

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN Y ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA DE
PRINCIPIOS DE ESPECIES ANTIINFLAMATORIAS

ZENG YUEQIN

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 8 de Setembre de 2006 davant un tribunal format per:

- D. Francisco Zaragoza García
- D. Luis A. Estañ Yago
- D. José María Prieto García
- D^a. María Victoria Toro Sainz
- D^a. María del Carmen Recio Iglesias

Va ser dirigida per:
D. José Luis Ríos Cañavate

©Copyright: Servei de Publicacions
Zeng Yueqin

Depòsit legal:
I.S.B.N.:978-84-370-6676-9
Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

**Identificación y actividad farmacológica de
principios de especies antiinflamatorias**

**Tesis doctoral
presentada por**

**Zeng Yueqin
Valencia, 2006**

José Luis Ríos Cañavate, Profesor Titular de la Universitat de València,

CERTIFICA

Que el trabajo presentado por Zeng Yueqin, titulado “Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias”, ha sido realizado en la Unidad Docente de Farmacognosia y Farmacodinamia del Departament de Farmacologia, bajo mi dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizo la presentación de esta Tesis Doctoral, para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

En Burjassot a uno de marzo de dos mil seis

José Luis Ríos Cañavate

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI) y por el Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (SAF2002-00723)

Quizás esta parte sea especialmente complicada por lo difícil que resulta explicar en palabras lo que uno siente.

En primer lugar querría destacar el cariño que he recibido en este país y que me ha ayudado a adaptarme y a mejorar. España me ha enseñado valores, me ha mostrado un camino por el que dirigir mi vida y unos excelentes compañeros de viaje. Siempre es difícil sentirse en casa para alguien que nació a miles de kilómetros de estas tierras, pero es muy bonito decir que cada día siento que mi hogar está más cerca que lejos.

Desearía mostrar mi agradecimiento y admiración a mi director, José Luis Ríos, ya que sin su tutela y guía estas páginas habrían resultado vacías. Gracias por sus sabios consejos, por su amistad, por su entrega, por su dedicación y comprensión, por enseñar cosas que no aparecen en ningún libro que nunca se haya escrito. Ojalá el tiempo nos acerque nuevos proyectos e ilusiones que podamos compartir.

A María del Carmen Recio, por que con su duro trabajo y ayuda desinteresada despertó en mí la voluntad de querer aprender siempre un poquito más, superarme y convertirme en mejor persona.

A Rosa M^a Giner y Salvador Máñez, que con su amabilidad y su capacidad de enseñar me han ilusionado con la posibilidad de que en un futuro pueda saldar mi deuda, y ofrecer a un alumno todo lo que me han dado ellos.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, Ana, José Miguel, Victoriano, Luis, José María, Guillermo Schinella, Isabel, Elisa, Nadia, Nouredine,... por enseñarme sus palabras, costumbres y tradiciones, que ahora son también un poco más mías, y hacer que el mundo que

ahora conozco se extienda por cada uno de los continentes, y sobre todo, por enorgullecerme de poder llamarles amigos.

Al cuerpo técnico y administrativo que siempre han colaborado conmigo, esforzándose por estar a mi lado y facilitar mi trabajo con su esfuerzo.

Y por supuesto mi familia, mis padres en China y mis abuelos en EEUU, que han conseguido que el cariño no se pierda ni disminuya con los kilómetros. Mi abuelo, un intelectual tradicional de China, con sus enseñanzas sobre la vida en un país que no se conoce, y sus deseos de estar siempre cerca de mí, de ver lo que yo he visto, y conocer a quien he conocido. Un abuelo, una abuela y unos padres que me han abierto los ojos para que siempre quiera honrarles y hacerles sentir orgullosos.

POR TODO, A TODOS GRACIAS

Burjassot, Verano de 2006

ÍNDICE

I. Introducción	1
II. Revisión bibliográfica	5
II.1. <i>Schinus molle</i>	5
II.1.1. Botánica.....	5
II.1.2. Uso popular	6
II.1.3. Composición química.....	6
II.1.4. Propiedades farmacológicas	7
II.2. <i>Lysimachia foenum-graecum</i>	10
II.2.1. Botánica	10
II.2.2. Uso popular	11
II.2.3. Composición química.....	11
II.2.4. Propiedades farmacológicas	13
II.3. <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	14
II.3.1. Botánica.....	14
II.3.2. Uso popular	15
II.3.3. Composición química.....	15
II.3.4. Propiedades farmacológicas	16
A. Propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias.....	17
B. Propiedades cicatrizantes y antiinflamatorias	18
C. Propiedades anticancerosas	19
D. Propiedades cardiovasculares	20
E. Toxicidad	20
F. Farmacocinética	21
II.4. <i>Forsythia suspensa</i>	21
II.4.1. Botánica.....	21
II.4.2. Uso popular	22
II.4.3. Composición química.....	23
II.4.4. Propiedades farmacológicas	24
II.5. <i>Isodon xerophilus</i>	26
II.5.1. Botánica.....	26
II.5.2. Uso popular	27
II.5.3. Composición química.....	27
II.5.4. Propiedades farmacológicas	28
II.6. Eicosanoides e inflamación.....	29
II.6.1. Introducción	29
II.6.2. Lipoxigenasas	30
II.6.3. Ciclooxygenasas.....	32
II.6.4. Detección de metabolitos del ácido araquidónico	34

II.7. Actividad antioxidante	35
II.7.1. Introducción	35
II.7.2. Capacidad antioxidante total	36
A. Reacción con el radical DPPH	37
B. Reacción con el radical ABTS	37
C. Medida de la capacidad reductora. Método FRAP	38
II.7.3. Peroxidación lipídica	38
II.7.4. Especies reactivas de oxígeno: radical superóxido	40
A. Introducción	40
B. El radical superóxido	41
II.8. Inflamación: protocolos experimentales <i>in vivo</i>	42
II.8.1. Introducción	42
II.8.2. Edema agudo en oreja de ratón inducido por AA	43
II.8.3. Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA	44
II.8.4. Inflamación en oreja de ratón inducida por aplicación repetida de TPA.....	46
II.8.5. Hipersensibilidad retardada en ratón inducida por oxazolona.....	47
II.8.6. Otros protocolos de hipersensibilidad retardada.....	48
II.8.7. Edema agudo inducido por carragenina en pata de ratón	48
II.8.8. Edema agudo inducido por PLA ₂ en pata de ratón	49
II.8.9. Edema agudo inducido por 5-HT en pata de ratón	51
II.8.10. Otros protocolos experimentales	51
III. Material y Métodos	53
III.1. Material vegetal.....	53
III.1.1. <i>Schinus molle</i>	53
III.1.2. <i>Lysimachia foenum-graecum</i>	53
III.1.3. <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	54
III.1.4. <i>Forsythia suspensa</i>	54
III.1.5. <i>Isodon xerophilus</i>	54
III.2. Molturación	54
III.3. Extracción	54
III.4. Aislamiento e identificación	55
III.4.1. Cromatografía en capa fina	55
A. Material	55
B. Reactivos	55
C. Métodos.....	56
III.4.2. Cromatografía en columna	57
A. Material	57
B. Reactivos	57
C. Métodos.....	58

III.4.3. Elucidación estructural	60
A. Material	60
B. Reactivos	60
C. Métodos	60
III.5. Pruebas farmacológicas <i>in vivo</i> y <i>ex vivo</i>	63
III.5.1. Animales	63
III.5.2. Material	63
A. General	63
B. Histología	64
III.5.3. Reactivos	64
A. Pruebas <i>in vivo</i>	64
B. Mieloperoxidasa	65
C. Histología	65
III.5.4. Métodos	66
A. Edema agudo inducido por AA en oreja de ratón	66
B. Edema agudo inducido por TPA en oreja de ratón	67
C. Inflamación en oreja de ratón inducida por aplicación repetida de TPA	68
D. Edema plantar inducido por PLA ₂	69
E. Edema plantar inducido por carragenina	70
F. Determinación de la actividad MPO	72
G. Estudio histológico	74
III.6. Pruebas farmacológicas <i>in vitro</i>	74
III.6.1. Animales	74
III.6.2. Material	75
III.6.3. Reactivos	75
A. Tampones	77
B. Disoluciones	78
III.6.4. Métodos	79
A. Obtención de neutrófilos peritoneales de rata	79
B. Obtención de plaquetas y leucocitos humanos	80
C. Recuento de leucocitos y plaquetas	81
D. Ensayo de viabilidad celular	81
E. Ensayo de la actividad 5-LOX en PMNs de rata	83
F. Ensayo de la actividad COX-1 en plaquetas humanas	84
G. Extracción de eicosanoides en fase sólida	85
H. Análisis de LTB ₄ y 12-HHTrE por HPLC	86
I. Cuantificación de LTB ₄ y 12-HHTrE	87
J. Ensayo de liberación de elastasa en leucocitos humanos	87
K. Inhibición de la producción de NO en macrófagos (RAW 264.7)	88
L. Inhibición de la liberación de TNF- α e IL-1 β en RAW 264.7	89
III.7. Actividad antioxidante	90
III.7.1. Reacción con el radical DPPH	90
III.7.2. Reacción con el radical ABTS	91
III.7.3. Medida de la capacidad reductora: Método FRAP	92

III.7.4. Peroxidación lipídica en homogenado de cerebro de rata	93
III.7.5. Inhibición de la acción de especies reactivas de oxígeno	96
III.7.6. Efecto quelante sobre el ion ferroso	97
III.7.7. Determinación de fenoles totales	99
III.8. Análisis estadístico.....	99
IV. Resultados	101
IV.1. <i>Schinus molle</i>	101
IV.1.1. Extracción.....	101
IV.1.2. Fraccionamiento	101
IV.1.3. Identificación	102
IV.1.4. Estudio de la actividad antiinflamatoria	106
A. Edema agudo inducido por carragenina en pata de ratón	106
B. Edema agudo inducido por PLA ₂ en pata de ratón.....	107
C. Inflamación auricular inducida por aplicación repetida de TPA	108
D. Viabilidad celular. Ensayo del MTT	111
E. Inhibición de la producción de LTB ₄ en PMN de rata.....	111
IV.1.5. Estudio de la actividad antioxidante	111
IV.2. <i>Lysimachia foenum-graecum</i>	112
IV.2.1. Extracción.....	112
IV.2.2. Fraccionamiento	112
IV.2.3. Identificación	113
IV.2.4. Estudio de la actividad farmacológica	125
A. Estudio de la viabilidad celular	125
B. Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico	125
C. Inhibición de la actividad de la enzima elastasa	125
IV.3. <i>Lithospermum erythrorhizon</i>	126
IV.3.1. Extracción.....	126
IV.3.2. Fraccionamiento	126
IV.3.3. Estudio de la actividad farmacológica	126
A. Actividad antioxidante	126
B. Efecto quelante sobre el ion ferroso	127
C. Equivalencia en fenoles totales	127
D. Actividad antiinflamatoria	128
IV.4. <i>Forsythia suspensa</i>	129
IV.4.1. Extracción.....	129
IV.4.2. Fraccionamiento	129
IV.4.3. Identificación	130
IV.4.4. Estudio de la actividad farmacológica	132
A. Inhibición de la producción de LTB ₄	132
B. Actividad antioxidante	133
IV.5. <i>Isodon xerophilus</i>	133
IV.5.1. Extracción.....	133
IV.5.2. Fraccionamiento	134

IV.5.3. Identificación	135
IV.5.4. Estudio de la actividad farmacológica	139
A. Ensayo de viabilidad celular.....	139
B. Inhibición de producción de NO en macrófagos RAW 264.7	139
C. Inhibición de producción de TNF- α e IL-1 β en RAW 264.7.....	139
V. Discusión	141
VI. Conclusiones	155
VII. Referencias bibliográficas	135

Abreviaturas y símbolos

AA	=	Ácido araquidónico
ABTS	=	2,2'-Azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonato de amonio
AINE	=	Antitinflamatorios no esteroideos
AMPc	=	Adenosina monofosfato cíclica
BHT	=	Butilhidroxitolueno = 2,[6]-Di- <i>tert</i> -butil- <i>p</i> -cresol
BK	=	Bradicinina
BOC	=	<i>N-tert</i> -butilbutoxicarbonil-L-alanina- <i>p</i> -nitrofenil éster
CC	=	Cromatografía en columna
CCF	=	Cromatografía en capa fina
Cf	=	Concentración final
CG	=	Cromatografía de gases
CG-EM	=	Cromatografía de gases-espectroscopía de masas
CI ₅₀	=	Concentración inhibitoria-50
CMI	=	Concentración mínima inhibitoria
ConA	=	Concanavalina A
COX	=	Ciclooxigenasa
DAD	=	Detector de fotodiodos
DAG	=	Diacilglicerol
DEPT	=	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i>
DMF	=	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DNA	=	Ácido desoxiribonucleico
DNCB	=	Dinitroclorobenceno
DNFB	=	Dinitrofluorobenceno
DPP	=	13-Fenilacetato de 12-desoxiforbol
DPPH	=	2,2-Difenil-1-picril hidrazilo
DPT	=	13-Tetradecanoato de 12 -desoxiforbol
EDTA	=	Ácido etilendiaminotetraacético
EIA	=	Enzimoimmunoensayo
ELISA	=	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	=	Espectroscopia de masas
EPP	=	Fenilpropionato de etilo
FAB	=	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FRAP	=	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GOD	=	Glucosa oxidasa
HBSS	=	Solución de Hanks
HETE	=	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HHTrE	=	Ácido hidroxieptadecatrienoico
H ₂ O ₂	=	Peróxido de hidrógeno
5-HPETE	=	Ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico
HPLC	=	Cromatografía líquida de alta resolución
5-HT	=	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
HTAB	=	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
IE	=	Impacto electrónico
IKP	=	Tampón de incubación
<i>i.p.</i>	=	intraperitoneal
LDL	=	Lipoproteínas de baja densidad

LOX	=	Lipoxigenasa
LPS	=	Lipopolisacárido
LT	=	Leucotrieno
LX	=	Lipoxina
MDA	=	Malondialdehido
MN	=	Mononuclear
MPO	=	Mieloperoxidasa
MTT	=	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio
NBT	=	Azul de nitrotetrazolio
NDGA	=	Ácido nordihidroguayarético
NF- κ B	=	Factor nuclear- κ B
O ₂ ^{•-}	=	Radical superóxido
ODC	=	Ornitín-descarboxilasa
[•] OH	=	Radical hidroxilo
PAF	=	Factor activador de plaquetas
PBS	=	Solución salina tamponada
PEG	=	Polietilenglicol
PG	=	Prostaglandina
PKC	=	Proteincinasa C
PLA ₂	=	Fosfolipasa A ₂
PMN	=	Polimorfonuclear
<i>p.o.</i>	=	<i>per os</i>
RIA	=	Radioinmunoensayo
RMN	=	Resonancia magnética nuclear
RNS	=	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	=	Especies reactivas de oxígeno
RP	=	Fase reversa
<i>s.c.</i>	=	subcutáneo
SRBC	=	Eritrocitos de cordero
TBA	=	Ácido tiobarbitúrico
TCA	=	Ácido tricloroacético
TFA	=	Ácido trifluoroacético
TMB	=	Tetrametilbenzidina
TNF- α	=	Factor de necrosis tumoral- α
TPA	=	13-Acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
TPTZ	=	2,4,6-Tripiridil-s-triazina
TRIS	=	2-Amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol
TX	=	Tromboxano
UV	=	Ultravioleta
VLC	=	cromatografía líquida a vacío
XOD	=	Xantina oxidasa

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La presente Tesis Doctoral continúa el estudio previo realizado por parte de nuestro grupo de investigación sobre la actividad antiinflamatoria de especies vegetales empleadas en medicina popular. Parte de nuestro trabajo se centró en el estudio de especies officinales utilizadas en medicina tradicional china y como tal están recogidas en la Farmacopea Oficial de la República Popular China, o bien avaladas por el empleo milenario en patologías relacionadas con procesos inflamatorios cutáneos [Cuéllar et al., 1998; 2001]. Como prolongación de dicho trabajo iniciado en 1992, se planteó realizar una selección de especies utilizadas en medicina popular como antiinflamatorias, particularmente en procesos que afecten a la piel. En esta primera fase se comenzó con la especie *Schinus molle*, árbol originario de Sudamérica pero aclimatado en países tropicales y subtropicales. La selección se realizó en virtud de dos características fundamentales; una, el empleo de los frutos en los países de origen como antiinflamatorios en proceso cutáneos y artríticos [Ruffa et al., 2002]; y una segunda, por su contenido en lanostanoides, grupo fitoquímico que nuestro grupo viene estudiando desde hace algún tiempo y ha permitido llegar a un amplio conocimiento de su potencial farmacológico [Cuéllar et al., 1996; Giner-Larza et al., 2000a,b,c; 2002].

La segunda especie seleccionada ha sido *Lysimachia foenum-graecum*, planta con un importante contenido en saponósidos, grupo fitoquímico en el nuestro grupo de investigación está interesado desde hace más de una década por sus propiedades antiinflamatorias [Recio et al., 1995b; Just et al., 1997; Cuéllar et al., 1997; Giner et al., 2000], y que se utiliza en la

medicina tradicional china por sus propiedades analgésicas y antiinflamatorias [Anónimo, 1993].

En tercer lugar se ha seleccionado la especie *Lithospermum erythrorhizon*, planta empleada en medicina tradicional china por sus propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes. Esta especie tiene gran interés para nuestro grupo debido tanto al potencial farmacológico de la planta, como el de sus principios activos, especialmente shikonina, el cual ha sido estudiado en repetidas ocasiones y cuya actividad ha sido recientemente recopilada en una extensa y excelente revisión [Papageorgiou et al., 1999].

Forsythia suspensa es la especie seleccionada en cuarto lugar debido a su empleo en medicina tradicional china, en cuya farmacopea oficial está recogida para el tratamiento del dolor de garganta e inflamación de la piel [W.H.O., 1989], propiedades que en parte fueron ratificadas experimentalmente en nuestro laboratorio [Cuéllar et al., 1998; Schinella et al., 2002].

Finalmente, se ha elegido la planta *Isodon xerophilus* por ser endémica, y aunque es utilizada popularmente no existen referencias previas sobre su actividad farmacológica. Esta especie es originaria de la provincia de Yunnan en China, lugar de origen de la doctoranda y sobre la que existe un gran interés por parte del Centro de investigación del cual procede, lo que nos ha permitido establecer lazos de unión para un futuro próximo.

El plan de trabajo establecido consiste en la obtención previa del material vegetal mediante los medios adecuados en cada caso, para posteriormente realizar el proceso de extracción y fraccionamiento correspondiente para obtener los extractos que serán objeto de estudio. La selección de los protocolos experimentales específicos para cada especie, y el fraccionamiento de los extractos activos para obtener los

potenciales principios para su posterior estudio farmacológico será la antesala de la identificación de los compuestos aislados, cuando así proceda, utilizando los medios espectroscópicos adecuados. Como punto final de la tesis se plantea el estudio de los efectos farmacológicos de los principios y su posible mecanismo de acción.

