervioso central de otras especies de *Schinus*, evaluamos preclínicamente las propiedades sobre la conducta de la tintura.

El test utilizado para evaluar la actividad espontánea de ratones fue el test del campo abierto. Este test fue utilizado en varias oportunidades en el laboratorio y ha sido previamente validado por Ragone *et al.* (2007). De acuerdo con Cardenas & Navarro (2002), mediante este test es posible evaluar los efectos de los fármacos a través de las medidas conductuales de exploración como son la locomoción, el acicalamiento y la exploración.

En este test se utilizaron dosis sedantes de diazepam (5mg/kg) que reflejan una disminución en la movilidad espontánea estadísticamente significativa con respecto a la solución fisiológica.

Por su parte, *SchT* no modificó el número de líneas cruzadas en 5 minutos de los ratones tratados, siendo ésta igual al vehículo etanólico, pero si disminuyó el número de enderezamientos en comparación con el control negativo (solución fisiológica). Además, *SchT* aumentó los acicalamientos de los ratones a los 30 min del ensayo en comparación con el testigo y el control negativo. Por lo tanto, *SchT* no modificó la movilidad espontánea de ratones pero disminuyó su capacidad exploratoria.

Según Willner (1991) las sustancias con acción ansiolítica tienden a aumentar la movilidad espontánea, el número de acicalamientos y a reducir el número de exploraciones, por lo que es posible que *SchT* tenga un *efecto ansiolítico leve* y que éste no sea evidenciado en el número de líneas cruzadas (dado que no aumentan en comparación con los ratones tratados con solución fisiológica) al menos a las dosis empleadas en este test.

Por otra parte, el uso de tintura de hojas de *S. lentiscifolius* implica la adición al extracto de la proporción correspondiente de etanol. El etanol posee efectos a nivel del sistema nervioso central, según reporte de Johnson *et al.* (2017), lo cual podría enmascarar el resultado en el test de campo abierto o distorsionar la respuesta obtenida.

Por lo expuesto anteriormente resultó de nuestro interés evaluar los efectos centrales de otro tipo de preparación de las hojas de *S. lentifolius* (*SchA*). Ambas dosis de *SchA* mostraron una disminución en la movilidad espontánea semejante a la producida por

diazepam y del número de enderezamientos sugiriendo una actividad sedante de su aceite esencial.

Existen varios antecedentes bibliográficos, como los trabajos de do Vale *et al.* (2002) y Satou *et al.* (2014), que muestran los efectos sedantes y ansiolíticos de los componentes de aceites esenciales extraídos de plantas tales como: 1,8-cineol, linalol,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -cariofileno, humuleno, citral, myrceno, limoneno y metil chavicol.

Dado que en el estudio de la composición del aceite esencial obtenido a partir de las hojas de *S. lentiscifolius* se encontró la presencia de limoneno, linalol y  $\alpha$ -pineno es posible pensar que estos compuestos podrían ser los responsables de los efectos del *SchA* sobre la conducta de ratones.

También, autores como Takeda *et al.* (2003) y Vissienon *et al.* (2012), describen efectos sedantes y ansiolíticos en extractos hidroalcohólicos de plantas. Sin embargo, nuestros resultados son más marcados cuando fue evaluado el aceite esencial. Esto está de acuerdo con estudios realizados por Rabbani *et al.* 2015, quienes evaluaron los efectos ansiolíticos y sedantes de dos preparaciones diferentes de *Ocimum basilicum*, encontrando que los efectos son notablemente mayores en el aceite esencial que en el extracto hidroalcohólico a dosis equitativas. Los autores adjudican esta diferencia de efectos a los componentes fenólicos de la especie vegetal estudiada.

Puesto que la forma más común de consumo de una planta medicinal es en infusión, ensayamos esta preparación realizada a partir de las hojas de *S. lentiscifolius* (*SchW*) en el test de campo abierto. Este tipo de preparación tiene la ventaja de que posee vehículo acuoso, lo cual independiza al resultado de los efectos centrales del etanol. Sin embargo, el

consumo de las infusiones de plantas medicinales por la población es vía oral mientras que en nuestros ensayos los ratones fueron tratados por inyección intraperitoneal con dos dosis diferentes de infusión.

Ambas dosis de *SchW* no modificaron la movilidad espontánea de ratones con respecto al diazepam pero disminuyeron la capacidad exploratoria tal como lo hizo el testigo, mientras que *SchW* 400 mg/kg mostró un aumento en el número de acicalamientos a los 30 min del test. Tal como lo observado para la tintura, es posible que la infusión posea efectos ansiolíticos (dada la disminución de la capacidad exploratoria) que no son evidenciados en este test a las dosis ensayadas.

Si bien el test de campo abierto es uno de los test más utilizados dentro de los modelos animales de estudio de ansiedad incondicionada y las condiciones de trabajo fueron rigurosamente establecidas y respetadas, este test es muy sensible ante las variaciones de determinados factores potencialmente estresantes (manipulación, ruido ambiente, condiciones de temperatura ambiental, etc.), como lo manifiestan Cárdenas & Navarro (2002). Por lo tanto, los factores en los que se basa la ansiedad probablemente influyen en la variancia biológica observada en los resultados presentados.

Según lo manifestado por Bodnoff *et al.* (1987), el test de supresión del alimento es un test de comportamiento que mide los efectos ansiolíticos basados en el tiempo de latencia del consumo de alimento por el ratón (privado de alimento durante 24 horas) en un entorno desconocido por el animal. El miedo innato de los ratones al escenario nuevo y desconocido induce la inhibición del comportamiento alimenticio causado por la exposición

a un factor nuevo. Claramente el conflicto en este test aparece entre el entorno ansiogénico y el comportamiento inducido por el hambre de acuerdo a Samuels & Hen (2011).