Como métodos experimentales *in vivo* se han seleccionado los clásicos modelos de inflamación aguda y crónica en oreja de ratón inducida por el 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) y los modelos de edema agudo en pata de ratón inducido por carragenina y fosfolipasa A₂ (PLA₂). Con estos protocolos se podrá establecer el potencial efecto farmacológico y su posible forma o nivel de actuación. La pluralidad de procesos que intervienen en los modelos *in vivo* dificulta la determinación del mecanismo de acción de los productos aislados, por lo que en algunos casos se han utilizado técnicas *in vitro* con el fin de establecer en algunos casos el nivel de actuación y cuantificar los efectos farmacológicos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. *SCHINUS MOLLE*

II.1.1. BOTÁNICA

Schinus molle L. (Anacardiaceae) o “falso pimentero” es un árbol perennifolio, de 4 m a 8 m de altura, pero puede alcanzar hasta los 15 m, con un diámetro de 25 cm a 35 cm, de copa redondeada y abierta. Hojas compuestas, alternas, de 15 cm a 30 cm de largo, colgantes, con savia lechosa; imparipinnadas, de 15 a 41 folículos, generalmente apareados. Tronco nudoso, ramas flexibles, colgantes y abiertas. Corteza rugosa, fisurada, color pardo oscuro. Flores en panículas axilares en las hojas terminales, de 10 a 15 cm de largo, pequeñas y numerosas, de color amarillento. El fruto es un 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 [Anónimo, 2005a].

Schinus molle es un árbol de origen tropical, originario de la región andina de Sudamérica, principalmente Perú, 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 [Anónimo, 2005a]. Se han identificado 3 especies (*S. molle*, *S. aroeira* y *S. terebinthifolius*), existiendo cierta confusión entre ellas a la hora de cultivarlas, ya que las tres tienen características y propiedades similares.

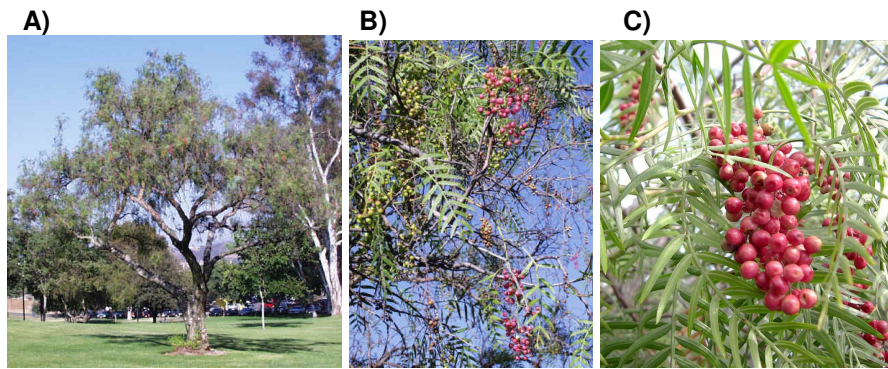


Figura 1. *Schinus molle*: **A)** árbol; **B)** hojas; **C)** frutos

II.1.2. USO POPULAR

Todas las partes del árbol son utilizadas en medicina popular, incluyendo hojas, cortezas, frutos, semillas y oleoresina. Las hojas y cortezas del tronco son utilizadas en los países de origen como cicatrizantes y astringentes en afecciones diversas de la piel, y como antiinflamatorias en general y antirreumáticas. La corteza del tronco produce un exudado resinoso muy aromático utilizado también en terapia popular para el tratamiento de tumores locales y verrugas. Las bayas desecadas se utilizan como sustitutas de la pimienta y las hojas como colorante. En América los frutos macerados en almíbar o vinagre se emplean en la preparación de diferentes bebidas para el tratamiento de procesos inflamatorios, como afecciones reumáticas y patologías inflamatorias de la piel [Duke, 1985; Ruffa et al., 2002; Schmourlo et al., 2005; Anónimo, 2005a; Anónimo, 2005b].

II.1.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química de *Schinus molle* es compleja y varía en función del órgano o parte de la planta [Bernhard y Wrolstad, 1963; Domínguez et al., 1971; Rahman et al., 1974; Terhure et al., 1974; Anónimo, 1976; Diamantoglou, 1980; Diamantoglou y Kull, 1981; Bernhard et al., 1983;

Del Valle y Schwenker, 1987;]. Los frutos contienen aceite esencial (3 a 5%) donde predominan componentes como α - y β -felandreno, β -espatuleno, D-limoneno, silvestreno, α - y β -pineno, perillaldehído, carvacrol, mirceno, canfeno, *o*-etil-fenol, *p*-cimeno y *p*-cimol como componentes mayoritarios. La corteza contiene aproximadamente un 23% de taninos y gomoresina (55% de resina y 40% de goma). Las hojas contienen entre 0,2 y 1% de aceite esencial (con predominio de felandreno y carvacrol), flavonoides (miricetina, quercetina, kaempferol), proantocianidinas, ácidos grasos y esteroides. Las semillas secas contienen aproximadamente un 8% de proteínas y un 10% de lípidos.

Los frutos contienen una oleoresina de la que se han aislado diversos triterpenos [Pozzo-Balbi et al., 1976; Pozzo-Balbi et al., 1978]. Estos son mayoritariamente tetracíclicos, derivados del eufano (20*R*) y tirucallano (20*S*), y en general poseen funciones alcohol o ceto en C-3, aldehído en C-21 y ácido ó éster en C-27. Además, los derivados 3-hidroxi presentan posibilidades isoméricas, habiéndose aislado indistintamente los compuestos 3 α - y 3 β -hidroxi.

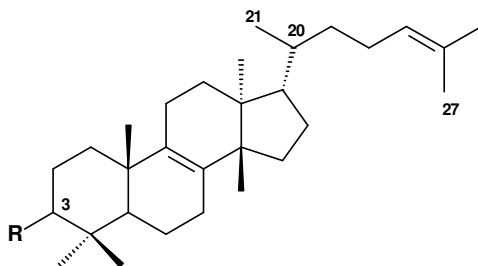


Figura 2. Estructura química de triterpenos tipo eufano

II.1.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Diversos ensayos realizados han demostrado las propiedades antibacterianas y antifúngicas del aceite esencial [Gundidza, 1993], con un amplio espectro, ratificando algunas de las propiedades

antiinfecciosas de preparados de esta especie utilizados en diversos países sudamericanos como Brasil y Perú [Duke, 1985]. 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*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y *Brochothrix thermosphacata* [Gundidza, 1993]. Además, el aceite esencial también inhibe significativamente el crecimiento de los hongos *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium culmorum* y *Alternaria alternata*. Previamente, Dikshit et al. (1986) demostraron el efecto del aceite esencial obtenido de las hojas de *Schinus molle* frente a diversos hongos patógenos en animales (*Microsporum grypseum*, *Trichosphyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*) y otros contaminantes comunes en condiciones de almacenamiento (*Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium italicum*). El aceite esencial *S. molle* fue el más potente de todos los ensayados, siendo más efectivo frente a los patógenos animales. Recientemente, Schmourlo et al. (2005) han investigado la actividad antifúngica de diversos extractos de plantas medicinales y alimenticias frente a diversos hongos. De todos, el extracto acuoso de *Schinus molle* fue el más activo frente a *Candida albicans*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 105 ng/mL frente a 950 ng/mL para anfotericina B. Mediante bioautografía establecieron que los flavonoides pueden ser los posibles principios activos.

Las hojas de *Schinus molle* son tradicionalmente utilizadas en Etiopía como repelentes de la mosca doméstica. El estudio de la fracción volátil activa permitió la identificación de los principios directamente relacionados con el potencial efecto repelente, siendo *cis*-men-2-en-1-ol

y *trans*-piperitol los dos compuestos responsables [Wimalaratne et al., 1996].

El extracto metanólico de cortezas y hojas de *Schinus molle* fue estudiado como potencial agente citotóxico frente a células Hep G2 (carcinoma hepatocelular humano) junto a otras especies seleccionadas de la flora medicinal argentina. El extracto de *S. molle* inhibió de forma dosis dependiente el crecimiento de las células tumorales, siendo la especie más potente de todas las estudiadas ($CI_{50} = 50 \mu\text{g/mL}$) [Ruffa et al., 2002].

El extracto metanólico y diclorometánico de las hojas de *Schinus molle* reducen significativamente la presión arterial en ratas normotensas. El extracto diclorometánico redujo el efecto máximo contráctil inducido por noradrenalina, sin embargo el extracto metanólico no tuvo efecto [Bello et al., 1996]. El extracto diclorometánico tiene baja toxicidad, efectos depresores del sistema nervioso central y actividad analgésica [Barrachina et al., 1997]. Finalmente, se han demostrado las propiedades relajantes de músculo liso *in vitro*. A dosis de $100 \mu\text{g/mL}$ el extracto diclorometánico de las hojas redujo las contracciones inducidas por serotonina e histamina en útero de rata, y las contracciones inducidas por acetilcolina en duodeno aislado de rata. A dosis inferiores ($10 \mu\text{g/mL}$) el extracto solo fue efectivo frente a contracciones inducidas por serotonina e histamina [Bello et al., 1998].

Mediante un aislamiento bio-guiado, Olafsson et al. (1997) aislaron 3 triterpenos con propiedades inhibitoras de la enzima convertidora de angiotensina. Los compuestos, identificados como triterpenos tetracíclicos tipo eufano y tirucallano, demostraron un débil efecto farmacológico ($CI_{50} = 250 \mu\text{M}$), claramente inferior a otros congéneres estructurales, como los principios aislados de *Ganoderma lucidum* cuyo

potencia (CI₅₀) varía en un rango comprendido entre 5 µM y 220 µM [Olafsson et al., 1997].

En 1996 se patentó un medicamento cuya base es el aceite esencial de *Schinus molle*. Este preparado se utiliza para el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en humanos y animales [Camano, 1996]. Un año después, en 1997, se concedió una nueva patente para un medicamento antiséptico, de aplicación local en heridas abiertas [Camano, 1997].

II. 2. *LYSIMACHIA FOENUM-GRAECUM*

II.2.1. BOTÁNICA

Lysimachia foenum-graecum Hance (Primulaceae) es una planta herbácea perenne de aproximadamente 0,5 m de altura, conocida en China como “*Ling xiang cao*”, hermafrodita, se poliniza mediante insectos. Se distribuye al norte de Guangdong Guangxi, sudoeste de Hunan, y sureste de Yunnan (provincia de China) y crece a 800-1700 m de altura. Su habitat natural son los bosques húmedos mixtos, arroyos de valles entre montañas y suelo ricos en humus, y se suele localizar en macizos cultivados [Anónimo, 1993].

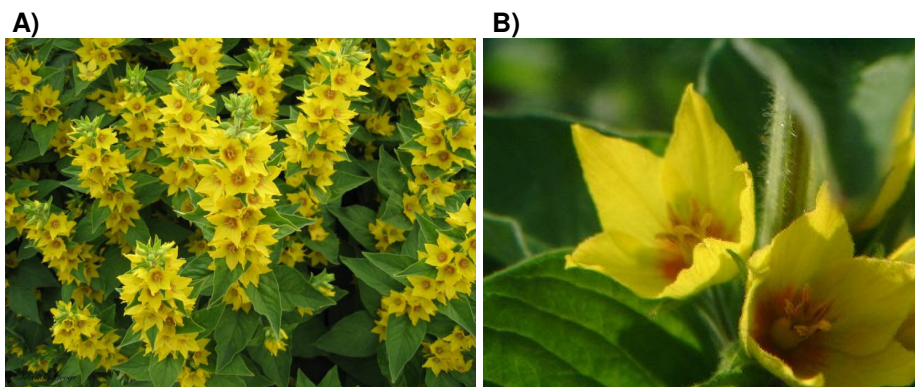


Figura 3. *Lysimachia foenum-graecum*. **A)** flores; **B)** detalle de la flor

No existe información acerca del cultivo de esta especie. Tan solo se conoce que se desarrolla fácilmente cuando se encuentra con el habitat adecuado. Por datos extrapolados de otras especies se sabe que es fácil su propagación por semillas en otoño en épocas frías, y por división en primavera y otoño [Huxley,1992]. Al igual que otras especies del género, parece que ésta es inmune a la acción predatoria de algunos animales, como los conejos [Thomas ,1990].

II.2.2 USO POPULAR

La raíz se utiliza para preparar elixires contra la halitosis. También como sustituto del incienso y para perfumar el cabello. En general se emplea como planta perfume y repelente contra los insectos, y en China, para tratar la cefalea y los síntomas de resfriado [Huxley,1992; Thomas,1990].

II.2.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

No existe ninguna información previa sobre la composición química de la especie *Lysimachia foenum-graecum*. Una completa revisión bibliográfica nos permite conocer la composición de otras especies del mismo género, destacando la presencia de saponósidos, flavonoides y aceites esenciales [Chang et al., 2004]. De las especies estudiadas se pueden destacar *Lysimachia davurica*, *L. pentapetala*, *L. christinae*, *L. capillipes*, *L. vulgaris*, *L. nummularia* y *L. fortunei*.

A partir de *Lysimachia davurica* se han aislado e identificado dos nuevos saponósidos, davuricósidos D y J [Tian et al., 2004a], β -amirina, estigmasterol, soya-cerebrósido, y los ácidos triacontanoico, palmitico y oleanólico [Tian et al., 2002]. Los mismos autores han aislado dos nuevos triterpenoides en la especie *Lysimachia capillipes*, los cuales han sido identificados como capillipósido I y capillipósido J [Tian et al., 2004b]. Y en la especie *Lysimachia pentapetala* se ha descrito la

presencia de triacontanol, β -sitosterol, monopalmitato de glicerol y ácido succínico [Zhang et al., 1999].

Cui et al. (2003) han aislado tres compuestos a partir de la especie *Lysimachia christinae*, los cuales han sido identificados como la γ -lactona del ácido ramnónico y el nuevo flavonoide kaempferol-3-O- α -L-ramnosil (1 \rightarrow 2)- β -D-xilósido denominado lisimachiína. Otra especie con flavonoides es *Lysimachia vulgaris*, de la cual se han aislado nueve heterosidos derivados del kaempferol, quercetina y miricetina [Rzadkowska-Bodalska et al., 1975]. Previamente, había sido descrita la presencia de rutósido en esta misma especie [Oiseth y Nordal, 1952]. De *Lysimachia capillipes* fueron aislados dos nuevos glucósidos derivados del flavonol, quercetin-3-O-(2,6-di- α -L-ramnopiranosil)- β -D-galactopiranosido y el denominado capillipósido II [Xie et al., 2002]. En 1970, Méndez había descrito la presencia de diversos glicósidos de miricetina en *Lysimachia punctata*.

De la fracción volátil (0.11%) obtenida por arrastre en corriente de vapor de agua de la sumidad florida de *Lysimachia trientaloides* se han identificado 40 componentes mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-EM), de ellos los mayoritarios son los siguientes: patchuli alcohol (22,5%), acetato de L-bornilo (16,1%), γ -gurjuneno (3,3%), δ -guaieno (2,6%), nerolidol (2,0%), linalool(2,0%) y ácido camítico (2,0%) [Zhou et al., 2002]. Diecinueve componentes de la fracción neutra de *Lysimachia nummularia* y *L. vulgaris* han sido identificados mediante CG-EM [Luczak et al., 1989]. De la fracción éter de petróleo de *Lysimachia fortunei* se aislaron triacontanol y una mezcla de derivados de la 2,5-dihidroxi-3-alkil benzoquinona. De la mezcla identificaron la presencia de embelina y cinco homólogos, tres de ellos

poseen la cadena dodecano, tetradecano y hexadecano [Fang et al., 1989].

II.2.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

La especie *Lysimachia sikokiana* es conocida por sus propiedades molusquicidas. Del extracto metanólico se han identificado diferentes saponósidos como responsables de la actividad. El principio más efectivo de entre los compuestos aislados fue identificado como 3-*O*- β -xilopiranosil- (1 \rightarrow 2)- β -glucopiranosil- (1 \rightarrow 4) -[β -glucopiranosil -(1 \rightarrow 2)] - α -arabinopiranosil proto-primulagenina A, también denominada lisikoianósido o [Kohda et al.,1989].

Un alquilresorcinol citotóxico fue aislado de *Lysimachia japonica* y posteriormente identificado por métodos espectroscópicos como grevillol. Este compuesto ha sido ensayado *in vitro* frente a diferentes líneas celulares cancerosas KB, B-16, PC-13, L-5178Y, P-388 y Hep-2, y posteriormente se han sintetizado diferentes derivados químicamente relacionados, para poder establecer la relación estructura química y actividad farmacológica [Arisawa et al., 1989]. De la misma especie, se ha aislado el ácido 6-tridecilresorcílico, el cual inhibe de manera dosis dependiente las contracciones miofibrilares, la superprecipitación de miosina B y la actividad ATPasa de miosina y actomiosina [en preparaciones de músculo esquelético de conejo Kobayashi et al., 1984].

El extracto *n*-butanólico de *Lysimachia hemsleyana* (planta entera) regula la producción de IL-2 en esplenocitos de ratón y mejora la actividad fagocítica de macrófagos peritoneales de ratón, justificando su efecto en componentes inflamatorios de patologías autoinmunes [Zhang et al., 2002a]. Los mismos autores estudiaron el efecto de diversos extractos de la misma planta pero utilizando diferentes estimulantes, y demostraron que los extractos *n*-butanólico y clorofórmico mejoran la

proliferación linfocitaria inducida con lipopolisacárido (LPS) y concanavalina A (ConA) [Zhang et al., 2002b]. Yao et al. (1981) demostraron el efecto inmunosupresor de esta misma especie y de *Lysimachia christinae* [Yao et al., 1982], de la cual Gu et al. (1988) habían aislado dos compuestos con propiedades antiinflamatorias.

Jiang et al.(1997) estudiaron la actividad anti-peroxidativa de diversas plantas medicinales, incluyendo *Lysimachia christinae*, y demostraron que tiene un gran efecto, justificando las propiedades hepatoprotectoras de la especie, cualidad por la que es utilizada en medicina tradicional china.

Finalmente, el extracto acuoso de *Lysimachia christinae* administrado *per os* a ratones hiperuricémicos redujo los niveles de ácido úrico a valores normales comparados con el grupo blanco. En estos ratones, la administración de iguales dosis no produjo modificaciones en los niveles fisiológicos uricémicos [Wang et al., 2002]

II.3. LITHOSPERMUM ERYTHORHIZON

II.3.1. BOTÁNICA

Lithospermum erythrorhizon Sieb. et Zucc. (Boraginaceae), es una planta herbácea, perenne, de tallo erecto, que puede alcanzar los 60 cm de altura, pubescente, con tricomas blancos; las hojas son alternas, anchas, ápice agudo, bases cuneiformes y márgenes enteros. La floración se produce en otoño. Las flores forman inflorescencias en racimos terminales de color blanco. El fruto es pequeño, ovoide y de color negro brillante.

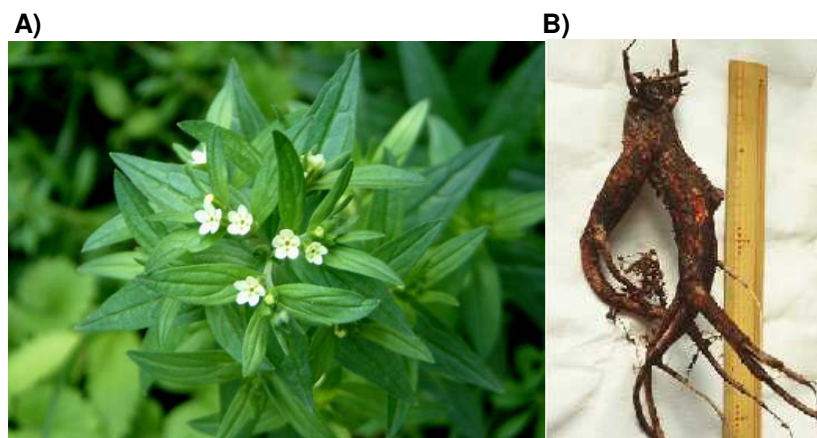


Figura 4. *Lysimachia foenum-graecum*. **A)** hojas y flores; **B)** Radix Lithospermi

II.3.2. USO POPULAR

La raíz (Zicao, Radix Lithospermi), recolectada en primavera u otoño es reconocida oficialmente por la Farmacopea China para el tratamiento de eczemas, quemaduras por calor y sarampión [Tang y Eisenbrang, 1992; Anónimo, 2005d]. También se emplea en medicina tradicional como cicatrizante y en procesos inflamatorios de piel y mucosas [Papageorgiou et al., 1999].

II.3.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La raíz de *Lithospermum erythrorhizon* contiene principalmente pigmentos derivados de la naftoquinona. El porcentaje expresado como alkanina es del 0,47%. De los pigmentos, shikonina es el más representativo, constituyendo hasta el 39% del extracto total [Lu et al., 2004], mientras que alkanina (*S*-isómero) constituye entre el 0,8% y el 5%. También se han descrito los compuestos acetilshikonina, isobutilshikonina, β,β -dimetilacrilshikonina, β -hidroxi-isovalerilshikonina, isovalerilshikonina, α -metilbutiril shikonina, y deoxishikonina como

componentes mayoritarios, y lithospermidina A y B, como componentes minoritarios [Tang y Eisenbrang, 1992]. Otros derivados de la hidroquinona (no naftoquinónicos) aislados han sido shikonofurano A-E y dihidroshikonofurano. Además se han descrito ácido rosmarínico, ácido lithospérmico, y tres glicanos denominados lithospermanos A, B y C [Tang y Eisenbrang, 1992].

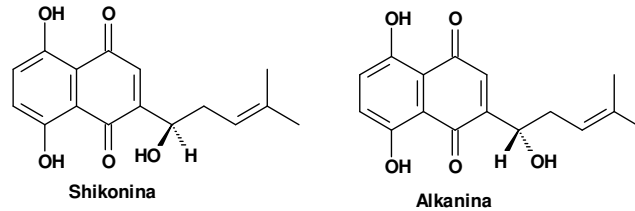


Figura 5. Estructura química de shikonina y alkanina

II.3.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Diversos extractos de *L. erythrorhizon* inhibieron el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea*, y *Bacillus subtilis*, pero no tuvieron efecto sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto acuoso de la sumidad tiene efectos antagonistas de la gonadotropina, acortando el periodo de embarazo de ratones y conejos [Tang y Eisenbrang, 1992].

Existen numerosas referencias a trabajos realizados con los principios aislados de *L. erythrorhizon*, principalmente shikonina y alkanina. Entre los estudios destacan las propiedades antiinfecciosas y antiinflamatorias, lo que lleva a la aplicación en terapéutica de estos compuestos como cicatrizante de heridas abiertas, pero también se han descrito sus potenciales propiedades anticancerosas y antitrombóticas [Papageorgiou et al., 1999].

A. Propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiparasitarias

Hay diversas referencias sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de *L. erythrorhizon*, e incluso recientemente se ha demostrado su potente efecto antiparasitario frente a *Trypanosoma cruzi* [Lirussi et al., 2004]. Existen además múltiples referencias sobre la actividad de los compuestos aislados frente a diferentes microorganismos, como β,β -dimetilacrilshikonina e hidroxi-isovalerilshikonina frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea*, sin embargo, carece de actividad frente a *Escherichia coli* [Tang y Eisenbrang, 1992]. Shikonina inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *Enterococcus faecium* y *B. subtilis*) pero no tiene efecto contra Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*). Aunque los datos iniciales indicaban que se trataba de efectos bacteriostáticos, recientemente se ha demostrado que se trata de efectos bactericidas. Shikonina además demostró una gran selectividad frente a cepas de *S. aureus* meticilín-resistentes [Papageorgiou et al., 1999].

Shikonina y sus derivados también poseen propiedades antifúngicas, inhibiendo el crecimiento de *Saccharomyces sake*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagraphoides*, *T. tonsulans* var. *sulfureum*, *Microsporium gypseum* y *Epidermophyton fluccosum*. Deoxishikonina es el derivado más activo de todos, y posee efecto fungistático. Aunque existen resultados contradictorios, shikonina y deoxishikonina no tiene actividad sobre *Candida albicans* [Papageorgiou et al., 1999].

Shikonina a 0.5-10 $\mu\text{g/mL}$ inhibe el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, pero solo demostró un débil efecto cuando se administró a ratas con amebiasis experimental [Tang y Eisenbrang, 1992]. Shikonina inhibe el desarrollo de larvas de *Aedes aegypti* [Papageorgiou et al., 1999].

B. Propiedades cicatrizantes y antiinflamatorias

Diversos estudios demuestran las propiedades antiinflamatorias y cicatrizantes de shikonina, alkanina, y sus derivados. Los experimentos demuestran el efecto en diferentes protocolos experimentales de inflamación aguda y crónica, incluyendo modelos de artritis e hipersensibilidad retardada inducida por diversos agentes. Shikonina y alkanina tienen similares propiedades y potencia, sin embargo, algunas modificaciones estructurales en la molécula pueden modificar positivamente la respuesta farmacológica [Singh et al., 2003; Tanaka et al., 1986; Papageorgiou et al., 1999]. De todos los compuestos obtenidos, el pentaacetil derivado de shikonina tiene la ventaja de ser activo administrado vía oral, y además actúa como protector gástrico [Papageorgiou et al., 1999].

Entre los estudios realizados sobre posibles mecanismos de acción, destaca el de Wang et al. (1994) sobre la capacidad de inhibir la síntesis de LTB₄ y 5-HETE. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la implicación de shikonina en otros posibles mecanismos de acción antiinflamatoria como el efecto antioxidante y captador de radicales libres [Gao et al., 2000; Kourounakis et al., 2002], inhibición de la activación de la transcripción del TNF- α [Staniforth et al., 2004], bloqueo selectivo de la unión quimiocina-receptor de quimiocina CCR1 [Chen et al., 2001] o bloqueo de diversas uniones proteína-proteína con diferentes dianas en distintos compartimentos extra e intracelulares [Chen et al., 2002].

Respecto a las propiedades cicatrizantes, no han podido ser demostradas claramente con los compuestos aislados. Sí existen indudables efectos cuando se ensayan los extractos de la planta o bien

preparados comerciales basados en extractos de *L. erythrorhizon* [Papageorgiou et al., 1999].

C. Propiedades anticancerosas

El extracto de *L. erythrorhizon*, alkanina, shikonina y sus derivados poseen propiedades antitumorales *in vivo*, inhiben el crecimiento de diversas líneas celulares y tienen propiedades quimiopreventivas frente a diferentes agentes [Papageorgiou et al., 1999]. Como ejemplos relevantes se puede citar que a concentraciones relativamente altas (superiores a 10 ng/mL) shikonina presenta citotoxicidad y a concentraciones inferiores (entre 10 ng/mL a 10 fg/mL) tienen propiedades inmunoestimulantes. Además shikonina inhibe los efectos mutagénicos de diversos agentes carcinogénicos, inhibe la activación antigénica del virus Epstein-Barr en células Raji inducida por TPA e inhibe completamente el desarrollo tumoral inducido *in vivo* en ratón (10 mg/kg/día). Los mecanismos de acción pueden ser varios. La actividad antioxidante, ya comentada o la inhibición de enzimas vitales para el metabolismo o replicación celular, pueden ser las causas directas de la actividad anticancerosa. En efecto, estudios realizados con diferentes derivados de shikonina han demostrado una inhibición selectiva sobre la topoisomerasa I, sin afectar a la topoisomerasa II. Este estudio permitió la obtención de diversos derivados y el conocimiento entre la estructura química y la actividad farmacológica [Ahn et al., 1995; Kweon et al., 1993; Papageorgiou et al., 1999].

Otros estudios recogen diversas propiedades de shikonina sobre diferentes líneas cancerosas, entre ellos destaca el efecto dosis-dependiente antiproliferativo frente a células de carcinoma epidermoide humano, incrementando los niveles intracelulares de proteínas fosforiladas proapoptóticas y disminuyendo el de proteínas asociadas

con la proliferación en células de carcinoma epidermoide [Sing et al., 2003a]. Shikonina regula la muerte celular programada vía activación de caspasa-3 y bloqueo de la síntesis de DNA [Wu et al., 2004a] e inhibe el crecimiento tiempo- y dosis-dependiente de la línea celular A375-S2 (melanoma humano maligno) a través de el aumento regulado de p53 y la disminución regulada de proteínkinasa 4 dependiente de ciclina. La activación de la caspasa se detectó en la apoptosis celular inducida por shikonina, la cual implica una vía post-mitocondrial dependiente de caspasa-9. El descenso de los niveles de Bcl-2 y el incremento de Bax fueron positivamente correlacionados con la elevada expresión de la proteína p53 [Wu et al., 2004b].

D. Propiedades cardiovasculares

Shikonina y sus derivados tienen propiedades antitrombóticas, inhibiendo la agregación plaquetaria. El compuesto más potente de todos los ensayos fue acetilshikonina (CI_{50} 2,1 $\mu\text{g/mL}$) [Papageorgiou et al., 1999]. Este compuesto y sus análogos inhiben la relajación inducida por diferentes agonistas en aorta precontraída por fenilefrina en una forma dependiente del endotelio (rango de IC_{50} entre 0,2 y 1,5 μM). Además, la relajación inducida por inonóforo de calcio A23187 fue también inhibida o revertida por shikonina, sin embargo no tuvo efecto sobre la relajación inducida por nitroprusiato sódico, lo que indica que este compuesto puede actuar por inhibición de la síntesis de óxido nítrico en el endotelio [Hu et al., 2004].

E. Toxicidad

La toxicidad de shikonina y sus derivados se puede considerar baja, ya que los datos experimentales demuestran que si bien la DL_{50} vía intraperitoneal es de 20 mg/kg, la administración oral da valores >1000

mg/kg. Shikonina y sus derivados tampoco tienen efectos mutagénicos en el test de Ames [Papageorgiou et al., 1999].

F. Farmacocinética

El estudio farmacocinético demuestra que shikonina tiene muy buena absorción tras administración oral ó intramuscular, apareciendo en plasma a partir del primer minuto. El pico máximo en plasma aparece a los 5,78 minutos tras administración oral y a 7,62 tras administrar intramuscular. La biodisponibilidad es de 34,3 y 64,7, respectivamente. A las 96 horas de la administración intravenosa aparece un 41% en orina y un 40% en heces. Se metaboliza en hígado dando lugar a diez metabolitos, cinco monómeros y cinco dímeros [Papageorgiou et al., 1999].

II.4. FORSYTHIA SUSPENS

II.4.1. BOTÁNICA

Forsythia suspensa (Thunberg) Vahl (Oleaceae) es un arbusto de hoja caduca de entre 2 m y 5 m de altura. Las ramas erectas o colgantes, delgadas, las jóvenes son angulares, mientras que las viejas son cilíndricas. Al inicio de la primavera produce flores amarillas, pálidas, hermafroditas, dispuestas en racimo axilar (1 a 3), de unos 2,5 cm de largo. El cáliz tiene 4 lóbulos. Las hojas aparecen más tarde que las flores, son ovadas a oblongo-ovadas, glabras, con márgenes dentados, a veces profundamente divididas en 3 lóbulos y dispuestas de manera opuesta. El fruto es una cápsula de sabor amargo y astringente. Esta especie es originaria de Extremo Oriente y se utiliza como ornamental en China y Japón [W.H.O., 1989].



Figura 6. *Forsythia suspensa*. A) flor; B) *Forsythiae Fructus*

II.4.2. USO POPULAR

Lianqiao (*Fructus Forsythiae*) es una droga ampliamente utilizada en medicina tradicional china y está oficialmente recogida en la Farmacopea Oficial China. Los frutos se emplean fundamentalmente como antipiréticos y antiinflamatorios en el tratamiento de infecciones bacterianas [Tang y Eisenbrand, 1992]. El empleo de esta droga se remonta a 4.000 años y es ingrediente de más de 50 preparaciones fundamentales en China [Brown, 1995].

El fruto es amargo y astringente. Se utiliza como estimulante cardiaco y del sistema nervioso. Por su contenido en flavonoides mejora el riego y la resistencia capilar (propiedades vitamínicas P). El fruto también se ha descrito como antídoto de venenos, antiflogístico, antitusivo, diurético, febrífugo, laxante y tónico, y para el tratamiento de infecciones agudas del tracto urinario, en paperas y amigdalitis, y en infecciones alérgicas. Las flores también tienen propiedades antibacterianas, específicamente frente a *S. aureus*, *S. disenteriae*, *S. haemolyticus* y *Mycobacterium tuberculosis* entre otros. Las hojas se emplean en forma de cataplasma en úlceras y hemorroides, y la raíz en ictericia y fiebre [Brown, 1995; Anónimo 2005c].

II.4.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Desde 1960 se han aislado e identificado un gran número de compuestos a partir de los frutos de *Forsythia suspensa*: heterósidos fenólicos, lignanos, triterpenos y alcoholes. Entre los lignanos destacan filigenina, y pinoresinol y sus heterósidos filipina y un glucósido del pinoresinol, matairesinol, arctigenina y sus derivados arctiína, matairesinósido y *O*-metilarctigenina [Tang y Eisenbrang, 1992].

Los compuestos más característicos de *Forsythia suspensa* son los denominados forsitósidos (fenilpropanoide-glicósidos), de los cuales se han aislado los denominados A, B, C y D. Otros derivados característicos son los alcoholes: rengiol, rengióxido, rengiósido A, rengiolona, cornósido, salidrósido y suspenol [Tang y Eisenbrang, 1992].

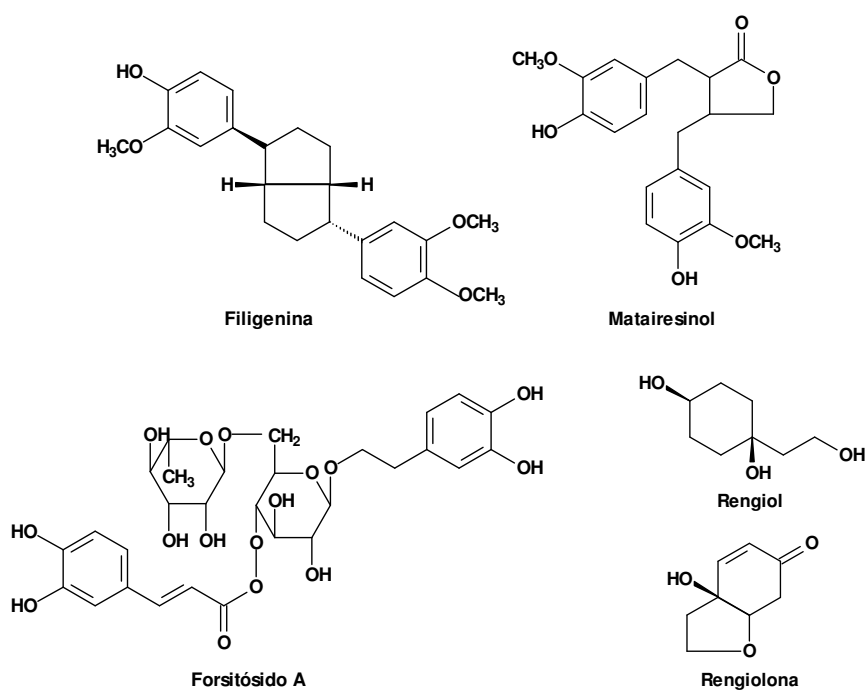


Figura 7. Estructura química de principios de *Forsythia suspensa*

Otros compuestos comunes como ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido ursólico, acetato de β -amirina y rutósido han sido aislados en frutos y hojas de *Forsythia suspensa* [Tang y Eisenbrang, 1992].

II.4.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

El extracto hidroetanólico de los frutos desecados de *Forsythia suspensa* tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. El extracto (0,5 mg/kg) inhibió los edemas agudos inducidos en oreja de ratón por ácido araquidónico (42% de inhibición) y TPA (88%), la inflamación inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón (37%) y la reacción de hipersensibilidad inducida por oxazolona (41%, a las 24 h) [Cuéllar et al., 1998]. A similares conclusiones llegaron Ozaki et al. (1997) estudiando la actividad analgésica y antiinflamatoria del extracto hidrometanólico de *Forsythia suspensa*, demostrando en este caso que la actividad es debida a compuestos no polares, ya que el fraccionamiento con disolventes de diferente polaridad les permitió observar que la fracción hexánica mantiene la actividad mientras que la subfracciones más polares carecen de ella. Posteriormente aislaron del extracto activo el compuesto triterpénico 3 β -acetoxi-20,25-epoxidammaran- 24-ol, como principio mayoritario responsable de la actividad [Ozaki et al., 2000].

En un trabajo posterior se demostró que el extracto tiene capacidad antioxidante, inhibiendo la peroxidación lipídica de microsomas hepáticos de rata inducida por Fe²⁺-ascorbato (97%, CI₅₀ = 23,7 μ g/mL) y CCl₄-NADPH (72%, CI₅₀ = 16,0 μ g/mL), la captación del radical superóxido generado por el sistema hipoxantina/xantina oxidasa (80%, CI₅₀ = 11,1 μ g/mL) y la degradación de desoxiribosa inducida por Fe³⁺-EDTA [Schinella et al., 2002].

De los estudios realizados con los principios activos de *Forsythia suspensa*, destaca la actividad antimicrobiana de forsitósido A, C y D, las propiedades inhibitoras de pinosresinol frente a fosfodiesteras de AMPc y la capacidad inhibitora de la formación de 5-HETE de los cafeoil-glucósidos [Tang y Eisenbrang, 1992]. Un estudio más reciente demuestra que el extracto hidroetanólico de *Forsythia suspensa* inhibe la actividad de las enzimas elastasa y 5-LOX, con valores de CI_{50} de 80 $\mu\text{g/mL}$, lo que en parte justifica los resultados descritos previamente [Prieto et al., 2003].

Los frutos de *Forsythia suspensa* poseen propiedades inhibitoras de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y las sustancias responsables son los lignanos tetrahidrofurfuránicos, pinosresinol, filligenina y siringaresinol, los cuales fueron más potentes que probucol sobre la oxidación LDL inducida por Cu^{2+} [Chen et al., 1999].