Los tres extractos ensayados muestran efectos ansiolíticos, medidos como una disminución en el tiempo de latencia para comer similares al diazepam (testigo) sólo a las dosis mayores.

También probamos el consumo de alimento en la casa jaula para evaluar si la latencia de alimentación aumentada de ratones podría ser atribuida a un cambio del apetito Jung *et al.*(2014). Para ambas dosis de *SchT* y de *SchW* no hubo cambios en la cantidad de alimento consumido por los ratones en la casa jaula, mostrando menor periodo de latencia para comer en los ratones tratados con 40 mg/kg de *SchT* y 400 mg/kg de *SchW*. Estos resultados nos sugieren que las mayores dosis de *SchT* y *SchW* producen efecto ansiolítico en los ratones tratados.

Teniendo en cuenta que existen varios reportes (Salgueiro *et al.*, 1997; Aguirre Hernández *et al.*, 2010) de la actividad ansiolítica de diferentes flavonoides tales como quercetina y kamferol, entre otros, estos efectos han sido atribuidos básicamente por la afinidad de los flavonoides por los receptores centrales para benzodacepinas. Los efectos ansiolíticos descritos para *SchT* y *SchW* podrían ser atribuidos a la presencia de flavonoides en estos extractos, dado que, tal como se ha dicho previamente han sido identificados algunos flavonoides en el extracto etanólico, más específicamente isoquercetina y rutina.

Si bien no hemos encontrado reportes de actividad ansiolítica de isoquercetina; rutina es un bioflavonoide encontrado en muchas especies vegetales diferentes utilizadas

para el tratamiento de la ansiedad. Aguirre Hernández *et al.* (2010) y Hernandez León *et al.* (2017), encontraron que rutina ejerce su efecto ansiolítico por un mecanismo que involucra la transmisión GABA-érgica en la amígdala basolateral (principal región del cerebro que participa en el desarrollo de la ansiedad). Además demostraron que esta acción no está asociada a una acción directa sobre el receptor de benzodiazepinas a diferencia de lo descrito para quercetina y kamferol dado que el efecto ansiolítico no fue revertido por flumazenil, un antagonista de dicho receptor. Estos resultados concuerdan con los encontrados en nuestros ensayos y sugieren que la presencia de rutina podría ser en parte la responsable de los efectos ansiolíticos descritos, sin embargo, para ahondar más profundamente en el mecanismo implicado sería de interés evaluar la actividad de *SchT* y *SchW* en el test de supresión de alimento en presencia de flumazenil.

Por otra parte, los ratones tratados con aceite esencial extraído de las hojas de *S. lentiscifolius* disminuyeron significativamente la cantidad de alimento consumido por los ratones en la casa-jaula a ambas dosis. Además, el vehículo oleoso produjo el mismo efecto, sin embargo, los ratones tratados con 10 µg/ml de *SchA* disminuyeron esta cantidad bruscamente. Estos resultados muestran que el aceite esencial influye en el apetito de los ratones, con lo cual la disminución en el tiempo de latencia podría no ser adjudicable a un efecto netamente ansiolítico. Además, a partir de los resultados obtenidos con el aceite esencial en el test de campo abierto, los ratones tratados con *SchA* mostraron mayor sedación que los tratados con *SchT* o *SchW*, lo cual también posiblemente influya en la cantidad de alimento que consumen inmediatamente después de su traslado a la casa –jaula. Por lo tanto, serán necesarios más estudios para confirmar el efecto ansiolítico del *SchA*.



### **5.3.5 Estudio de los efectos antidepresivos de la tintura, aceite e infusión**

Según lo reportado por Moncrieff (2001), los trastornos depresivos son la cuarta causa más importante de discapacidad en el mundo. Este problema se ve también reflejado no sólo en las incapacidades laborales transitorias sino también en un gran incremento de la prescripción de antidepresivos. Un reciente meta análisis halló que el predictor de respuesta al antidepresivo más fuerte era el hecho de que la industria farmacéutica patrocinase el estudio y si bien la cantidad de suicidios por sobredosis de antidepresivo disminuyó significativamente con los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (IRSS) en comparación a los antidepresivos más antiguos (antidepresivos tricíclicos), el suicidio por otros medios era más elevado en los que tomaban nuevos antidepresivos según trabajo de Jick *et al.* (1995).

La búsqueda de medicinas alternativas como los extractos de plantas medicinales para el tratamiento de la depresión es una realidad del mundo actual, sin embargo, muchas de ellas son comercializadas en herboristerías sin un consejo profesional adecuado poniendo en riesgo la vida del paciente debido a la incidencia de efectos adversos con la medicación tradicional o a la posibilidad de interacciones medicamentosas de relevante gravedad, tal lo expresado por Boniel & Dannon (2001). Es por ello que es de suma importancia validar los efectos antidepresivos de las plantas medicinales y conocer sus posibles mecanismos de acción de forma de advertir al paciente de los posibles perjuicios de su uso o su posible ineficacia.

En esta tesis se evaluaron los efectos antidepresivos de tres extractos diferentes obtenidos a partir de las hojas de *Schinus lentiscifolius*. Si bien no hay registros de que esta especie vegetal posea propiedades antidepresivas, dado los efectos obtenidos a nivel central

en los test de campo abierto y supresión de alimento, en adición a lo reportado para otras especies de *Schinus*, resulta de interés evaluar el posible efecto antidepresivo de la misma.

El test elegido fue el test de suspensión de la cola (ver descripción en Materiales y métodos). Este test mide el tiempo de inmovilidad del ratón suspendido desde su cola y es ampliamente utilizado en la bibliografía científica internacional siendo su principal ventaja el ser sensible en un amplio rango de dosis y además evita el riesgo de hipotermia inducida por inmersión en el test de natación forzada, de acuerdo con trabajos de Steru *et al.* (1985) y Chemat *et al.* (1986). En el test de suspensión de la cola el tiempo de inmovilidad registrado en el ratón es disminuido con los antidepresivos. Este efecto fue comprobado con la reducción significativa del tiempo de inmovilidad encontrada en los ratones tratados con clomipramina como testigo (**Fig. 44**).

Ambas dosis de *SchT*, *SchW* 400mg/kg y *SchA* 30 µg/Kg disminuyeron el tiempo de inmovilidad en el test de suspensión de forma similar a clomipramina, lo que muestra el efecto antidepresivo de dichos extractos a las dosis mencionadas. Por el contrario, *SchW* 200 mg/kg y *SchA* 10 µg/Kg no produjeron cambios en el tiempo de inmovilidad con respecto a su vehículo.

Estudios de Machado *et al.* (2008) sobre la actividad antidepresiva en extractos hidroalcohólicos de *S. molle*, mostraron que la presencia de rutina en los mismos produjo una disminución en el tiempo de inmovilidad en el test de suspensión de cola pero no mostró efecto antidepresivo en el test del nado forzado debido a que no produce alteración en la locomoción. Los autores concluyeron que, probablemente el efecto producido por rutina es semejante el efecto de un antidepresivo de síntesis que produce el aumento de los

niveles de serotonina y noradrenalina en la hendidura sináptica. Dado que hemos identificado rutina en el extracto etanólico de *S. lentiscifolius*, el efecto antidepresivo similar a clomipramina (antidepresivo de referencia) de *SchT* y *SchW* podría estar asociado a la presencia de este flavonoide presente en los extractos.

Además, existen gran cantidad de estudios (Gostner *et al.*, 2014; Kong *et al.*, 2017; da Silva *et al.*, 2018) que muestran los efectos antidepresivos de aceites esenciales extraídos de especies aromáticas como *Lippia alba*, *Lavandula sp*, *Pimpinella peregrina* entre otras. Dentro del género *Schinus*, Piccinelli *et al.* (2014) encontraron efectos antidepresivos medidos mediante el test de natación forzada en el aceite obtenido de los frutos de *S. terebinthifolius* y de algunos de los compuestos contenidos en dicho aceite como son el (R)-(+)-limoneno y  $\alpha$ -fenantreno. Otros estudios de Kong *et al.* (2017), mostraron el efecto antidepresivo en ratas tratadas durante dos semanas con alfa-pineno extraído del aceite esencial de manzanilla romana mediante inhalación de alfa-pineno. En base a lo reportado por Machado *et al.* (2008) y teniendo en cuenta que el aceite esencial de *S. lentiscifolius* presenta en su composición limoneno y alfa-pineno, es posible asociar el efecto antidepresivo del *SchA* 30  $\mu\text{g/Kg}$  al menos en parte a la presencia de estos dos componentes.

# **6.CONCLUSIONES**

Esta tesis intenta contribuir al conocimiento de la flora nativa argentina por medio del estudio morfoanatómico y fitoquímico de la especie *Schinus lentiscifolius* Marchand (Anacardiaceae), y validar científicamente los usos en medicina popular de los extractos de la misma como antiespasmódico intestinal, urinario y uterino y evaluar sus efectos a nivel del sistema nervioso central.

Mediante el estudio morfoanatómico y fitoquímico hemos:

- Definido caracteres morfoanatómicos específicos que permiten la correcta identificación de la especie para su uso medicinal, tanto al estado de droga cruda entera o fragmentada.
- Caracterizado e identificado la presencia de los flavonoides isoquercetina y rutina, y el esteroide  $\beta$ -sitosterol, compuestos que poseen diversas propiedades biológicas y farmacológicas reportadas en bibliografía.
- Identificado 57 compuestos volátiles del aceite esencial de *S. lentiscifolius*, de los cuales 20 se informan por primera vez.

Mediante el estudio farmacológico en distintos sistemas biológicos, hemos demostrado que:

- SchT tiene **efecto antiespasmódico** de acción directa en los tres músculos lisos estudiados: intestinal, urinario y uterino
- a) En intestino y vejiga de rata el efecto de SchT es debido a su acción antagonista no competitiva de carbacol y del influjo de  $\text{Ca}^{+2}$ .

b) En útero de rata, SchT actúa como antagonista no competitivo de todos los agonistas ensayados (carbacol, oxitocina y serotonina) y del influjo de  $Ca^{+2}$ .

c) El comportamiento de SchT en intestino de rata es similar al encontrado para verapamil (Blanco y col 2018). Puesto que el mecanismo contráctil del músculo liso es común a todos los preparados y depende del influjo de calcio, es posible inferir una similitud con el mecanismo en útero y vejiga, independientemente del agonista empleado. Dicho efecto podría estar asociado a la presencia de flavonoides, los cuales han sido identificados, tal como se ha descrito extensamente en bibliografía por otros autores para flavonoides extraídos de diferentes especies vegetales.

- El *aceite esencial* de *S. lentiscifolius* mostró actividad sedante en el test de campo abierto, mientras que los efectos producidos en el mismo test por la tintura y la infusión mostraron un potencial efecto ansiolítico. Este efecto sedante en el aceite esencial podría ser debido a la presencia de limoneno, linalol y  $\alpha$ -pineno identificados en concordancia con datos bibliográficos.
- La tintura y la infusión de *S. lentiscifolius* mostraron actividad ansiolítica en el test de supresión del alimento, los cuales podrían estar relacionados con la presencia de rutina en dichos extractos.
- Los tres extractos mostraron un efecto antidepresivo similar a la clomipramina en el test de suspensión de cola en ratones. Mientras que en *SchT* y *SchW* este efecto podría estar asociado, al menos en parte, a la presencia de rutina, en el aceite esencial el efecto antidepresivo podría deberse a la presencia de limoneno y alfa- pineno. Estos resultados

están de acuerdo con lo encontrado por otros autores en la evaluación de los componentes identificados en cada una de las preparaciones.