Iizuka y Nagai (2005) demostraron el efecto vasorelajante sobre anillos aislados de aorta de rata del compuesto forsitósido aislado de los frutos de *Forsythia suspensa*. Este compuesto presenta un débil efecto relajante frente a contracciones inducidas por noradrenalina en aorta de rata con o sin endotelio, no afecta a las contracciones inducidas por altas concentraciones de K^+ (60 mM), pero si inhibe la vasocontracción inducida por noradrenalina en presencia de nicardipina, lo que demuestra que el efecto de este compuesto es debido al descenso en el flujo de calcio desde el espacio extracelular producido por noradrenalina.

Zhang et al. (2002c) aislaron un nuevo compuesto de *Forsythia suspensa* con actividad antiviral frente al virus respiratorio sincitial (RSV). El compuesto denominado ácido rengínico tiene la estructura ácido 2-(1,4-dihidroxi ciclohexanil)-acético.

II.5. *ISODON XEROPHILUS*

II.5.1. BOTÁNICA

Isodon xerophilus (C.Y. Wu et H.W. Li) H. Hara (Labiatae) es un arbusto perenne de aproximadamente 1 m, conocido como “*han sheng xiang cha cai*” es originario de la provincia china de Yunnan. Los tallos ramificados, de color pardo grisáceo, tienen ramitas de color amarillo violáceo. Hojas ovado-oblongas, de 1-2,5 cm × 0,5-1,5 cm, peciolo de 1 mm a 3 mm, la superficie adaxial rugosa y pubescente, la abaxial de color gris, densamente pubescente, base redondeada, margen acanalado, ápice agudo. Panículos estrechos de 3,5 cm a 10 cm, cimas pedunculadas, de 3 a 5 flores. Cáliz acampanado de aproximadamente 3 mm, densamente pubescente, con dos labios, dientes desiguales, anchamente triangular, un tercio más largo que el cáliz. Corola de 8 mm, pubescente, tubo de unos 3 mm, labio superior de 3 mm e inferior de 5 mm. Estambres incluidos o ligeramente separados. Semillas de color pardo amarillento, ovoides de aproximadamente 1 mm, glabras [Wu y Raven, 1994]. *Isodon xerophilus* (C. Y. Wu & H. W. Li) H. Hara es sinónimo de *Rabdosia xerophila* C. Y. Wu & H. W. Li.



Figura 8. Esquema de *Isodon xerophilus*

II.5.2. USO POPULAR

Isodon xerophilus es una especie que carece de uso en la medicina tradicional china al tratarse de un especie endémica. Tampoco hay referencias escritas sobre el uso popular. El empleo de otras especies afines como antiinflamatorias [Tang y Eisemnbrand, 1992] y los estudios realizados con diterpenos presentes en el género, han permitido centrar los trabajos de investigación en obtener nuevos compuestos de este grupo fitoquímico y su posterior estudio farmacológico.

II.5.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

El número de artículos publicados sobre esta especie es limitado. Hou et al. (2000a) a partir de las hojas de *Isodon xerophilus* aislaron 3 nuevos diepoxi-*ent*-kauranos denominados xerofilusina A, B y C, junto a un conocido compuesto o macrocalina B. En un trabajo posterior, los mismos autores aislaron otros 3 nuevos *ent*-kauranos, xerofilusina D, E y

F, junto a 6 conocidos compuestos (filostaquisina- λ , ácido oleanólico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, quercetin-3-*O*- β -D-glucopiranosido y quercetina) [Hou et al, 2000b; 2001a;b], xerofilusina G, I, J y K, junto a los conocidos derivados enanderianina C, rostorina A, longikaurina B y rabdoternina D [Hou et al., 2001b].

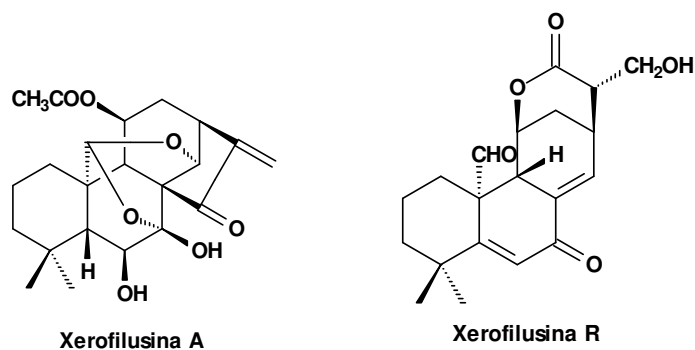


Figura 9. Estructura química de principios de *Isodon xerophilus*

Del extracto etanólico de las hojas se aislaron 3 nuevos *ent*-kauranos, los cuales fueron denominados como xerofilusina L, M y N, junto con 3 conocidos derivados denominados rabdoternina A, longikaurina F y ponidina [Li et al., 2002]. En esta especie también se han descrito otros grupos estructurales de diterpenos, como los *ent*-abietanos aislados e identificados como xerofilusina R y S, respectivamente [Niu et al., 2004].

II.5.4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

La mayoría de los estudios farmacológicos sobre los compuestos aislados de *Isodon xerophilus*, se han centrado en sus potenciales propiedades citotóxicas. De todos ellos, macroalina B, xerofilusina A y xerofilusina B, presentaron citotoxicidad frente a células K562, HL-60 y MKN-28 [Hou et al., 2000a]; ponidina frente a células K562 y T24 [Li et al., 2002]; xerofilusina G y longikaurin B inhibieron el crecimiento de las líneas celulares K562, HL-60, HCT, y MKN-28 [Hou et al., 2001b].

No existen otros tipos de estudios con esta especie, aunque el número de artículos publicados sobre citotoxicidad de diterpenos aislados del género *Isodon* o compuestos directamente relacionados es muy amplio. De ellos destaca el de Suzuki et al. (2004) sobre el posible mecanismo de acción de algunos de los compuestos de este grupo estructural (*ent*-kauranos). Así, el derivado *ent*-11 α -hidroxi-16-kahren-15-ona inhibe selectivamente la expresión de NF- κ B dependiente de TNF- α . La administración conjunta de *ent*-11 α -hidroxi-16-kahren-15-ona con TNF- α incrementa espectacularmente la apoptosis de células leucémicas humanas acompañadas por la activación de caspasas.

II.6. EICOSANOIDES E INFLAMACIÓN

II.6.1. INTRODUCCIÓN

Los eicosanoides son lípidos insaturados que derivan del ácido araquidónico (AA). Dentro de los eicosanoides se incluyen prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), tromboxanos (TXs), lipoxinas (LXs) y varios hidroxi- e hidroperoxiácidos grasos [Slater y McDonald-Gibson, 1987]. Los eicosanoides juegan un papel importante en la regulación de diferentes procesos fisiológicos, pero también causan dolor, inflamación e hipersensibilidad. Se han encontrado niveles elevados de estos mediadores en enfermos de artritis reumatoide, asma, psoriasis, shock anafiláctico y colitis ulcerosa [Resch et al., 1998], por lo que el desarrollo de inhibidores de la síntesis de estos eicosanoides puede resultar un paso clave en la clínica de muchas enfermedades.

El AA es liberado de la posición sn-2 de los fosfolípidos de membrana por acción de la PLA₂ activada por estímulos mecánicos, químicos, físicos o por otros mediadores. El AA puede ser metabolizado por dos

vías diferentes, la vía ciclooxigenasa (COX) o la vía lipoxigenasa (LOX) para dar lugar a los eicosanoides, mediadores lipídicos de la inflamación.

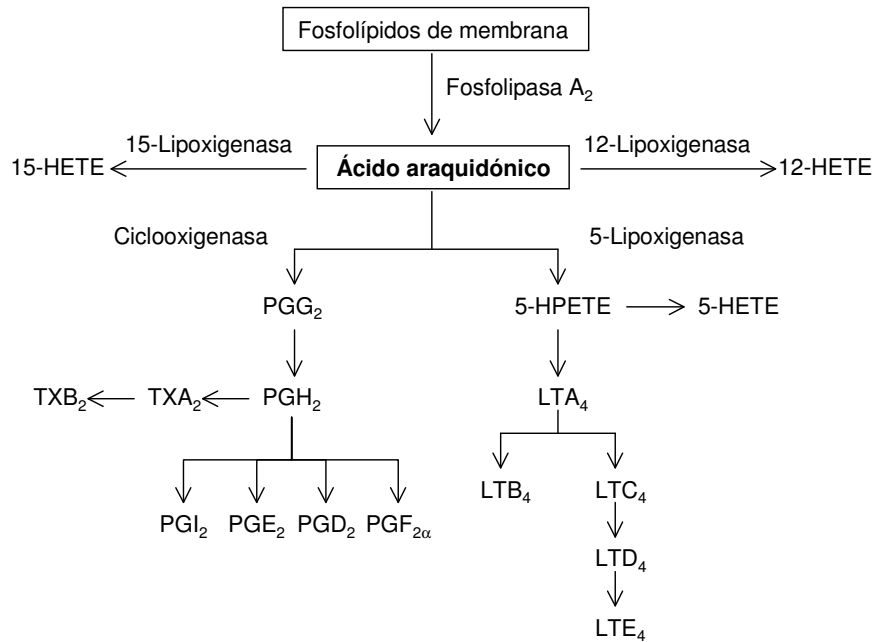


Figura 10. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido araquidónico.

II.6.2. LIPOXIGENASAS

Las LOX son una familia de enzimas, entre las que se encuentra la 5-, 12- y 15-LOX, que catalizan la oxidación del AA a sus correspondientes hidroperóxidos. La 5-LOX convierte el AA en ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenoico (5-HPETE), el cual se puede transformar en 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-HETE) o en LTA₄, que es el primer paso en la síntesis del resto de LTs. El LTA₄ puede, o bien ser convertido en LTB₄ por la enzima LTA₄-hidrolasa, o bien puede conjugarse con glutatión reducido para dar LTC₄ por acción de la LTC₄ hidrolasa. El LTC₄ puede sufrir modificaciones para dar lugar a los peptidil-leucotrienos: LTD₄, LTE₄ y LTF₄ [Steinhilber, 1994]. El LTB₄ es un potente estimulador de las respuestas de leucocitos como son la quimiotaxis, la adhesión celular, la

producción de anión superóxido, la translocación de calcio y la liberación de enzimas hidrolíticas [Henderson, 1994]. Los granulocitos, monocitos/macrófagos, mastocitos y linfocitos B expresan la 5-LOX, mientras que plaquetas, células endoteliales, células T y eritrocitos carecen de 5-LOX [Steinhilber, 1994].

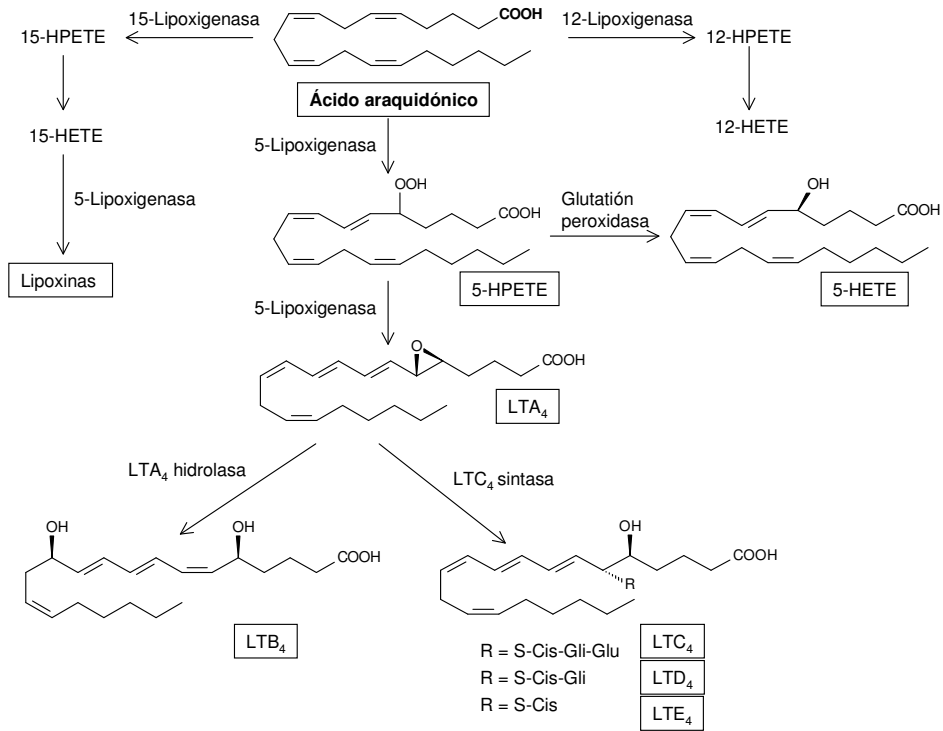


Figura 11. Síntesis de leucotrienos a partir del ácido araquidónico

II.6.3. CICLOOXIGENASAS

Las ciclooxigenasas son un grupo de enzimas responsables de la síntesis de PGs, TXs y PGI₂ a partir de AA. Los metabolitos de la COX tienen una amplia variedad de efectos fisiológicos y fisiopatológicos y están implicados en muchos procesos homeostáticos. Existen dos

formas de la COX, la isoforma constitutiva o COX-1 y la isoforma inducible o COX-2. Aunque la COX-1 se expresa en la mayoría de las células de los mamíferos bajo condiciones fisiológicas, son las células endoteliales, las plaquetas y las células tubulares del riñón las que expresan mayores cantidades de dicha isoforma, que juega un interesante papel en la generación de PGs, mediadores que regulan importantes procesos fisiológicos como son la citoprotección gastrointestinal, homeostasis vascular y función renal [Mitchell y Warner, 1999].

La isoforma inducible o COX-2 se expresa en grandes cantidades en estados de inflamación aguda y artritis, y da lugar a la síntesis de PGs proinflamatorias. Durante la reacción inflamatoria la actividad de la COX-1 se puede incrementar de 2 a 3 veces, mientras que la actividad de la COX-2 aumenta hasta 20 veces [Frölich, 1997]. Se ha demostrado que las acciones farmacológicas de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son debidas a la inhibición de la COX-2, mientras que los efectos adversos (toxicidad gastrointestinal y nefrotoxicidad) son debidos a la inhibición de la COX-1 [Needleman y Isakson, 1997; Mitchell y Warner, 1999].

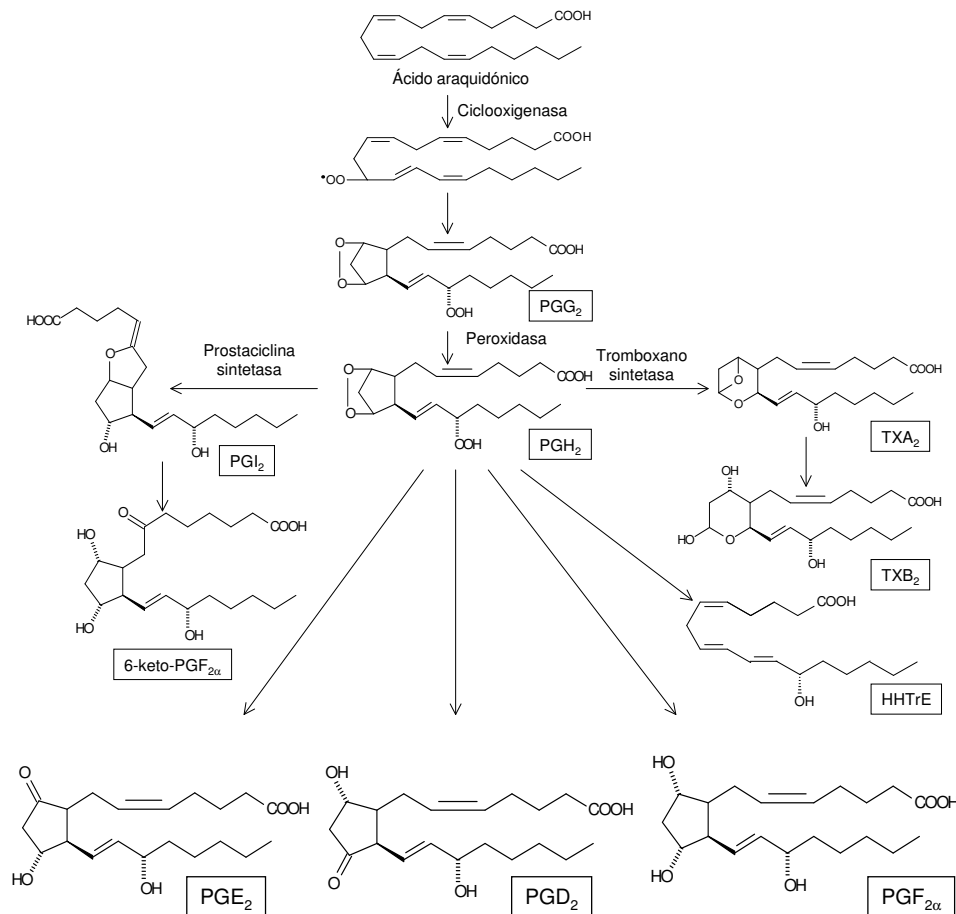


Figura 11. Síntesis de PGs, prostaciclina (PGI₂) y TXs a partir del AA

La COX actúa sobre el AA, transformándolo en un derivado endoperoxido (PGG₂) que a su vez se convierte en PGH₂ por peroxidación. A partir de PGH₂ por acción de la tromboxano sintetasa se sintetiza el TXA₂, que actúa como agregante plaquetario y vasoconstrictor, y el ácido hidroxihexadecatrienoico (HHTrE), un potente inductor endógeno de la producción de PGI₂ endotelial [Mezei et al., 2000]. De la PGH₂ y por acción de varias enzimas se sintetiza PGI₂, inhibidor de la agregación plaquetaria y vasodilatador, y las PGs entre las que destaca la PGE₂ que media la producción del edema y dolor en

el área inflamada, la $\text{PGF}_{2\alpha}$ responsable de la vaso- y broncoconstricción y la PGE_1 que produce fiebre y dolor [Ammon et al., 1991].

II.6.4. DETECCIÓN DE METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Existen varios métodos para la detección y cuantificación de los metabolitos del AA, entre ellos encontramos la cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector ultravioleta (UV) o fotodiodos (DAD), cromatografía de gases (CG) acoplada a espectroscopía de masas (EM) (CG-EM), radioinmunoensayos (RIA) y enzimoimmunoensayos (EIA), que difieren entre ellos en cuanto a su especificidad y la sensibilidad [Kumlin, 1996].

Los RIA y EIA son muy sensibles y son capaces de detectar cantidades del orden de pg de eicosanoides, pero el factor limitante es el uso de radiactividad o la disponibilidad del anticuerpo. La técnica acoplada a HPLC es capaz de cuantificar varios eicosanoides distintos en un solo análisis y no requiere el uso de anticuerpos o radiactividad, sin embargo sólo se pueden detectar compuestos que tengan grupos cromóforos en su estructura.

Está generalmente aceptado que la actividad 5-LOX medida por la producción de 5-HETE, LTB_4 y sus isómeros, es un marcador válido para el hallazgo de inhibidores de la 5-LOX. Todos ellos poseen grupos cromóforos que absorben a 235 nm ó 274-280 nm y por tanto, son fácilmente detectables y cuantificables, presentando correlación entre su absorbancia y su concentración. Aunque es posible medir PGs por HPLC con detector UV, éste no es un buen método para evaluar inhibidores de la COX porque el coeficiente de extinción y los máximos de absorción de la PGs son muy bajos (192 nm) [Dannhardt y Lehr, 1992]. Sweeney et al. (1987) demostraron que la cuantificación del 12-

HHTrE (máximo de absorción a 232 nm) producido por plaquetas bovinas activadas es un buen indicador de la actividad COX.

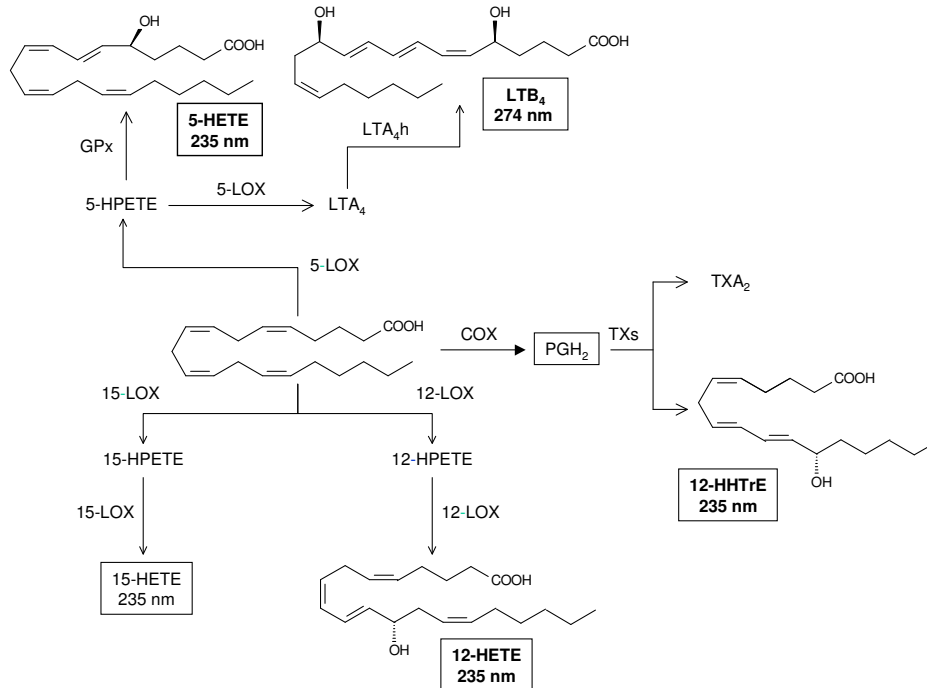


Figura 12. Metabolitos del AA que pueden medirse mediante HPLC acoplado a UV-DAD

II.7. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

II.7.1. INTRODUCCIÓN

La actividad antioxidante es ampliamente utilizada como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta actividad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación, involucrando especies reactivas del oxígeno. Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras biológicas. Algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de

iones metálicos. Un ensayo universal de la actividad antioxidante *in vitro* no existe, debido a que la actividad anti-radicalaria depende fundamentalmente de la naturaleza del radical y del método de generación del mismo. La elección de un sistema químico para generar especies reactivas es un punto crítico en el desarrollo de cualquier ensayo antioxidante con el fin de obtener resultados relevantes [Aruoma, 2003].

II.7.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Se han desarrollado varios métodos espectrofotométricos para la determinación del potencial antioxidante de diferentes sistemas bioquímicos. Estos métodos son de rápida aplicación, escasa manipulación de material biológico y bajas necesidades instrumentales, por lo que su aplicación es sencilla. La eficacia antioxidante de las muestras ensayadas se compara con patrones conocidos como ácido ascórbico o Trolox. Estos ensayos se pueden diferenciar por el procedimiento de las reacciones. Algunos utilizan el retraso en la oxidación (fase lag) como parámetro de la actividad antioxidante, otros analizan la capacidad de captación del radical libre, reducción del ion metálico o catión radical [Arnao et al., 1999]. Los métodos que se utilizarán en este trabajo son ampliamente empleados en diferentes estudios del poder antioxidante de sistemas biológicos (como plasma sanguíneo o tejidos), tanto de extractos y compuestos aislados de especies vegetales, como productos derivados de procesos industriales. Las pruebas seleccionadas para el estudio de la actividad antioxidante son la reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo (DPPH), reacción con el radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS^{•+}) y medida de la capacidad reductora (método FRAP).

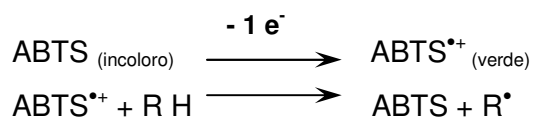
A. Reacción con el radical DPPH•

El fundamento de esta técnica consiste en la medición a 517 nm de la reducción del radical estable DPPH•. La absorbancia característica de este radical, que posee un color violeta intenso, disminuye en presencia de un antioxidante (AH) u otro radical (R•). Por tanto, es posible cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una disolución metanólica de DPPH [Brand-Williams et al., 1995].



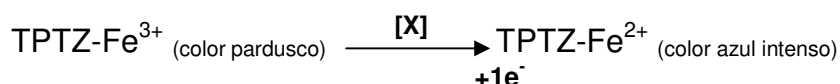
B. Reacción con el radical ABTS^{•+}

La base del método consiste es formar un radical catiónico ABTS^{•+} (cromóforo verde) basado en la acción oxidativa de peroxidasas u oxidasas sobre ABTS. Una solución estable de ABTS^{•+} también puede ser preparada con agentes oxidantes tales como dióxido de manganeso o persulfato de potasio. El radical ABTS^{•+} presenta máximos de absorción a 414 nm y en las proximidades del infrarrojo (645, 732 y 815 nm). Esta propiedad da la posibilidad de evitar interferencias generadas por cromógenos de la muestra a estudiar. El fundamento de este método consiste en observar la decoloración del radical ABTS debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno



C. Medida de la capacidad reductora: Método FRAP

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra biológica de acuerdo a su capacidad para reducir un determinado compuesto. Originariamente este método se lo denominó “Ferric reducing ability of plasma” (FRAP) porque fue utilizado para medir la actividad antioxidante del plasma humano. Actualmente se lo denomina “Ferric reducing antioxidant power” y su utilización se ha extendido al estudio de diferentes compuestos, mezclas o extractos biológicos. La base del método consiste en la reducción de un compuesto o mezcla de compuestos (**X**) sobre el Fe^{3+} presente en un complejo con un compuesto orgánico: tripiridiltriazina (TPTZ). Cuando el hierro del complejo es reducido a la forma ferrosa toma un color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm y cuya intensidad de color es proporcional a la capacidad reductora del compuesto o compuestos ensayados [Benzie y Strain, 1996].



II.7.3. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

La peroxidación lipídica es un proceso en cadena mediado por radicales libres que causa la degradación de los lípidos, siendo en particular interesante su acción a nivel de las membranas celulares. Este proceso se relaciona con numerosas alteraciones patológicas como procesos inflamatorios, toxicidad hepática causada por xenobióticos, trastornos vasculares y envejecimiento.

La peroxidación se puede iniciar catalizada por enzimas o por mecanismos de tipo no enzimático (radiaciones, catalizado por metales). En ambos casos, la peroxidación lipídica se inicia por el ataque de un radical libre reactivo sobre un ácido graso poliinsaturado (AGP-H), con la abstracción

de un átomo de hidrógeno y la formación de un radical del ácido graso (AGP[•]) que sufre una reorganización formándose un dieno conjugado (1), que rápidamente reacciona con oxígeno para formar el radical lipoperoxilo (AGPOO[•]) (2). Este radical puede atacar a otros ácidos grasos formándose hidroperóxidos lipídicos (AGPOOH) (3) y nuevos radicales libres, propagándose el proceso. La presencia de trazas de iones metálicos cataliza la ruptura de los hidroperóxidos lipídicos originando un gran número de productos secundarios entre ellos los radicales alcohoxilos. Los productos finales de la peroxidación lipídica son muy variados: alcanos, alquenes, hidroxialquenes, malondialdehído (MDA), epóxidos de ácidos grasos, etc.), algunos de los cuales también contribuyen al daño celular.

La fase de finalización ocurre cuando dos radicales libres reaccionan entre sí, o cuando el radical reacciona con una sustancia donante de átomos de hidrógeno (llamada antioxidante, reductor o captador de radicales libres), dando lugar a productos inactivos. Como productos finales del proceso están los hidroperóxidos, hidroxiácidos grasos, epoxiácidos grasos, aldehídos poliinsaturados, hidroxialdehídos, dialdehídos, cetonas y otros, que pueden reaccionar con grupos amino de proteínas, fosfolípidos o ácidos nucleicos, comprometiendo el buen funcionamiento y la calidad del sistema biológico o elementos que los contienen. Uno de los productos formados en este proceso es el MDA, que tiene la capacidad de formar aductos coloreados (rosa) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), dando un máximo de absorción a 532 nm. Este es el mecanismo químico más usado para determinar la extensión de la peroxidación [Schinella et al., 2002; Schinella et al., 2004].

Ácido graso poliinsaturado

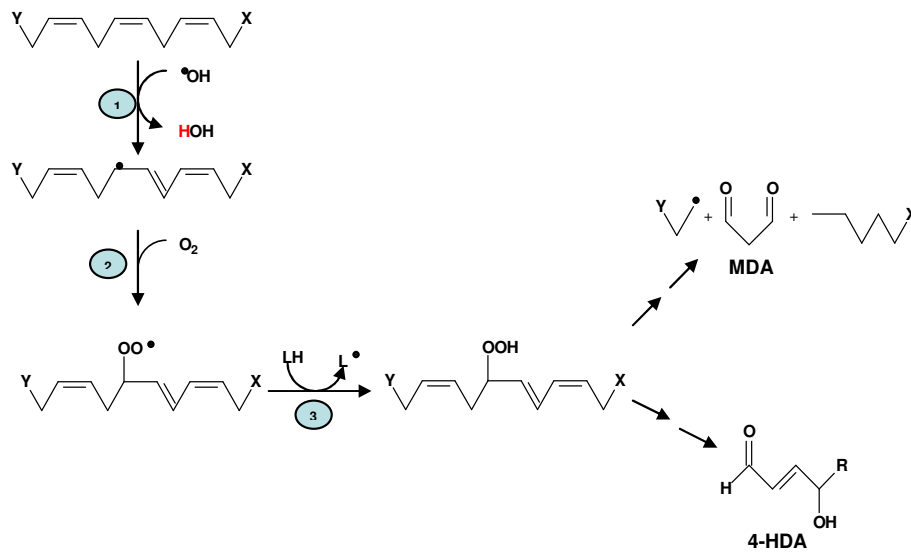


Figura 13. Peroxidación de ácidos grasos insaturados

II.7.4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO: RADICAL SUPERÓXIDO

A. Introducción

El oxígeno es esencial para la vida de los organismos aeróbicos. Este juega un papel vital como aceptor terminal de electrones durante la respiración, aunque debido a su naturaleza biradical, el oxígeno y sus metabolitos son potencialmente tóxicos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) constituyen un grupo que incluye tanto radicales ($\cdot\text{OH}$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$ y $\text{O}_2^{\cdot-}$) como no radicales ($^1\text{O}_2$, O_3 , HOCl , H_2O_2 y ONOO^-). Las especies que contienen nitrógeno se pueden denominar alternativamente como RNS.

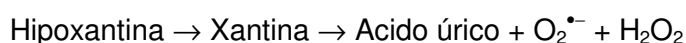
Los radicales libres son especies químicas que contienen un único electrón desapareado en una órbita externa. Esta situación le confiere una extrema inestabilidad y reactividad, con lo que reacciona con

sustancias químicas tanto inorgánicas como orgánicas (proteínas, lípidos, carbohidratos), y en especial con moléculas clave de las membranas y con ácidos nucleicos. Además, los radicales libres permiten iniciar reacciones autocatalíticas, por lo que las moléculas con las que reaccionan se convierten ellas mismas en radicales libres capaces de propagar la cadena de lesión. El electrón desapareado puede asociarse casi con cualquier átomo, pero los radicales libres basados en el oxígeno, carbono y nitrógeno son los de mayor importancia biológica [Góngora, 2002; Schinella et al., 2004].

Desde un punto de vista biológico, las tres especies de oxígeno más importantes son el superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\bullet OH$). Estos pueden producirse por la actividad de una variedad de enzimas oxidativas en diferentes lugares de la célula, como citosol, mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y membranas plasmáticas.

B. El radical superóxido

El radical superóxido es el primer producto de la reducción univalente del oxígeno. Supone el primer radical formado y además de ser activo por sí mismo en el fenómeno inflamatorio, da lugar a otras especies oxigenadas de importancia. La xantina oxidasa (XOD) es capaz de generar $O_2^{\bullet-}$ *in vivo* por la oxidación de productos que provienen del catabolismo de las bases púricas a través de la siguiente reacción:



Debido a su carácter reductor, el $O_2^{\bullet-}$ generado en esta secuencia de reacciones puede reducir compuestos como el azul de nitrotetrazolio (NBT), que al ser reducido por el $O_2^{\bullet-}$ forma un cromóforo con un máximo de absorción a 560 nm. Aquellos compuestos captadores de radical $O_2^{\bullet-}$ disminuirán la velocidad de formación de dicho cromóforo.

Es conveniente descartar una posible interferencia del extracto con la enzima mediante una modificación del ensayo. Igualmente se ha de determinar si el mismo extracto puede comportarse como reductor del NBT. Se realiza la determinación cinética del aumento de la absorbancia durante 2 minutos. Los resultados se expresan como porcentajes de inhibición de la reducción de NBT [Prieto et al., 2001; Góngora, 2002; Schinella et al., 2004].

II.8. INFLAMACIÓN: PROTOCOLOS *IN VIVO*

II.8.1. INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios es importante el empleo de modelos experimentales en animales, ya que dependiendo del protocolo experimental, los resultados se pueden en parte extrapolar al posible comportamiento en humanos. Existen varios tipos de protocolos en función de la forma de aplicación, agente irritante utilizado o duración del proceso inducido [Ríos et al., 2004].

- En función de la forma de aplicación se emplean métodos que provocan una irritación tópica, aguda o subcrónica y son válidos para el estudio de sustancias activas en procesos inflamatorios de piel y mucosas. La administración oral o parenteral es útil para el estudio de agentes de efecto sistémico, independientemente del agente irritante.
- El agente irritante varía en función del modelo que se quiera mimetizar, puede ser AA, TPA, serotonina (5-HT), histamina, carragenina, bradicinina (BK), PLA₂, entre otros. Unos de administración tópica y otros de empleo parenteral.
- La duración del proceso y del tratamiento va a condicionar la posible utilidad del extracto o agente antiinflamatorio. En algunos procesos

agudos se cuantifica el edema inducido, que a veces dura minutos y otras horas. Otros procesos inducen una auténtica inflamación, por lo que además de edema se pueden valorar otros parámetros, como enzimas inducidas, o mediadores liberados.

La evaluación del efecto farmacológico se puede hacer mediante la medición del espesor de la oreja o pata inflamada (derecha) y su comparación con la oreja o pata no inflamada (izquierda), o bien por la diferencia de peso entre una sección calibrada de las orejas, en este caso se requiere el sacrificio previo del animal. El porcentaje de inhibición del edema se refiere al grupo control (no tratado) al cual se le administra solamente el agente irritante (100% de inflamación). Es imprescindible comparar el resultado con una sustancia o fármaco de referencia [Ríos et al., 2004].

A continuación se recopilan los métodos más útiles en la búsqueda de nuevos agentes antiinflamatorios, especialmente se citará su aplicación al estudio de extractos vegetales y productos naturales.

III.8.2. Edema agudo en oreja de ratón inducido por AA

La administración tópica del AA provoca un edema de corta duración, con un comienzo rápido asociado al incremento de los niveles de PGs, TXB₂ y LTB₄, con un ligero aumento de los niveles de LTC₄. Varios minutos después de su aplicación, comienza la vasodilatación, a los 10 min se incrementa la permeabilidad vascular, desarrollándose el edema que alcanza su máximo al cabo de 1 h y desapareciendo prácticamente a las 6 h, aunque queda un eritema residual [Young y De Young, 1989]. Según la concentración de AA administrada en la oreja del ratón, el metabolismo de éste puede dirigirse hacia la vía de la COX o hacia la vía de la LOX. A concentraciones bajas predominan los metabolitos de la vía

COX, mientras que a dosis altas los metabolitos que predominan son los de la vía LOX.

Desde un punto de vista histológico, a los 30 min se observa estasis sanguínea y a los 60 min se aprecia claramente en la dermis la infiltración de células polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN). El número de células infiltradas comienza a disminuir a las 3 h, desapareciendo casi completamente a las 6 h. El AA apenas estimula la actividad mitótica epidérmica y la síntesis de DNA, por lo que no hay hiperplasia epidérmica. El estudio bioquímico demuestra que el AA es rápidamente metabolizado (aproximadamente 15 min), dando lugar a la formación de eicosanoides, principalmente PGE₂, LTC₄ y LTD₄. La reducción del edema por la administración tópica de agentes activos está relacionada con la inhibición de la formación de mediadores producidos por la LOX, siendo poco efectivos los inhibidores de la COX. En ningún caso se puede extrapolar el resultado de inhibición de edema con un posible mecanismo de acción, debido a la poca selectividad del método. Como fármaco de referencia o control positivo en este test se emplean ácido nordihidroguayarático (NDGA) o fenidona, dos inhibidores de la LOX [Young y De Young, 1989].

III.8.3. Edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA

El TPA es un potente agente flogógeno y promotor de tumores que se encuentra en el aceite de croton (*Croton tiglium* L.). La administración tópica de TPA provoca un edema agudo con infiltración leucocitaria. El TPA actúa a través de la activación de la proteincinasa C (PKC), dependiente de Ca²⁺ y fosfolípidos. La PKC desempeña un papel importante en la transducción de señales de una gran variedad de sustancias que activan funciones celulares y de proliferación. La enzima es activada por diacilglicerol (DAG), mediador liberado a partir de

inositol-fosfolípidos de la membrana. El TPA y otros ésteres del forbol cuando se intercalan en la membrana pueden actuar como sustitutos del DAG, activando la PKC de forma más permanente que el mediador endógeno, ya que el TPA es difícilmente degradable. La PKC activada actúa a diferentes niveles, incluyendo la liberación de AA, formación de prostanoídes, incremento de radicales libres y síntesis de diversas proteínas proinflamatorias [Young y De Young, 1989].