# **7.PUBLICACIONES**



Parte de los resultados de las investigaciones llevadas a cabo para la realización de esta Tesis fueron presentados en los siguientes Congresos y Reuniones Científicas:

- “Actividad antiespasmódica y composición química del Aceite Esencial de *Schinus lentiscifolius Marchand* (Anacardiaceae)” Catalina Vanegas Andrade, Maria E. del Valle, Alicia E. Consolini, Paola Di Leo Lira, Daiana Retta , Arnaldo L. Bandoni, Catalina M. van Baren. 9° Simposio Brasileiro de Óleos Essenciais. Brasilia, Brasil. 2017.
- “Análisis Fitoquímico y cromatográfico de flavonoides y terpenos en *Schinus lentiscifolius Marchand* (Anacardiaceae)” Del Valle M.E; Vanegas C; Manteiga J.; Barrios O; Prieto J.;Ruiz E; Rosella M. A. 23° Congreso Farmacéutico Argentino. Bariloche, Argentina, 2017.
- “Efectos sedante y antidepresivo de extractos de *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae)” Vanegas C., Ragone MI, Consolini AE. 24° Congreso Farmacéutico Argentino. Mendoza, Argentina, 2018
- “Morfo-anatomía foliar de *Schinus lentiscifolius* March (Anacardiaceae)” Ragone M., Vanegas C. & Colares M.1° Reunión Conjunta: 5° Reunión Internacional del Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 50° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Ciudad de La Punta, San Luis, Argentina, Noviembre 2018
- “Efectos antiespasmódicos intestinal, vesical y uterino de la tintura de *Schinus lentiscifolius March* en ratas”. Ragone M, Vanegas C., Consolini A. 1° Reunión Conjunta: 5° Reunión Internacional del Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 50° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE). Ciudad de La Punta, San Luis, Argentina, Noviembre 2018.

- “Efectos sedante y antidepresivo del aceite esencial de *Schinus lentiscifolius* March (Anacardiaceae)” Vanegas Catalina, Ragone M. Inés, Colares Marta. VI Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus aceites esenciales. II Jornadas Nacionales de Plantas Nativas Medicinales. Buenos Aires, Argentina, 2018.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

Abrams, P., Cardozo, L., Fall, M., Griffiths, D., Rosier, P. & Ulmsten, U.(2003) The standardisation of terminology in lower urinary tract function: report from the standardisation sub-committee of the International Continence Society. *Urology*. **61**:37-49.

Agostini-Costa. T. (2018). Bioactive compounds and health benefits of some palm species traditionally used in Africa and the Americas. *Journal of Ethnopharmacology*, **224**: 202-229.

Aguirre-Hernández, E., González-Trujano, M., Martínez, A., Moreno, J., Kite, G., Terrazas, T., y Soto, M. (2010). HPLC/MS analysis and anxiolytic-like effect of quercetin and kaempferol flavonoids from *Tilia americana* var. *mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*, **127** (1): 91-97.

Alba, A., Bonilla, P. & Arroyo, J. (2009). Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Shcinus molle* L "Molle" en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. *Ciencia e investigacion*. **12** (1):29-36.

Alonso, J. & Desmarchelier, D. (2005). Plantas Medicinales Autóctonas de la Argentina. Ed. L.O.L.A. (Literature of Latin America). Buenos Aires.

Amos, S., Okwuasaba, F., Gamaniel, K., Akah, P., & Wambebe, C. (1998). Inhibitory effects of the aqueous extract of *Pavetta crassipes* leaves on gastrointestinal and uterine smooth muscle preparations isolated from rabbits, guinea pigs and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **61**(3): 209-213.

Andersson, K. (2003). Storage and voiding symptoms: pathophysiologic aspects. *Urology*, **62**(2): 3-10.

Andersson, K. & Arner, A.(2004) Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* **84**(3):935-86

Atti dos Santos, A. & Rossato, M. (2005). Caracterizacáo química de *Schinus molle* L, do Rio Grande do Sul Brasil. *V Reunion de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica y I Congreso de Fitoterápicos del Mercosur*.

Bafor, E., Omoghai, E. & Ozolua, R. (2011). Oxytocin inhibiting effect of the aqueous leaf extract of *Ficus exasperata* (Moraceae) on the isolated rat uterus. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, **68**(4):541-547.

Barboza, G., Cantero, J. J., Nuñez, C. & Ariza Espinar, L. (2006). Flora medicinal de la provincia de Córdoba (Argentina). Museo botánico de Córdoba. Córdoba, Argentina

Barrachina, M. & Bello, R. (1997). Analgesic and Central Depressor Effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. *Phytotherapy Research*. **11**(4):317-319.

Becker, A., Felgentreff, F., Schröder, H., Meier, B., Brattström, A. (2014).The anxiolytic effects of a Valerian extract is based on valerenic acid. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **14**: 267.

Bello, R. (1996). Effects on arterial blood pressure of the methanol and dichloromethanol extracts from *Schinus molle* L. in Rats. *Phytotherapy Research*, **10**: 634-635.

Bello, R., Beltran, B. & Moreno, L. (1998). In vitro pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. *Phytotherapy Research*, **12**: 523-525.

Bendaoud, H. & Romdhane, M. (2010). Chemical composition and anticancer and antioxidant activities of *Schinus molle* L. and *Schinus terebinthifolius* Raddi berries essential oils. *Journal of Food Science*, **75** (6): 467-472.

Blanco, M., Coladera, G.V., Bandoni, A. & Ringuélet, J. C. (2013). Antiespasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, **149** (3): 803-809.

Blanco, M., Coladera, G., Van Baren, C., Bandoni, A., Ringuélet, J., & Consolini, A. (2013). Antiespasmodic effects and composition of the essential oils from two South American chemotypes of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*, **149** (3): 803-809.