Tras la aplicación de TPA en oreja de ratón, se produce un eritema y vasodilatación entre 1-2 h, y a las 3-4 h aumenta el grosor como consecuencia de la extravasación de líquido, siendo el edema máximo a las 6-8 h. Transcurridas 12-14 h el edema desaparece, aunque la vasodilatación y el eritema persisten hasta las 24-48 h. A nivel histológico se observa agregación plaquetaria a las 2 h, agregación y adherencia de leucocitos PMN a las células endoteliales entre 4-6 h, y migración hacia el tejido y desgranulación de mastocitos a partir de las 6 h. Al cabo de 6-24 h comienza el acúmulo de leucocitos en la dermis que dan lugar a abscesos subcorneales a las 48-72 h. Por último, tras 48-96 h se observa hiperplasia en la membrana basal epidérmica, debida al incremento del número de células en división.

El estudio bioquímico demuestra un incremento de AMPc, PGE₂ y PGE_{2 α} , además de actividad de la enzima ornitín Descarboxilasa (ODC) y de síntesis proteica. Los fármacos de referencia más adecuados son los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, como indometacina, aunque los inhibidores de la COX, LOX y PLA₂ dan buenos resultados, además de corticoides y antihistamínicos. La ventaja del método es la rapidez y poca muestra necesaria para desarrollar un estudio e incluso una curva dosis-efecto. El principal inconveniente radica en la falta de selectividad, ya que un elevado número de fármacos y sustancias objeto

de análisis suelen dar resultados positivos en este test. Otro problema adicional es que el fármaco se administra conjuntamente con el irritante, lo que permitiría conocer un grado de protección, no de curación real.

III.8.4. Inflamación auricular inducida por aplicación repetida de TPA

El método desarrollado por Stanley et al. (1991), se basa en el empleo repetido de TPA como agente irritante, que desencadena un proceso prolongado, y caracterizado por el incremento del peso de la oreja, infiltración de células inflamatorias e hiperplasia epidérmica, características que pueden recordar algunos de los signos de enfermedades de la piel tales como la psoriasis. Algunos de los fármacos que bloquean el edema agudo inducido por aplicación tópica de TPA como podría ser indometacina, antihistamínicos H_1 y antihistamínicos H_2 , son incapaces de inhibir la inflamación crónica, lo que permite demostrar la selectividad del método. Se ha comprobado que los corticosteroides son los únicos fármacos capaces de reducir significativamente los tres parámetros de esta reacción inflamatoria, posiblemente porque reducen la actividad PLA_2 y la consecuente producción de eicosanoides estimulada por el TPA. En la aplicación repetida de TPA, inicialmente hay una reacción de características parecidas al edema agudo. El décimo día, aparece un elevado peso de la oreja que parece ser debido, no sólo al edema dérmico sino también a la hipertrofia dérmica, la infiltración celular y posible fibrosis [Stanley et al., 1991]. La ventaja del método es que los fármacos se administran una vez que ya se ha producido la lesión, por lo que los resultados pueden ser más relevantes desde el punto de vista clínico. Es un buen modelo para ensayar antiinflamatorios tópicos.

El método, considerado un modelo que mimetiza procesos crónicos o subcrónicos de inflamación cutánea, tiene la gran ventaja de que el compuesto objeto de estudio se aplica cuando el proceso inflamatorio ya está en curso, lo que ocurre en la realidad terapéutica. El modelo es válido para la evaluación de fármacos que actúen como los corticosteroides y también se han descrito buenos resultados con los inhibidores selectivos de la producción de LTs. El TPA se aplica 5 veces durante 10 días. El tercer día se observa un aumento del espesor de la epidermis e infiltración de PMN, hay edema, hiperplasia, infiltración celular y fibrosis. En el cuarto día la hiperplasia ya es uniforme.

Es un buen método, muy selectivo y que permite estudiar potenciales fármacos con actividad en diversas patologías que cursan produciendo dermatitis. Además siempre actúan cuando el proceso inflamatorio está establecido, es decir actúan como curativos [Stanley et al., 1991].

III.8.5. Reacción de hipersensibilidad retardada en oreja de ratón inducida por oxazolona

La oxazolona es un compuesto alergénico que penetra en la piel y se conjuga con las proteínas de las células epidérmicas, que son las causantes de la sensibilización. En una segunda exposición al alérgeno hay reclutamiento de células que migran al lugar del segundo contacto, liberando mediadores proinflamatorios y radicales libres, los cuales pueden agravar el estado patológico del tejido inflamado. La oxazolona afecta únicamente a determinadas áreas, caracterizadas por una necrosis epidérmica importante en los orificios de los folículos pilosos, seguida de acumulación de PMN en la capa epidérmica donde se ha producido la necrosis. Los PMN se acumulan en las pústulas intraepidérmicas y se extienden hacia la región subepidérmica. Si se trata con un fármaco adecuado, hay regeneración epidérmica y

reducción gradual del número de leucocitos en la dermis, pero si el tratamiento no es eficaz puede haber pérdida de porciones de tejido auricular por necrosis [Young y De Young, 1989]. Los corticoides, debido a sus propiedades antiinflamatorias e inmunodepresoras, son los fármacos más efectivos en este protocolo experimental, reduciendo tanto la fase de inducción como la lesión inflamatoria. Este protocolo es muy exigente en cuanto a los resultados, ya que a diferencia de los procesos agudos, solo un número limitado de compuestos son activos.

III.8.6. Otros protocolos de hipersensibilidad retardada

Existen otros protocolos experimentales de hipersensibilidad retardada menos agresivos o de menor duración, por lo que se les prefiere en algunos estudios. Ejemplos como el dinitroclorobenceno (DNCB) o dinitrofluorobenceno (DNFB), pueden sustituir a la oxazolona, mientras que la reacción frente a eritrocitos de cordero (SRBC), se emplea para detectar reacciones alérgicas tipo tuberculínicas.

III.8.7. Edema inducido por carragenina en pata de ratón

En el método original se utilizaba la rata como animal de experimentación. Sugishita et al., en 1981 adaptaron el método para el estudio en ratón, lo que es de máxima utilidad por el ahorro en animales y productos a ensayar. La adaptación del método requiere la administración oral de los productos en estudio, para evitar un falso resultado debido al efecto contrairritante que se puede producir por la administración intraperitoneal. El método consiste en provocar un edema en la región subplantar por la administración de λ -carragenina. En una primera fase (0-1 h) se inicia el proceso inflamatorio por la liberación de aminas y péptidos vasodilatadores (histamina, serotonina y bradicinina). En una segunda fase (1-6 h) se liberan prostaglandinas y hay infiltración de neutrófilos, cuya activación libera otros mediadores, incluyendo

radicales libres que potencian la respuesta inflamatoria. El máximo es aproximadamente a las 3 h, por lo que se aconseja la lectura del edema a 1, 3 y 5 h después de inyectar el agente irritante. En la fase tardía, comprendida en el periodo que va desde la 1ª hasta la 5ª hora, es cuando los AINEs tienen mayor efecto, lo que demuestra que el proceso está mediado básicamente por la COX inducida o COX-2.

El método permite estudiar compuestos que se administran vía oral, lo que supone una forma común de administración en la práctica terapéutica. También sirve para el estudio de compuestos cuyo mecanismo de acción pueda estar relacionado con la inhibición de la actividad COX o afecte a la inducción de la enzima. El empleo de ratón en vez de rata ha simplificado el protocolo experimental.

III.8.8. Edema inducido por fosfolipasa A₂ en pata de ratón.

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) constituyen una familia de esterasas que hidrolizan el enlace acil-éster del carbono 2 de glicerofosfolípidos liberando ácidos grasos. Las PLA₂ se clasifican en secretoras (sPLA₂), citosólicas (cPLA₂) o independientes de calcio (iPLA₂). Las más estudiadas son las sPLA₂, que tienen un peso molecular de 14 kDa aproximadamente, son dependientes de calcio, y a este grupo pertenecen las enzimas purificadas de venenos (serpiente, abeja) y jugo pancreático de mamíferos [Glaser K, 1995; Balsinde et al., 1999]. Por su acción sobre los fosfolípidos de membrana da lugar a un lisofosfolípido y un ácido graso libre. Cuando el ácido graso es el ácido araquidónico, proporciona el sustrato para la biosíntesis de eicosanoides, mediadores lipídicos de la inflamación. Por otro lado la liberación de AA a partir de 1-O-*O*-alquil fosfatidilcolina origina una cantidad equimolecular de lisofosfatidilcolina, lo cual por acción de una acetil transferasa se convierte en factor activador de plaquetas (PAF) uno de los mediadores

lipídicos inflamatorios más potentes. El PAF es un agente quimiotáctico y formador de edema que también produce agregación plaquetaria y está implicado en la patogénesis de diversas enfermedades [Mukherjee et al., 1992]. La PLA₂ constituye, por tanto, un factor limitante para la producción de mediadores pro-inflamatorios, cuya inhibición puede proporcionar su supresión, lo que la convierte en un importante objetivo terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y otras lesiones tisulares [Balsinde et al., 1999]. Además se ha demostrado en el test del edema en pata de ratón, que las PLA₂ son potentes agentes pro-inflamatorios cuyo modo de acción es dependiente de la liberación de histamina y serotonina de los mastocitos y posiblemente de PAF [Cirino et al., 1989]. La administración subplantar de PLA₂ en el ratón, permite el estudio de agentes antiinflamatorios en cuyo mecanismo de acción esté implicada la inhibición de la enzima, la inhibición de la desgranulación de mastocitos o la actividad antiserotonínica. La fosfolipasa más comúnmente utilizada es la procedente del veneno de *Naja naja*, si bien actualmente se emplea el de *N. mossambica*, debido a la escasez de la primera. La administración de PLA₂ provoca la liberación de AA de lípidos de membranas y paralelamente una ruptura de las membranas de los mastocitos, provocando la salida de aminas vasoactivas que inducen un rápido edema, el cual se mide con un pletismómetro a diferentes tiempos para ver su evolución [Neves et al., 2003]. Fármacos inhibidores de la actividad PLA₂ como los corticoides, los inhibidores de la desgranulación de mastocitos y los antiserotonínicos, son los compuestos activos en este modelo experimental.

III.8.9. Edema inducido por serotonina en pata de ratón.

La administración subplantar de serotonina provoca un rápido edema, que se mide a los 12 min. El método se emplea con varios fines, uno el

detectar agentes que inhiben la respuesta de la serotonina, sin embargo no es lo más frecuente. El método se ha descrito principalmente para el estudio de agentes cuyo mecanismo está relacionado con el de los corticosteroides. La aplicación de fármacos o compuestos que necesitan un largo periodo de latencia, puede alargar en exceso un protocolo experimental. En este caso, la administración de serotonina acorta el periodo debido a su rápido efecto.

Sugishita et al. (1983) desarrollaron el método original para realizar estudios sobre posibles formas de actuación *in vivo* de corticosteroides, para lo cual se bloquean selectivamente el receptor esteroídico (progesterona), la transcripción (actinomicina D) o la síntesis de proteínas (cicloheximida). Actualmente se prefiere la administración de mifepristona en vez de progesterona, por ser más selectivo como antagonista del receptor esteroídico [Recio et al., 2004].

III.8.10. Otros protocolos experimentales.

En el estudio de agentes antiinflamatorios se pueden seleccionar otros agentes irritantes que permiten un conocimiento más selectivo de la forma de actuar de la sustancia objeto de estudio. Es el caso de los mediadores fisiológicos bradicinina o histamina, o los más selectivos resiniferatoxina, capsaicina y xileno, que provocan una inflamación de origen neurogénico, mientras que el empleo de fenilpropionato de etilo (EPP) permite estudiar agentes antiinflamatorios con un largo periodo de latencia, como son los corticosteroides [Ríos et al., 2004].

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. MATERIAL VEGETAL

III.1.1. *SCHINUS MOLLE*

Los frutos de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) se recolectaron en Septiembre de 2001 por el Profesor J.L. Ríos, de las especies cultivadas en el jardín de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de València. Una muestra está depositada en el herbario del Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia (DF10/01).

III.1.2. *LYSIMACHIA FOENUM-GRAECUM*

La sumidad de *Lysimachia foenum-graecum* Hance (Primulaceae) fue recolectada en la provincia de Yunnan (China), en Agosto de 2001 y fue identificada por el Profesor Zhong-Wen Lin. Un ejemplar de la especie ha sido depositado en el Laboratory of Phytochemistry, Kuming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (KIB 2001-08-03 Lin).

III.1.3. *LITHOSPERMUM ERYTHRORHIZON*

La raíz de *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. (Boraginaceae) es una muestra comercial, comprada en el Chinese Phytotherapy Drugstore, Chinatown (Chicago, U.S.A.) y autenticada por el Dr. Junshan Li (College of Pharmacy, The Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A.). Una muestra ha sido depositada en el herbario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia (DF1/04).

III.1.4. FORSYTHIA SUSPENS

Los frutos de *Forsythia suspensa* (Thunberg) Valh (Oleaceae) proceden de una muestra comercial, donada por la empresa Asia Natural Products (Tarragona, España). La droga ha sido autenticada por el Dr. Llopis, director científico de la empresa. Una muestra está depositada en el herbario del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia (DF2/04).

III.1.5. ISODON XEROPHILUS

Las hojas de *Isodon xerophilus* (C.Y. Wu et H.W. Li) H. Hara (Labiatae) fueron recolectadas en Noviembre de 1998 en Yuanyang (Yunnan, China) y fue identificada por el profesor Zong-Wen Lin. Un ejemplar de la especie ha sido depositado en el herbario de Kuming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences (KIB 98-11-25 Lin).

III.2. MOLTURACIÓN

Las plantas se han molido en un Triturador de plantas (Black & Dekker, GA 1400E) hasta tamaño adecuado para cada muestra.

III.3. EXTRACCIÓN

Todas las especies se han extraído mediante maceración en frío, con el disolvente adecuado a cada muestra. El proceso se indica en el apartado correspondiente de la sección IV. Resultados.

III.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

III.4.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

A. Material

- Balanza (Sartorius H-110)
- Baño ultrasonidos (Branson 5210)
- Bomba de vacío (Büchi B-171)
- Cámaras cromatográficas de vidrio (Desaga)
- Capilares de 5 μ L (Blaubrand, IntraMARK)
- Columnas cromatográficas de vidrio (Afora)
- Cromatofolios de silicagel 60 200 UV254 (Macherey-Nagel)
- Estufa termostataada (Memmert)
- Lámpara UV (Spectroline CM-10)

B. Reactivos

- Acetato de etilo (AcOEt, Merck-PA)
- Ácido acético (AcOH, Panreac-PA)
- Ácido clorhídrico 35% (HCl, Panreac-PA)
- Ácido fórmico (HCOOH, Panreac-PA)
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄, Panreac-PA)
- Agua destilada
- Anisaldehído (Merck)
- Diclorometano (CH₂Cl₂, Merck-PA)
- Difetilborinato de 2-aminoetilo (Fluka)
- Dimetilsulfóxido (DMSO, SO₂(CH₃)₂, Merck-PA)
- Hexano (Panreac-PA)
- Metanol (MeOH, CH₃OH, Merck-PA)

- Polietilenglicol 4000 (PEG-4000, Panreac-PA)
- *n*-Butanol (BuOH, Panreac-PRS)
- Sulfato sódico anhidro (Na₂SO₄, Panreac-PA)

C. Métodos

La cromatografía en capa fina (CCF) es una técnica analítica de gran utilidad para la determinación de la complejidad y composición de un extracto. Es un buen método para establecer las fases estacionarias y fases móviles más apropiadas para el posterior fraccionamiento de los extractos por cromatografía en columna. También permite la identificación de componentes por comparación de los valores de R_f con los de patrones o productos ya conocidos. Cuando la cromatografía se ha desarrollado y se han eliminados los restos de fase móvil, se procede al revelado de la placa cromatográfica. Los reactivos utilizados y condiciones experimentales son:

Anisaldehído sulfúrico, como revelador general: anisaldehído (2,5 mL), ácido acético glacial (50,0 mL), metanol (425,0 mL), ácido sulfúrico (25,0 mL). La placa se pulveriza con el revelador y se calienta en estufa a 120 °C durante 10 minutos. Se observa a la luz del día.

Reactivo de NEU, como revelador de compuestos fenólicos, constituido por Difenilborato de aminoetilo (1% en MeOH). Se pulveriza la placa y se observa a la luz del día y posteriormente a la luz UV. A continuación se impregna la placa con PEG-4000 (5% en etanol) para hacer más persistente la coloración.

III.4.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

A. Material

- Columnas cromatográficas de vidrio de diferentes tamaños (Afora)
- Columnas HPLC Lichrospher C18 (250 × 4 mm, 5 µm, Merck)
- Cromatofolios de silicagel 60 200 UV254 (Macherey-Nagel)
- Cromatógrafo Merck-Hitachi system (Intelligent pump L-6200, Diode Array Detector L-7455 and Autosampler L-7200)
- Embudos Büchner con salida para vacío (Afora)
- Embudos de decantación (Afora)
- Lana de vidrio (Panreac)
- Pipetas Pasteur
- Papel de filtro (42 × 52 cm, 73 g, Albert)
- Rotavapor (461 R-Büchi)
- Sephadex® LH-20 (Pharmacia)
- Silicagel 60 (0,2-0,5 mm, Merck)
- Silicagel 60 (0,063-0,200 mm, Merck)
- Silicagel 60 H (Merck)
- Software HSM-7000 (Merck-Hitachi)

B. Reactivos

- Acetato de etilo (AcOEt, Merck-PA)
- Agua bidestilada
- Diclorometano (CH₂Cl₂, Merck-PA)
- Hexano (Panreac-PRS)
- Metanol (MeOH, CH₃OH, Merck-PA)
- *n*-Butanol (BuOH, Panreac-PA)

- Sulfato sódico anhidro (Na_2SO_4 , Panreac-PA)

C. Métodos

La cromatografía en columna (CC) es una técnica preparativa que permite el fraccionamiento de los extractos para aislar posteriormente sus componentes. Las fases estacionarias y móviles más resolutivas se determinan tras el estudio por CCF.

En la técnica clásica de cromatografía en columna se ha utilizado como fase estacionaria silicagel o Sephadex LH-20[®]. En el primer caso los componentes eluyen en orden creciente de polaridad, mientras que en el segundo caso el orden de elución depende del peso molecular de compuestos a separar, eluyendo en primer lugar las moléculas de mayor tamaño. El seguimiento de la elución se hace mediante CCF, reuniendo fracciones que poseen características cromatográficas análogas. Cuando la fase estacionaria es silicagel (0,063-0,200 mm), ésta se suspende en la fase móvil con la que se va a iniciar la separación en una proporción muestra/adsorbente 1:30 y se deja sedimentar durante 24 horas. Si la muestra es soluble se disuelve en la mínima cantidad de fase móvil y se distribuye homogéneamente por la cabeza de la columna. Si la muestra no es soluble en la fase móvil se prepara una cabeza seca. Para ello, la muestra se disuelve en la mínima cantidad de metanol, hasta total disolución y se le añade silicagel 60 (0,2-0,5 mm) en proporción 1:3. La mezcla se concentra en rotavapor y cuando está totalmente seca se deposita en la cabeza de la columna. También se han desarrollado técnicas alternativas como son la cromatografía líquida a vacío, la cromatografía de baja y media presión y la cromatografía líquida de alta resolución.