Bodnoff, S., Suranyi-Cadotte, B., Quirion, R. & Meanev, M. (1987). Postnatal handling reduces novelty-induced fear and increases [3H]flunitrazepam binding in rat brain. *European Journal of Pharmacology*. **144**(1): 105-107.

Boelcke, O. (1992). *Plantas vasculares de la Argentina (nativas y exóticas)*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.

Boniol, T. & Dannon, P. (2001). The safety of herbal medicines in the psychiatric practice. *Harefuah*, **140**(8), 780-783.

Browner, O. d. (1985). Chemical bases for medicinal plant use in Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*. **13** (1): 57-88.

Bruneton J. 1995. *Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants*. English Translation by Hatton, C. K., Lavoisier Publishing, Paris.

Brunton, L., Chabner, B. & Knollmann, B. (2011). *Goodman & Gilman. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Ed. McGraw-Hill Interamericana.

Cabral, L. E. (2010). Biotaxonomía de Spermatófitas. Diversidad Vegetal. Corrientes, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de ciencias Exactas, Naturales y Agrimensura.

Campos-Navarro, Z. (1997). *Nosotros los Curanderos*. Nueva Imagen. Mexico.

Cantero, J. J, Barboza, G.E, Schiarini, F. & Ariza Espinar, L.(2015). *Plantas de Famatina*. Academia Nacional de Ciencias & Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.

Cardenas, J. & Navarro, J. (2002). Modelos animales de ansiedad incondicionada. *Psiquitría Biológica*. **9**(1): 18-32.

Cartaya, O. & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, **22**(2): 5-14.

Castillo, E. & Martinez, I. (2016). Manual de Fitoterapia. Elsevier.

Cavalher-Machado, S; Cruz Rosas, E; (2008). The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. *International Immunopharmacology*, **8** (11): 1552-1560.

Chemat, R., Thierry, B., Mico, J., Steru, L. & Simon, P. (1986). Adaptation of the tail suspension test to the rat. *Journal of Pharmacology*. **17**(3): 348-350.

Chien, E., Saunders, T. & Phillippe, M. (1966). The mechanisms underlying Bay K 8644-stimulated phasic myometrial contractions. *Journal of the society for gynecologic investigation*. **3**: 106-112.

Choleris, E., Thomas, A., Kavaliers, M. & Potterat, O. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **25** (3):235-260.

Chua, H., Christensen, E., Hoestgaard Jensen, K., Hartiadi, L., Ramzan, I., Jensen A., Absalom, N. & Chebib, M. (2016). Kavain, the Major Constituent of the Anxiolytic Kava Extract, Potentiates GABAA Receptors: Functional Characteristics and Molecular Mechanism. *PLoS One*. **11**(6):e0157700.

Consolini, A., Ragone, M. Tambissi, A., Paura, A. (2007). Estudio Observacional del Consumo de Plantas Medicinales en La Provincia de Buenos Aires, Argentina, en el Periodo Diciembre de 2004-Noviembre de 2005 *Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)*. **26**(6): 924-936.

Consolini, A., Berardi, M. R. & Volonté, M. (2011). Antiespasmodic effects of *Aloysia polystachya* and *A.gratissima* tinctures and extracts are due non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetilcholine and calcium. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **21** (5): 889-900.

Consolini, A. & Ragone, M. (2017) *Farmacodinamia general e interacciones medicamentosas: Mecanismos de acción de fármacos y metodologías de estudio experimental*. Editorial de la Universidad de La Plata. La Plata



D'ambrogio de Argüeso, A. (1986). Manual de Técnicas en histología vegetal. Hemisferio Sur. Buenos Aires:

Dambros, M., de Jongh, R., van Koeveringe, G., van Deutekom, M., De Mey, J. & Palma, P. (2005). 4 Multiple-signaling pathways are involved in the inhibitory effects of galangin on urinary bladdercontractility. *Neurourology Urodynamics*, **24**(4): 369-373.

Darios E. S., Seitz B. & Watts S. W. (2012). Smooth muscle pharmacology in the isolated virgin and pregnant rat uterus and cervix. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **341**: 587-596.

Dias, M. Campos, A., Cechinel Filho, V., Yunes, R. & Calixto, J.(1995) Analysis of the mechanisms underlying the contractile response induced by the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus urinaria* in the guinea-pig urinary bladder in-vitro. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **47**(10):846-51.

Dimitri, M. (1988). Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardineria.ACME S.A.C.I. Buenos Aires:

do Vale, T., Furtado, E., Santos, J. & Viana, G. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) n.e. Brown. *Phytomedicine*. **9**(8): 709-714.

Doleski, P., Ferreira, C., Brondani, J. & Palermo, M. (2015). Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Schinus molle* L. *Revista Cubana de Farmacia*, **49**(1): 132-143.

Dominguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa S.A. México D.F.

Emendörfer, F., Emendörfer, F., Bellato, F., Noldin, V., Cechinel, V., Yunes, R., Delle Monache, F. & Cardozo, A. (2005) Antispasmodic activity of fractions and cynaropicrin from *Cynara scolymus* on guinea-pig ileum. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **28**(5):902-4.

Feitosa, J. (2006). Valor de uso e estrutura da lenhosa as margens do riacho do Navio. *Acta Botanica Brasileria*. **20** (1): 125-134.

Ferreira Pires, M., Pereira, M.P., de Castro, E., Barbosa, S. & Pereira, F. (2015). Micromorfometria foliar de *Schinus molle* L. (anarcadiaceae) em diferentes alturas na copa. *CERNE*. **21** (1): 17-25

Foster, H., Niklas, H. & Lutz, S. (1980). Antiespasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Medica*. **40** (4):309-319.

Fridman, G. & Filinger, E. (2003) Farmacia psiquiátrica: Atención farmacéutica en pacientes con trastornos psiquiátricos. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **22**(4): 351-354

Fürer, K., Fberli, D., Betschart, C., Brenneinsen, R., De Miere, M. & Hamburger, M. (2015). Inhibition of porcine detrusor contractility by the flavonoid fraction of *Bryophyllum pinnatum*--a potential phytotherapeutic drug for the treatment of the overactive bladder syndrome. *Phytomedicine*. **22**(1): 158-164.

Gal, B. (2007). *Bases de la Fisiologia*. Ed. Tebar. Madrid.

Gazola, A., Costa, G., Zucolotto, S., Castellanos, L., Ramos, F., de Lima, T. & Schenkel, E. (2018) The sedative activity of flavonoids from *Passiflora quadrangularis* is mediated through the GABAergic pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **100**:388-393.

Gehrke, I. T. (2013). Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **148**: 486-491.

Gholamnezhad, Z., Ghorani, V., Saadat, S., Shakeri, F. & Boskabady, M. (2018) The effects of medicinal plants on muscarinic receptors in various types of smooth muscle. *Phytotherapy Research*. **2018**: 1-24

Gostner, J., Ganzera, M., Becker, K., Geisler, S., Schroecksadel, S., Uberal, F., Schennach, H & Fuchs, D. (2014). Lavender oil suppresses indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human PBMC. *BMC Complement Alternative Medicine*, **14**: 503.

Grundmann, O., Wang, J., McGregor, G. & Butterweck, V. (2008). Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. *Planta Medica*. **74**(15):1769-1773.

Gundidza, M. (1993). Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. *Central African Journal of Medicine*, **11**: 231-234.

Hamada, K., Sasaki, Y., Taniguchi, N., Fukui, H., Ukai, Y., Yashikuni, Y. & Kimura, K. (1997). Anticholinergic and calcium Antagonistic Activities of NS-21 contribute to the inhibition of rat urinary bladder contractions. *General Pharmacology*. **29** (5): 771-778.

Hammad, H. & Abdalla, S. (1997). Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *General Pharmacology*. **28**(5): 767-771.

Hernandez León, A., González-rujano, M. & Fernandez Guasti, A. (2017). The anxiolytic-like effect of rutin in rats involves GABAA receptors in the basolateral amygdal. *Behavior Pharmacology*, **28**(4): 303-312.

Herrera Arellano, A., Luna Villegas, G., Cuevas Uriostegui, M., Alvarez L, Vargas Pineda, G., Zamilpa Alvarez, A. & Tortoriello, J.(2001).Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of Valeriana edulis standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Médica* **67**(8):695-699.

Hewlett, B., & Cavallin Sforza, L. (1986). Cultural transmission among Aka Pigmies. *American Anthropology*. **88**: 922-934.

Heywood, V. (1985). *Las plantas con Flores*. Reverté. España.

Hilbert, N., Higuera, N. & Kristensen, M. (2010). La medicina herbolaria en un contexto urbano. Estudio de caso en un barrio de la ciudad de Tandil, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. **9**(3):177-190.

Holmgren, P., Holmgren, L. & Barnett. (1990). *Index Herbarium. Part 1: the herbaria of the world*. New York Botanical Garden. New York.

Jick, S., Dean, A, & Jick, H. (1995). Antidepressants and suicide. *BMJ*, **310**: 215-218.

Johnson, J., Edwards, M., Davies, H., Newman, D., Holden, W. & Jenkins, R. (2017). Ethanol Stimulates Locomotion via a G $\alpha$ s-Signaling Pathway in IL2 Neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **207**(3): 1023-1039.

Jung, Y., Hong, S., Ma, S., Hwang, J., Kim, J. & Lee, J. (2014). Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression and anxiety in mice. *Biomolecules & Therapeutics*. **22**(5): 453-459.

Karamenderes, C. & Apaydin, S. (2003). Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. Schwarz) Bassler on the rat isolated duodenum. *Journal of Ethnopharmacology* **84**: 175-179

Kenakin, T. (1984). The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacological Reviews*, **36** (3):165-222.

Kenakin, T. (2014). *A Pharmacology Primer*. Elsevier.

Kim, B., Ozaki, H., Hori, M., Takahasi, K., & Karaki, H. (1998). Increased contractility of rat uterine smooth muscle at the end of pregnancy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **121**(2): 165-173.

Kitchen, I. (1984). *Textbook of in Vitro Practical Pharmacology*. Blackwell Scientific Publications.

Kong, Y., Wang, R., Ma, Y., Song, S., Liu, J. & Hu, W. (2017). Inhalation of Roman chamomile essential oil attenuates depressive-like behaviors in Wistar Kyoto rats. *Science China Life*, **60**(6): 647-655.

Kühnau, J. (1976). The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics*. **24**: 117-190.

Lanuzza, F., Occhiuto, F., Monforte, M., Tripodo, M., D'Angelo, V., & Galati, E. (2017). Antioxidant Phytochemicals of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladodes with Potential Anti-spasmodic Activity. *Pharmacognosy Magazine*, **13**(3): 424-429.

Lee, S., Chae, M., Lee, B., Kim, Y., Choi, J. & Lee, S. (2016). Urinary Bladder-Relaxant Effect of Kurarinone Depending on Potentiation of Large-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels. *Molecular Pharmacology*. **90**(2): 140-150.

Livingstone, E., & Livingstone, S. (1970). Pharmacological experiments on isolated preparations. Department of Pharmacology, University of Edinburgh. Edinburgh.

Luckner, M. (1990). *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals*. Springer-Verlag. Berlin.

Macedo, C., L, V., de Correia, A., Martins, I., de Lira, D. & de O Santos, B. (2014). Mechanisms underlying vasorelaxation induced in rat aorta by galetin 3,6-dimethyl ether, a flavonoid from *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. *Molecules*, **19**(12): 19678-19695.