En la cromatografía líquida a vacío (VLC) se utiliza una columna específica en forma troncocónica similar a un embudo Büchner, con

placa porosa. Se acopla a un matraz cónico con salida a vacío que se controla por una llave de paso de tres vías. La fase estacionaria utilizada es silicagel 60 H. El adsorbente se carga en el recipiente de forma uniforme, luego se le aplica el vacío y el adsorbente se comprime manualmente. Una vez empaquetada la fase estacionaria se pasa una cierta cantidad de la fase móvil con que se va a iniciar la separación. Cuando la fase estacionaria está completamente seca se introduce cuidadosamente la muestra, bien disuelta en la mínima cantidad de fase móvil o bien si es insoluble se prepara una cabeza seca, depositándola sobre la superficie del adsorbente. A continuación se le añade la fase móvil y se le aplica el vacío. Se van recogiendo fracciones en matraces de 250 o 500 mL [Pelletier et al., 1986]. Al igual que en el caso anterior, se hace el seguimiento por CCF. Las fracciones similares se reúnen y se concentran.

La cromatografía de alta resolución (HPLC) es una técnica de gran sensibilidad y eficacia, proporcionando información cualitativa y cuantitativa en una sola operación. La fase estacionaria de reparto suele estar químicamente ligada a un polímero poroso y se encuentra en el interior de una columna metálica perfectamente rellena, a través de la cual pasa la fase móvil a una considerable presión. El instrumental que se requiere es caro, puesto que se necesita un sistema de bombeo especial y todas las conexiones deben ser capaces de soportar la presión a la que se trabaja. El eluyente es una mezcla de disolventes cuyas proporciones permanecen constantes (separación isocrática), o pueden variar en función del tiempo (separación en gradiente). Los compuestos se detectan al salir de la columna, en nuestro caso con un detector de fotodiodos (DAD), aunque puede ser de otro tipo (índice de refracción, fluorimetría). El conjunto se completa con un software específico para analizar la información registrada.

Según se pretenda realizar una separación analítica o preparativa, el tamaño de la columna puede variar. El tamaño de partícula del relleno de las columnas para HPLC es muy pequeño y fácilmente contaminable por impurezas, por lo que las muestras a separar deben estar perfectamente filtradas antes de ser inyectadas en la columna. En nuestro caso se utilizan columnas de fase reversa (RP-18) de un tamaño de partícula de 5 μm .

III.4.3. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

A. Material

- Cubetas de cuarzo
- Espectrómetro de masas (VG Auto Spec Fisons)
- Espectrómetro de RMN 300 y 400 MHz (Varian Unity)
- Espectrofotómetro UV-VIS (Beckman DU640)
- Polarímetro Perkin-Elmer 241
- Tubos de RMN (UP y HP, Dr. Glaser AB Basel)

B. Reactivos

- Acetato sódico (AcONa, Merck-PA)
- Ácido clorhídrico 35% (HCl, Panreac-PRS)
- Cloroformo deuterado, (CDCl_3 99,8%, Baker)
- Metanol deuterado, (CD_3OD 99,8%, Sigma)
- Dimetilsulfóxido deuterado, ($\text{DMSO-}d_6$ 99,9%, Sigma)
- Metanol (MeOH, CH_3OH , Merck-PA)
- Metóxido sódico (MeONa)
- Tricloruro de aluminio (AlCl_3 , Merck-PS)

C. Métodos

Poder rotatorio. El poder rotatorio de un líquido es el ángulo de giro del plano de la polarización de la luz cuando se hace pasar un rayo de luz

polarizada a través de una muestra de dicho líquido. Este giro puede ser en el sentido de las agujas del reloj o en sentido contrario. Numerosos productos sólidos de origen vegetal son ópticamente activos, y se puede determinar el poder rotatorio de sus disoluciones. La medida se hace en un polarímetro, empleando metanol como disolvente. Posteriormente se calcula el valor de la rotación observada $[\alpha]_D$ empleando la fórmula :

$$[\alpha]_D = \frac{\alpha}{L \times C}$$

Siendo $[\alpha]_D$ = rotación observada; L = longitud atravesada por el haz de luz (dm) y C = concentración (g/L)

Espectroscopía Visible-Ultravioleta (UV). La espectrofotometría de absorción visible/UV es una técnica muy empleada en el análisis estructural de compuestos fenólicos principalmente, y sobre todo de flavonoides [Mabry et al., 1970]. Las ventajas de este método son la escasa cantidad de producto necesario, la gran información que proporciona sobre grupos estructurales y lugar de sustitución, y la sencillez del equipo necesario. La disolución metanólica del producto en estudio permite obtener un espectro que indica la estructura básica del compuesto y que se convertirá en patrón de referencia en comparaciones posteriores tras añadir los reactivos de desplazamiento. Los espectros UV se realizan en un espectrofotómetro apropiado, registrando el intervalo comprendido entre 210 y 500 nm. La disolución preparada se introduce en una cubeta de cuarzo de 1×1 cm, empleando metanol como líquido de compensación para ajustar la línea base. Sobre esta disolución metanólica se añaden los siguientes reactivos: AlCl_3 (5% (p/v) en MeOH) y HCl (17,5% (v/v) en MeOH); MeONa (2,5% (p/v) en MeOH) y esperar 5 min y AcONa. Se registran los cambios tras la adición de cada uno de ellos [Markham, 1982]. La observación de los

máximos de absorción, la intensidad de las bandas y los desplazamientos obtenidos tras la adición de los reactivos permiten determinar los sustituyentes de la estructura base.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La espectroscopía de RMN de protón (^1H -RMN) permite determinar la estructura de un compuesto orgánico mediante la medición de los momentos magnéticos de los protones y sus acoplamientos. La espectroscopía de carbono 13 (^{13}C -RMN) orienta sobre el esqueleto carbonado de la molécula, carbonos sustituidos, tipos de radicales, sustituyentes, etc. La ^1H -RMN y ^{13}C -RMN son en la actualidad las herramientas fundamentales para la elucidación estructural de compuestos orgánicos. El espectro de RMN-DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*) es el método de elección para determinar el tipo de sustitución de los átomos de carbono (CH_3 , CH_2 , CH o cuaternarios). Los análisis espectrales para la elucidación estructural se han realizado en el Servicio de Espectroscopía de la Universitat de València, en el Laboratory of Phytochemistry (Kumming, China) y Strathclyde University (Glasgow, Reino Unido).

Espectrometría de Masas (EM). Los datos obtenidos del EM completan la información derivada del espectro de RMN. Proporcionan información sobre el peso molecular y permite la determinación estructural mediante el análisis de los fragmentos del ion molecular (M^+) y de otros iones abundantes. La espectrometría de masas de impacto electrónico (EM-IE) requiere la previa volatilización de las muestras y se basa en la separación de partículas moleculares o atómicas ionizadas, aceleradas por un campo eléctrico y dispersadas por un campo magnético según su relación masa/carga. La espectrometría de masas de bombardeo de átomos rápidos (FAB = *Fast Atom Bombardment*) es una técnica basada en el bombardeo con átomos (o iones) sobre una matriz, previamente

cargada con un líquido viscoso, que contiene el compuesto a analizar. Los fragmentos obtenidos tras el bombardeo son separados en función de su relación masa/carga. Cada uno de ellos produce una señal que se registra. El patrón de señales permite determinar tanto la masa molecular del compuesto, como la estructura general. Es útil para ionizar moléculas no volátiles, no derivatizadas, polares y con elevado peso molecular.

III.5. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS *IN VIVO* Y *EX VIVO*

III.5.1. ANIMALES

Se utilizan ratones albinos hembras de la raza Swiss, procedentes de la compañía Harlan Interfauna Ibérica, S.L. (Barcelona), de 3 meses de edad y peso entre 25-30 g. Una vez recibidos, se estabulan bajo condiciones perfectamente estandarizadas: temperatura 22 ± 3 °C, fotoperiodo 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial y agua *ad libitum*. Los animales se distribuyen a razón de 5 ó 6 ratones por grupo en estudio.

III.5.2. MATERIAL

A. General

- Balanza de precisión (Sartorius H-110)
- Baño de ultrasonidos (Branson 5210)
- Centrífuga (Eppendorf 5810R)
- Estufa termostataada (Selecta)
- Homogeneizador (Poli-trón, Kinematica)
- Jeringuillas para administración *p.o.*, *s.c.* e *i.p.*

- Lector de microplacas (Labsystem multiskan EX)
- Material quirúrgico
- Micrometro digital (Mitutoyo Serie 293)
- Micropipetas automáticas: Nichiryo de 20 y 1000 μL , y Volac H3 de 100 μL
- Microplacas de 96 pocillos
- Microscopio (RML-5, Askania)
- pH-metro (micropH 2000, Crison)
- Pletismometro (Ugo Basile 7150)
- Sacabocados (7 mm de \varnothing)
- Tubos de microcentrífuga de 1,5 mL (Eppendorf)

B. Histología

- Material para tinción
- Microscopio (RML-5, Askania)
- Microtomo
- Portaobjetos 76 \times 26 mm (Chance proper LTD, Blue Star)

III.5.3. REACTIVOS

A. Pruebas *in vivo*

- Aceite de oliva 0,4^º estéril (Carbonell[®])
- Acetona (CH_3COCH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, Merck-PA)
- Acetato sódico (AcONa, Panreac-PA)
- 13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA, Sigma)
- Ácido araquidónico 99% (AA, Sigma)
- Ácido nordihidroguayarático (NDGA, Sigma)
- Agua bidestilada
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB, Sigma)

- λ -Carragenina (Sigma)
- Ciproheptadina (Sigma)
- Dexametasona (Sigma)
- Etanol 96% (EtOH, Panreac-PA)
- Formol (HCOH 40%, Panreac-PA)
- Fosfolipasa A₂ (PLA₂) de Naja mossambica (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- N,N-dimetilformamida (DMF, Sigma)
- Sales inorgánicas (Panreac-PRS)
- Serotonina (5-HT, Fluka)
- Suero fisiológico
- Tetrametilbenzidina HCl (18,4 mM) en dimetilformamida acuosa al 8% (TMB, Sigma)
- Tween 80 (Fluka)

B. Mieloperoxidasa

- Acetato sódico (AcONa, Panreac), 1,46 M, pH=3
- Agua oxigenada 3% (Sigma)
- Tampón fosfato salino, pH = 7,4 (NaCl:138 mM; KCl: 2,7 mM)
- Tampón fosfato sódico 80 mM, pH = 5,4 (KH₂PO₄: 10,596 g/L; Na₂HPO₄·2H₂O: 14,256 g/L)
- Tampón fosfato sódico 0,22 mM, pH = 5,4 (KH₂PO₄: 29,964 g/L; Na₂HPO₄·2H₂O: 39,204 g/L)

C. Histología

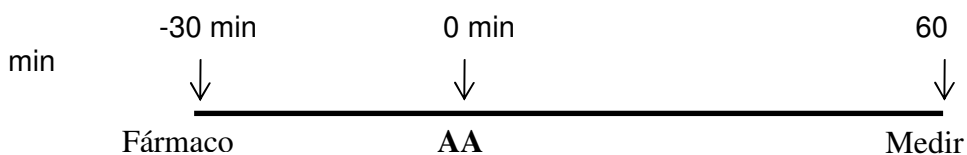
- Ácido peryódico de Schiff (Sigma)
- Azul de toluidina (Sigma)
- Eosina (Panreac-PA)

- Formol (Formaldehído al 4%, Panreac-PA)
- Hematoxilina (Panreac-PA)
- Parafina (Histosec, Merck)
- Tinte tricrómico (Sigma)

III.5.4. MÉTODOS

A. Edema agudo inducido por ácido araquidónico (AA)

Se sigue el método de Young y De Young (1989), que consiste en administrar 2 mg de AA/oreja disueltos en 20 μ L de acetona a razón de 10 μ L por cada lado de la oreja. El edema máximo se alcanza 1 h después de la aplicación del agente irritante. Los extractos (1 mg/oreja) y los productos (0,5 mg/oreja) se ensayan disueltos en 20 μ L de acetona o EtOH al 80%, administrándolos 30 min antes de la aplicación del AA, a razón de 10 μ L a cada lado de la oreja. El fármaco de referencia utilizado es el NDGA a la dosis de 2 mg/oreja. El espesor de la oreja se mide con un micrómetro digital antes (orejas no inflamadas) y 1 h después de la inducción de la inflamación por aplicación del AA. La diferencia entre estos dos valores determina el edema.



Esquema de administración en el edema auricular por AA

La actividad antiinflamatoria se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición (%I) del edema, según la expresión matemática:

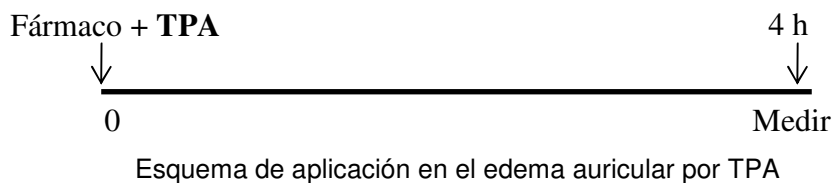
$$\%I = \frac{\Delta E_c - \Delta E_p}{\Delta E_c} \times 100$$

Siendo: ΔE_c = media aritmética del incremento de espesor de las orejas en el grupo control y ΔE_p = media aritmética del incremento de espesor de las orejas en el grupo problema.

Se determina la desviación típica y el error tipo de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, usando el test de la *t* de Dunnett (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

B. Edema agudo inducido por TPA en oreja de ratón

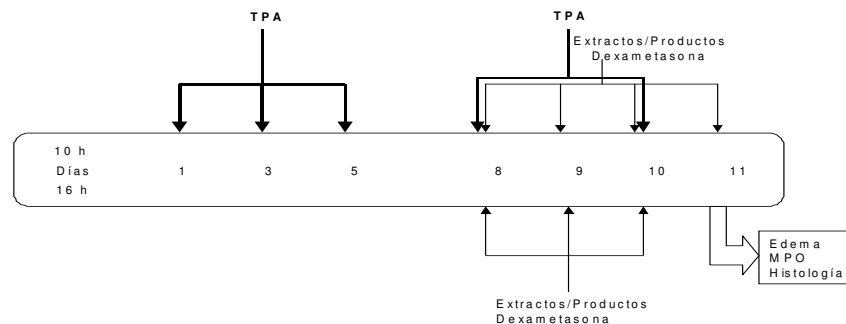
Se sigue la técnica descrita por Young y De Young (1989) modificada por Payá et al. (1992). En este modelo de inflamación aguda se administran 2,5 μg /oreja de TPA disueltos en 20 μL de acetona, a razón de 10 μL por cada lado de la oreja del ratón. El edema es máximo 4 h después de la aplicación del agente irritante. Los extractos (1 mg/oreja) y los productos ensayados (0,5 mg/oreja), disueltos en 20 μL de acetona, EtOH 80% o EtOH 70% se administran simultáneamente con TPA, a razón de 10 μL a cada lado de la oreja. El fármaco de referencia utilizado es indometacina a la dosis de 0,5 mg/oreja.



El espesor de las orejas se mide con un micrómetro digital antes (orejas no inflamadas) y 4 h después de la inducción de la inflamación por aplicación del TPA. La diferencia entre estos dos valores determina el edema [Recio et al., 2000]. La actividad antiinflamatoria se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la fórmula expresada en el apartado III.5.4.A.

C. Inflamación crónica auricular inducida por aplicación repetida de TPA

Se sigue el método propuesto por Stanley et al. (1991). Los animales se distribuyen aleatoriamente en grupos de 5. El TPA se administra a la dosis de 2 μg /oreja en 20 μL de acetona, depositando 10 μL a cada lado de las dos orejas del ratón. El agente irritante se aplica tópicamente cinco veces en días alternos por la mañana. Los extractos (1 mg/oreja) y los productos (0,5 mg/oreja) disueltos en acetona o EtOH 80% y la dexametasona (0,05 mg/oreja) disuelta en acetona se aplican a razón de 10 μL en cada lado de las dos orejas del ratón, durante la segunda semana con dos dosis diarias, el último día de experiencia sólo se aplican por la mañana y 6 horas más tarde se sacrifican los animales por desnucamiento y se extraen porciones de las orejas con un sacabocados. Se pesan las orejas y se determina el edema por diferencia de peso con respecto a un grupo que ha recibido sólo acetona. A continuación, ocho orejas de cada grupo se introducen en una solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) y se congelan para, posteriormente determinar la actividad mieloperoxidasa (MPO). Dos orejas de cada grupo se introducen en formol y se destinan al estudio histológico.



Esquema de aplicación de los extractos y productos en la inflamación producida por aplicación repetida de TPA

La actividad antiinflamatoria se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la siguiente expresión matemática:

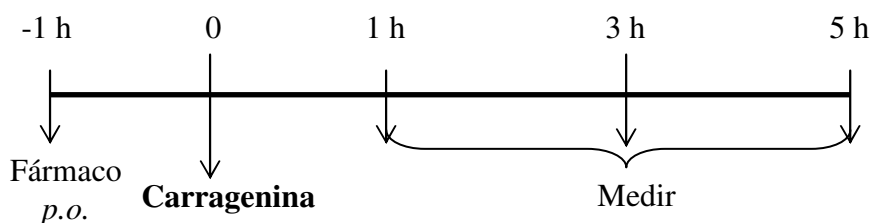
$$\%I = \frac{\Delta P_c - \Delta P_p}{\Delta P_c} \times 100$$

Siendo ΔP_c = (media de pesos de las orejas tratadas con TPA) – (media de pesos de las orejas tratadas con acetona), ΔP_p = (media de pesos de las orejas tratadas con el problema) – (media de pesos de las orejas tratadas con acetona). Se determina la desviación típica y el error tipo de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, usando el test de la t de Dunnett (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

D. Edema plantar inducido por PLA₂

Se sigue el protocolo descrito por Neves et al. (1993). Los productos (80 mg/kg) y la ciproheptadina (5 mg/kg) se disuelven en 0,1 mL de EtOH/Tween 80/H₂O (1:1:10) y se administra i.p. 30 min antes de la aplicación de la PLA₂. Cuando se emplea la vía oral, los extractos (200 mg/kg) y ciproheptadina (10 mg/kg) se administran 1 h antes de la inyección de la PLA₂ en la pata del ratón disueltos en 0,5 mL de EtOH/tween 80/H₂O (1:1:10). Se administran 25 μ L de la disolución de PLA₂ (1 μ g/pata, 1,18 unidades) en la aponeurosis plantar derecha del ratón y en la izquierda se le administra el mismo volumen de suero fisiológico. El volumen de la pata inflamada (derecha) y no inflamada (izquierda) se mide con un pletismómetro 30, 60 y 90 min después de la administración del agente inductor. El edema se expresa como la diferencia del incremento de volumen de las patas.