Machado, D., Bettio, L., Cunha, M., Santos, A., Pizzolatti, M., Brighente, I & Rodrigues, A. (2008). Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *European Journal of Pharmacology*. **587**: 163-168.

Macias-Peacock, B., Pérez, L., Jackson, M., & Suarez, F. (2009). Consumo de plantas medicinales por mujeres embarazadas. *Revista Médica Mexicana*, **47** (3): 331-334.

Markham, K. (1982). *Techniques of flavonoid identificaton*. Academic press. London.

Martínez, A., Ruiz Cerda, J., Gomez, P., Ramirez B., Delgado O. & Rebollo, P. Prevalence of urinary incontinence and hyperactive bladder in the Spanish population: results of the EPICC study. *Actas Urologicas Españolas* **33**:159-66.

Martínez-Agullóa, E., Ruiz-Cerdáa, J.L., Arlandisa, S., Rebollob, P. & Pérezc, M. (2010) Análisis del síndrome de vejiga hiperactiva y de la incontinencia urinaria en mujeres laboralmente activas entre 25-64 años. *Actas Urologicas Españolas* **34** (7): 618-624

Mawosa, T., Tagwireyi, D., & Nhachi, C. (2015). Spasmogenic effects of *Sclerocarya birrea* stem bark aqueous extract on rat isolated uterine horns. *Journal of Ethnopharmacolog*. **22**: 129-135.

Metcalfe, C., & Chalk, L. (1950). *Anatomy of the Dicotyledons*. Claredon Press. Oxford:

Mineur, Y., Somenzi, O., & Picciotto, M. (2007). Cytisine, a partial agonist of high-affinity nicotinic acetylcholine receptors, has antidepressant-like properties in male C57BL/6J mice. *Neuropharmacology*, **52**: 1256-1262.

Ministerio de Salud y Acción Social. (1993). *Reglamentacion para el registro y comercializacion de Hierbas Medicinales*. Boletin Farmacéutico Bonaerense. Buenos Aires.

Moncrieff, J. (2001). Are antidepressants overrated? A review of methodological problems in antidepressant trials. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, **189**(5): 288-295.

Monterrosa, A. (2001). Dismenorrea primaria: vision actual. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. **52** (4): 342-354.

Morón, F. (2010). ¿Son importantes las plantas medicinales en la actualidad? *Revista Cubana Plantas Medicinales*, **15** (2): 1-2.

Muñoz, J. d. (1999). "Anacardiaceae", en "Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II". F.O. Zuloaga & O. Morrone Eds.

Neamati, A., Chaman, F., Hosseini M. & Boskabady M. (2014) The effects of *Valeriana officinalis* L. hydro-alcoholic extract on depression like behavior in ovalbumin sensitized rats. *Journal of Pharmacy & Bioallied Science*. **6**(2):97-103.7406.129174.

Nielsen-Kudsk, J. (1996). Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. Studies on isolated airways and arteries. *Danish Medical Bulletin*. **43**(5): 429-447.

Nunes-Neto, P., Peixoto-Sobrinho, T., da Silva Jr, E., Leopoldina da Silva, J., Pupo, A. & Araujo, A., (2017). The Effect of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) Bark Extract on Histamine-Induced Paw Edema and Ileum Smooth Muscle Contraction. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2017**: 1-10.

Francis Oliveiraa, J., Ponte, B., Barbosa, A.P, Moreno, A., Veríssimo, L., Gomes, M., Pelosi, G.G, Britto, L.R. Garcia, G., & Moreira E.G. (2013). Fluoxetine exposure



during pregnancy and lactation: Effects on acute stress response behavior in the novelty-suppressed feeding are age and gender-dependent in rats. *Behavioural Brain Research*, **252**: 195-203.

Ohl, F. (2005). Animal models of anxiety. *Handbook of Experimental Pharmacology*. **169**: 35-69.

Pannetta, F. & Mckee, J. (1997). Recruitment of the invasive ornamental, *Schinus terebinthifolius*, is dependent upon frugivores. *Austral Ecology*. **22**(4): 432-438.

Pawlowski, Â., Kaltchuk-Santos, E., Brasi, M., E.B, C., Zini, C., & Soares, G. (2013). Chemical composition of *Schinus lentiscifolius* March. essential oil and its phytotoxic and cytotoxic effects on lettuce and onion. *South African Journal of Botany*, **88**: 198-203.

Pennefather, J., Gillman, T. & Mitchelson, F. (1994). Muscarinic receptors in rat uterus. *European Journal of Pharmacology*. **262**(3): 297-300.

Perrota, V., & Arambarri, A. (2004). *Schinus longifolia* var. *longifolia* (Anacardiaceae): Anatomía Foliar y Caulinar. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **23**(2): 142-147.

Piccinelli, A.C., Alencar Santos, J., Castelon Konkiewitz, E., Oesterreich, S., Nazari Formagio, A., Croda, J., Ziff, E. & Leite Kassuya, C. (2015) Antihyperalgesic and -antidepressive actions of (R)-(+)-Limonene,  $\alpha$ -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutritional Neuroscience*. **18** (5): 217-224.

Rabbani, M., Sajjadi, S., & Vaezi, A. (2015). Evaluation of anxiolytic and sedative effect of essential oil and hydroalcoholic extract of *Ocimum basilicum* L. and chemical composition of its essential oil. *Research in Pharmaceutical Science*. **10**(6): 535-543.

Ragone, M., Sella, M. C., Volonté, M., & Consolini, A. (2007). The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora* Palau (South American cedron) in partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*, **113** (2): 258-266.

Ragone, M., Sella, A., Pastore, & Consolini, A. (2010). Sedative and cardiovascular effects of *Aloysia citriodora* Palau on mice and rats. *Latin American Journal of Pharmacy* **29** (1): 79-86.

Rang, H. & Dale, M. (2008). *Farmacología*. Elsevier. Barcelona

Rodrigues, E. (2006). Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. *Phytotherapy*, **20** (5): 378-391.

Rondina, R., Bandoni, A. & Coussio, J. JD (Ed). (1999) *Plantas Silvestres Argentinas con Reconocidas Propiedades Medicinales o Tóxicas (Base de datos en soporte óptico)*. IQUIMEFA, CITED-OEA. Buenos Aires.

Rossetti, V. (2014). *Efectos morfológicos, bioquímicos y cardiovasculares del aceite esencial y de terpenos hidrocarburos de Schinus areira (Anacardiaceae) en un modelo experimental en animales*. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.

Rossini, C. (1996). Essential Oils from Leaves of *Schinus molle* and *S. lentiscifolius* of Uruguayan Origin. *Journal of Essential Oil Research*. **4**(23): 71-73.

Ruiz, A. Mercado, M. I., Guantay, M. E. & Ponessa, G. I. (2009) Morfoanatomía y arquitectura foliar de *Schinus areira* (Anacardiaceae). *Lilloa* **46** (1–2): 137–146

Saldivia, M. & Bandoni, A. (1987). Plantas Medicinales: Antecedentes para su Normalizacion en Argentina. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. **6** (3): 195-206

Salgueiro, J., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M., Izquierdo, I, & Medina, J. (1997). Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacology. Biochemistry. Behavior*, **58** (4): 887-891.

Samuels, B., & Hen, R. (2011). Mood and anxiety related phenotypes in mice. *Neuromethods Book*. **63**: 107-121.

Saqib, F. & Janhaz, K. (2016). Rationalizing ethnopharmacological uses of *Alternanthera sessilis*: A folk medicinal plant of Pakistan to manage diarrhea, asthma and hypertension. *Journal of Ethnopharmacology*. **182**: 110-121.

Sarris, J., Scholey, A., Schweitzer, I., Bousman, C., Laporte, E., Murray, G. & Stough, C. (2012) The acute effects of kava and oxazepam on anxiety, mood, neurocognition; and genetic correlates: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Human Psychopharmacol*. **27**(3):262-269.

Satou, T., Kasuya, H., Maeda, K., & Koile, K. (2014). Daily inhalation of  $\alpha$ -pinene in mice: effects on behavior and organ accumulation. *Phytotherapy. Research* **28**: 1284-1287.

Scarpa, G. (2009). Etnobotánica médica de los indígenas chorote y su comparación con la de los criollos del Chaco semiárido (Argentina). *Darwiniana* **47** (1): 92-107

Shi, Y., Wu, D., Sun, Z., Yang, J., Chai, H. & Tang, L. (2012). Analgesic and uterine relaxant effects of isoliquiritigenin, a flavone from *Glycyrrhiza glabra*. *Phytotherapy Research*, **26**(9), 1410-1417.

Shirole, R., Shirole, N., & Saraf, M. (2015). In vitro relaxant and spasmolytic effects of essential oil of *Pistacia integerrima* Stewart ex Brandis Galls. *Journal of Ethnopharmacology* **20**: 168

Silva, A., Silva, T., & Franco, E. (2010). Antibacterial activity, chemical composition and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*). *Brazilian Journal of Microbiology* **41**(1): 158-163.

Soloff, M., Alexandrova, M., & Fernstrom, M. (1979). Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation? *Science* **204**(4399): 1313-1315.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* **85** (3):367-370.

Takeda, H., Tsuji, M., Miyamoto, J., Masuya, J. I., & Matsumiya, T. (2003). Caffeic acid produces antidepressive- and/or anxiolytic-like effects through indirect modulation of the alpha 1A-adrenoceptor system in mice. *Neuroreport* **14**: 1066-1070.

Tolivia,A. (2014) Prospección biotecnológica de cultivos de *Euglena gracilis* (*Euglenozoa*) Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires)

van Andel T., de Boer H., Barnes J. & Vandebroek, I., (2014). Medicinal plants used for menstrual disorders in Latin America, the Caribbean, sub-Saharan Africa, South and Southeast Asia and their uterine properties: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **155**(2):992-1000.

Vargas Flores da Silva, L., Veras Mourau, R. & Manimala, J. (2018). The essential oil of *Lippia alba* and its components affect *Drosophila* behavior and synaptic physiology. *Journal of Experimental Biology*, **221** (14): jeb1176909

Ventura, R., Rivero, O., Gomez, C., & González, M. (2011). Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology*, **137**(3): 1528-1532.

Viesca-Treviño, C. (1991). *Traditional herbal medicines around the globe: Modern perspectives. Mexican Traditional Medicine and its Pharmacological Resources*. Swiss Pharma. Seoul.

Vissiennon, C., Nieber, K., Kelber, O., & Butterwerck, V. (2012). Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonolskaempferol, quercetin and myricetin--are they prodrugs? *The Journal of Nutritional Biochemistry* **23**(7): 733-740.

Wagner, H. & Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. 2<sup>nd</sup> Ed. Spring-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

World Health Organization (1991) *Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines*. Geneva

Wang, T., Zhou, Z., Wang, S., Ji, X., Wu, B., Sun, L., Wen, J. , Kang, D., Lee, H., Cho, K., & Jin, S. (2017). Mechanisms of vasorelaxation induced by total flavonoids of *Euphorbia humifusa* in rat aorta. *Journal of Physiology and Pharmacology* **68**(4): 619-628.

Willner, P. (1991). *Animal models of anxiety: Behavioral models in psychopharmacology* Cambridge University Press. London.

Zoila, C. (1980). Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* **2** (1):37-51.

Zuloaga, F., Morrone, O. & Belgrano, M. (2008) *Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur*. Monographs in Systematic Botany 107. Missouri Botanical Garden Press. St Louis.