PGs y más recientemente ha sido atribuida a la inducción de la COX-2 en la pata. La infiltración local de neutrófilos y su activación puede contribuir a esta respuesta inflamatoria, al producir entre otros mediadores, radicales de oxígeno como el anión superóxido o el radical hidroxilo [Salvemini et al., 1996]. En la fase tardía es cuando el edema se hace máximo y estable (entre 1-3 h). Este es el momento adecuado para el ensayo de fármacos AINEs, los cuales reducen el edema actuando sobre la síntesis de productos derivados del AA. Se sigue el protocolo descrito por Sugishita et al. (1981). Los productos (80 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) se administran p.o. disueltos en EtOH/Tween 80/H₂O (1:1:10). Una hora después de la administración oral de los compuestos a ensayar se administra en la aponeurosis plantar derecha 25 µL de la pseudodisolución de carragenina (3% p/v en suero salino) y a la pata izquierda se le administra el mismo volumen de suero fisiológico. El volumen de la pata inflamada (derecha) y no inflamada (izquierda) se mide con un pletismómetro 1, 3 y 5 h después de la administración de carragenina. El edema se expresa como la diferencia entre el incremento de volumen de las patas.



Esquema de administración en el edema plantar por carragenina

La actividad antiinflamatoria se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, según la expresión matemática descrita en el apartado III.5.4.D.

F. Determinación de la actividad mieloperoxidasa

La mieloperoxidasa (MPO) es una enzima localizada en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs), cuya valoración permite obtener una estimación semicuantitativa de la infiltración celular producida en una respuesta inflamatoria, pudiéndose emplear como marcador del contenido de neutrófilos, debido a su abundancia en estas células [Suzuki et al., 1983]. A medida que el edema se desarrolla, las células inflamatorias se acumulan en la microcirculación de la oreja y migran hacia el tejido. Estas células suelen ser, mayoritariamente, PMNs al principio de la inflamación, para dar paso posteriormente a los monocitos. La medida de la infiltración celular se realiza comparando el número de células acumuladas en la oreja del grupo problema respecto al grupo control. Los corticosteroides administrados tanto oral como tópicamente son capaces de inhibir el edema y la infiltración leucocitaria originados tras aplicar un agente irritante como el TPA u oxazolona. Los inhibidores de la COX administrados por vía oral tienen poco efecto sobre el edema pero inhiben la infiltración leucocitaria de modo selectivo. Sin embargo, los inhibidores duales de COX y LOX administrados por vía oral sólo son activos frente a la infiltración leucocitaria [Young y De Young, 1989; Stanley et al., 1991].

El método seguido está basado en la técnica de Suzuki et al. (1983), modificada para su empleo en un lector de placas [De Young et al., 1989]. Las porciones tomadas de las orejas, se mantienen congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un eppendorf con 0,75 mL de HTAB al 2% en tampón fosfato sódico 80 mM. Se descongelan y se homogeneizan a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 seg. El homogenado se vierte de nuevo en el eppendorf, se lava el tubo del homogeneizado con 0,75 mL más de HTAB y se añade al eppendorf. El total (1,5 mL) se centrifuga a $11200\times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min. A $30\text{ }\mu\text{L}$

del sobrenadante se le añaden 100 μL de PBS, 85 μL de tampón $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 0,22 \text{ M}$, 15 μL de H_2O_2 0,017% y 20 μL de TMB 0,017%, dejando incubar por espacio de 3 min a 37 $^\circ\text{C}$. La reacción se detiene añadiendo 30 μL de AcONa 1,46 M en frío. La actividad MPO se determina midiendo la absorbancia a 630 nm. El porcentaje de inhibición de esta actividad se calcula según la expresión matemática:

$$\%I = \frac{\Delta A_c - \Delta A_p}{\Delta A_c} \times 100$$

Siendo ΔA_c = media aritmética de la absorbancia del grupo control, y ΔA_p = media aritmética de la absorbancia del grupo problema. Se determina la desviación típica y el error tipo de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, usando el test de la t de Dunnett (*P < 0,05; **P < 0,01). El protocolo seguido se describe en la siguiente tabla:

	Control	Problema
Sobrenadante (triplicado)	30 μL	30 μL
PBS	100 μL	100 μL
Tampón $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 0,22 \text{ M}$	85 μL	85 μL
H_2O_2 0,017%	15 μL	15 μL
TMB	20 μL	20 μL
Incubar a 37 $^\circ\text{C}$, 3 min Baño de hielo		
AcONa 1,46 M (pH = 3)	30 μL	30 μL
Medir la absorbancia a 630 nm		

G. Estudio histológico

El estudio histológico se ha realizado en el Departament de Patologia de la Facultat de Medicina bajo la direcció del Profesor Cerdá-Nicolás. Las porciones de las orejas previamente obtenidas (III.5.4.C) se conservan en formol. Cada muestra se corta longitudinalmente en mitades iguales y una mitad de ellas se embebe en parafina y se corta en secciones de 3 ó 4 μm . La tinció se realiza con hematoxilina/eosina, tinte tricrómico, ácido periódico de Schiff y azul de toluidina.

En las porciones de las orejas tratadas con el agente irritante, por ejemplo TPA, se determina la aparició de edema y su extensió, el número y tipo de células inflamatorias, la extensió del infiltrado y el tipo de lesión que aparece. Además, se observa si existe hiperplasia (se mide el espesor de la epidermis, desde la capa basal hasta el estrato córneo) y fibrosis. El espesor del epitelio se evalúa usando un objetivo de 100 \times y se expresa como la media \pm error estándar del número de capas epidérmicas desde la capa basal hasta el estrato granuloso, ambos incluidos. Un área representativa de la respuesta celular inflamatoria se selecciona por un contaje semicuantitativo de células con un objetivo de 40 \times , en 20 campos. Se cuentan las células inflamatorias, linfocitos, macrófagos y neutrófilos en la capa papilar y en la capa reticular dérmica/subcutánea [Giner et al., 2000].

III.6. PRUEBAS FARMACOLÓGICAS *IN VITRO*

III.6.1. ANIMALES

Se han empleado ratas hembras de la raza Wistar de tres meses de edad, con un peso de entre 180-200 g y machos de entre 200-250 g, procedentes de la cría efectuada en el estabulario de la Facultat de Farmàcia. Su desarrollo se realiza bajo condiciones perfectamente

estandarizadas: Temperatura 22 ± 3 °C, fotoperiodo 12/12 horas de luz/oscuridad; alimentación artificial estándar y agua ad libitum.

III.6.2. MATERIAL

- Baño termostatado con agitación (Julabo, SW 20)
- Baño de ultrasonidos (Brandsonic 5210)
- Cámara de contaje (Neubauer improved, Manrifeld)
- Centrífuga (Eppendorf 5810 R)
- Columnas Lichrolut C18, 100 mg, 1 mL (Merck)
- Columna Lichrospher C18 (250 × 4 mm, 5µm) (Merck) y
Precolumna Lichrospher C18 (4 x 4 mm, 5µm) (Merck)
- Controlador del sistema HSM-7000 (Merck-Hitachi) en un
ordenador Pentium 200 MMX-Windows® NT
- Cromatógrafo Merck-Hitachi system (Intelligent pump L-6200,
Diode Array Detector L-7455 and Autosampler L-7200)
- Estufa termostatada (Selecta)
- Hemocitómetro automático (Coulter MicroDiff II)
- Homogeneizador (Potter)
- Jeringas de 1, 5, 10 y 20 mL (Discardit II)
- Lector de microplacas (Labsystem Multiskan EX)
- Material quirúrgico
- Micropipetas automáticas de 5, 10, 100 y 1000 µL (Eppendorf y
Volac H3)
- Microscopio (Askania RML5, Alemania)
- pH-metro (Crison pH-2000)
- Sistema de extracción en fase sólida (Visiprep, Supelco)
- Sonicador (Branson 400 W)

- Válvula de inyección Reodyne[®] con bucle de 100 μ L
- Unidad Refrigeradora (Frigidor) acoplado a baño termostatado (Ultraterm, Selecta)
- Vórtex (MS2 Minishaker, IKA[®])

III.6.3. REACTIVOS

- 13-Acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA, Sigma)
- Ácido araquidónico (AA, Sigma)
- Ácido ascórbico (Sigma)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma)
- Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, Sigma)
- Acido tricloroacético (TCA, Panreac-PA)
- Acido trifluoroacético (TFA, Merck-PA)
- Agua bidestilada y ultrafiltrada
- Agua oxigenada 33% (H₂O₂, Sigma)
- Alopurinol (Sigma)
- 2-Amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol (TRIS, Sigma)
- Azul de nitrotetrazolio (NTB, Sigma)
- Azul Tripano (Sigma)
- 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT, Sigma)
- 2,[6]-Di-tert-butil-p-cresol (BHT, Sigma)
- Glucosa-6-fosfato (Sigma)
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma)
- Glucógeno de hígado bovino (Sigma)
- Hipoxantina (Sigma)
- Ionóforo de calcio A23187 (Sigma)
- Metanol (Gradient grade, Baker)
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT, Sigma)

- N-tert-butilbutoxicarbonil-L-alanina-p-nitrofenil éster (BOC, Sigma)
- Prostaglandina B₂ (PGB₂, Sigma)
- Pirogalol (Sigma)
- Sales inorgánicas (Panreac-PA)
- Reactivo de Bradford (Sigma)
- Xantina oxidasa (XOD, Sigma)
- Tampones y otras disoluciones

A. Tampones

PBS (Modificado por Dulbecco)	Na ₂ HPO ₄ 1,420 g KH ₂ PO ₄ 0,408 g NaCl 8,010 g pH = 7,27 H ₂ O c.s.p. 1000 mL	10 mM 3 mM 137 mM 4 °C
Tampón de incubación (IKP)	Na ₂ HPO ₄ 0,720 g KH ₂ PO ₄ 0,272 g NaCl 8,010 g KCl 0,201 g pH = 7,30 H ₂ O c.s.p. 1000 mL α-D-glucosa 1 g (en el momento de uso)	5 mM 2 mM 137 mM 2,5 mM 4°C
Tampón de lisis	Na ₂ EDTA 0,037 g KHCO ₃ 0,272 g NH ₄ Cl 8,300 g H ₂ O c.s.p. 1000 mL	0,1 mM 9,5 mM 157 mM 4° C
Solución de Hanks (HBSS) con Ca ²⁺ y Mg ²⁺	CaCl ₂ ·2H ₂ O 0,099 g MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,099 g KCl 0,4 g Na ₂ HPO ₄ 0,048 g KH ₂ PO ₄ 0,060 g NaCl 8,0 g pH = 7,4 H ₂ O c.s.p. 1000 mL α-D-glucosa 1 g (en el momento de uso)	1 mM 0,5 mM 5 mM 0,33 mM 0,44 mM 137 mM 4 °C 1 mg/mL

Tampón fosfato 10 mM	K ₂ HPO ₄ 1,742 g H ₂ O 500 mL pH = 7,4 KCl 11,5 g H ₂ O c.s.p. 1000 mL	4 °C
Tampón 0,1M Tris-HCl	Tris 3,028 g H ₂ O 200 mL pH = 7,4 H ₂ O c.s.p. 250 mL	4 °C
Tampón fosfato sódico 80 mM	KH ₂ PO ₄ 10,596 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 14,256 g pH = 5,4 H ₂ O c.s.p. 1000 mL	4 °C
Tampón fosfato sódico 0,22 M	KH ₂ PO ₄ 29,964 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 39,204 g pH = 5,4 H ₂ O c.s.p. 1000 mL	4 °C

B. Disoluciones

Ácido ascórbico 10 mM	Ácido ascórbico 17,6 mg H ₂ O 10 mL	
Azul tripano	Azul Tripano 0,5 g NaCl 0,9% 100 mL	Filtrar T ^a ambiente
BOC	3,2 mg en 1 mL de DMSO	Extemporánea
Ca ²⁺ (180 mM)	CaCl ₂ ·2H ₂ O 264,6 mg H ₂ O 10 mL	4 °C
Disolución de CCl ₄	1 parte de CCl ₄ / 4 partes de DMSO	
Disolución generadora de NADPH	KCl (0,15 M) 18 mL Tris-ClH (0,1M, pH 7,4) 12 mL H ₂ O 8 mL NADPNa 6 mg Glucosa 6-fosfato 55 mg pH = 7,4 Glucosa 6- <i>P</i> -deshidrogenasa 60 µL	Cf = 0,2 mM Cf = 4 mM Cf = 0,6 U Extemporánea No reutilizar

Glucógeno	Glucógeno (1mg/g de peso de la rata) PBS 10 mL Calentar a 40-50 °C agitando frecuentemente o baño de ultrasonidos hasta diluir		Extemporánea No reutilizar
Ionóforo de calcio (190 µM)	Ionóforo de calcio A23187 1 mg DMSO 1 mL		4 °C
Ionóforo de calcio (1,9 µM)	Solución 190 µM 100 µL PBS 900 µL		4 °C
MTT	MTT 5 mg PBS o H ₂ O 11 mL		Proteger de la luz - 20 °C
PGB ₂ madre	PGB ₂ 1 mg DMSO 1 mL		- 20 °C
PGB ₂ hija	Disolución madre 100 µL Metanol 5,9 mL		- 20 °C
TPA madre	TPA 5 mg DMSO 1 mL		- 20 °C
TPA disolución	TPA madre 13 µL HBSS con Ca ²⁺ y Mg ²⁺ 987 µL		- 20°C
Sulfato de hierro (II) 10 mM	FeSO ₄ ·7 H ₂ O 27,8 mg H ₂ O 10 mL		
Sulfato de hierro (II) 100 µM	FeSO ₄ ·7 H ₂ O (10 mM) 100 µL H ₂ O c.p.s. 10 mL		

III.6.4. MÉTODOS

A. Obtención de neutrófilos peritoneales de rata

Este tipo de célula se obtiene tras la inyección de glucógeno (1 mg/g peso corporal disuelto en 10 mL de PBS) en la cavidad peritoneal de la rata (fase de inducción). Para ello el animal es ligeramente anestesiado con halotano (en campana de aire). Inmediatamente, se inyecta la

disolución de glucógeno en la cavidad abdominal y se masajea suavemente en los costados de la rata de forma alternativa durante 1 min. Cuando el animal se recupera, se devuelve a su jaula con agua pero sin alimento sólido. Cuatro horas después la rata es sacrificada por dislocación cervical, previa anestesia. Se inyectan i.p. 20 mL PBS a 37 °C y se masajea el abdomen durante 5 min. Se abre el abdomen a lo largo de la línea alba y se recoge con una jeringa el líquido, introduciéndolo en tubos de 14 mL. Se lava la cavidad peritoneal 2 veces más con 20 mL de PBS. Los tubos se centrifugan a 300 ×g durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se elimina y se resuspenden las células en tampón de hemólisis. Se lava dos veces más con PBS centrifugando cada vez a 300 ×g durante 10 min a temperatura ambiente, hasta obtener un pellet que se reconstituye en 5 mL de IKP con glucosa.

B. Obtención de plaquetas y leucocitos humanos

Los concentrados sanguíneos humanos (buffy-coats) procedentes de donantes sanos, proporcionados por el centro de transfusiones de la Comunitat Valenciana, son la fuente de plaquetas y leucocitos o granulocitos. El volumen de cada bolsa se distribuye en tubos de 50 mL (15 mL de concentrado/tubo) y se añaden 30 mL de PBS a cada uno. Se centrifuga a 300 ×g, 22 °C durante 10 min, obteniéndose un sobrenadante rico en plaquetas y un pellet con eritrocitos y leucocitos. El sobrenadante (rico en plaquetas) es de nuevo centrifugado a 300 ×g, a 22 °C durante 10 min. Se recoge el sobrenadante en tubos de 15 mL, que son centrifugados a 1000 ×g, 22 °C durante 10 min. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden todos los pellets de plaquetas en 10 mL de IKP. Los pellets de leucocitos y hematíes se tratan con tampón de lisis y se centrifugan a 300 ×g, a 22 °C durante 10 min. Se desecha el

sobrenadante y se lava con PBS dos veces más, centrifugándose cada vez a 300 ×g, a 22 °C durante 10 min. Se reconstituyen en HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} .

C. Recuento de leucocitos y plaquetas

Se realiza una dilución 1:20 de la suspensión leucocitaria en un colorante vital como es el azul tripano. Se deja reposar 5 min y se procede a su conteo en cámara de Neubauer. Además, se calcula el porcentaje medio de células teñidas de azul, no viables, en tres conteos independientes. Para el recuento de plaquetas se realizan dos diluciones (1:2 y 1:8) de la suspensión de plaquetas y se analizan en un contador automático (Coulter MicroDiff II), que proporciona el número de células por μL de cada tipo. Con los datos numéricos se realiza una regresión lineal para calcular la concentración de la suspensión. Con el hemograma se comprueba la ausencia de contaminación leucocitaria o eritrocítica.

D. Ensayo de viabilidad celular

El efecto citotóxico de los productos puros sobre los distintos tipos celulares se mide usando el ensayo del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolio (MTT) [Mossman et al., 1983], que se basa en la conversión del MTT de color amarillo a formazán de color azul oscuro. Esta reacción está catalizada por succinildeshidrogenasas mitocondriales. Las células ($1 \times 10^6/195 \mu\text{L}$ PBS) se tratan con 5 μL de la muestra durante 30 min (en estufa a 37 °C) en una placa de 96 pocillos. Una vez eliminado el xenobiótico tras centrifugar la placa, se añade a cada pocillo 100 μL de MTT de una solución de 0,45 mg/mL. Se incuba la placa a 37 °C (1-3 h) hasta la aparición de color azul (al menos en los controles). El medio se elimina y se añaden 100 μL de DMSO a cada pocillo que disuelve los cristales de formazán.

La viabilidad de las células se calcula respecto al control al que sólo se le ha añadido DMSO, según la expresión matemática:

$$\%V = \frac{A_c - A_p}{A_c} \times 100$$

Siendo %V = porcentaje de viabilidad de las células, A_c = media de la absorbancia del control, y A_p = media de la absorbancia del problema.

Se determina la desviación típica y el error tipo de cada una de las medias obtenidas, así como la significación estadística de las diferencias, usando el test de la *t* de Dunnett (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

	Control (triplicado)	Problema (triplicado)
Células	$1 \times 10^6 / 195 \mu\text{L PBS}$	$1 \times 10^6 / 195 \mu\text{L PBS}$
DMSO	5 μL	-
Productos	-	5 μL
Incubar a 37 °C, 30 min Centrifugar a 3000 r.p.m., 22 °C, 10 min Eliminar el sobrenadante		
MTT	100 μL	100 μL
Incubar a 37 °C, 1-3 h Centrifugar a 3000 rpm, 22 °C, 10 min Eliminar el sobrenadante		
DMSO	100 μL	100 μL
Agitar y llevar al baño ultrasonidos Medir la absorbancia a 490 nm		

E. Ensayo de la actividad 5-LOX en leucocitos polimorfonucleares de rata

La actividad 5-LOX se mide atendiendo a la producción de LTB₄ y 5-HETE según el protocolo descrito por Safayhi et al. (1995). Las células (5×10^6 PMNs) se suspenden en el tampón de incubación en un volumen final de 975 μ L y se introduce el tubo eppendorf en un baño a 37 °C. A continuación se incuba con la muestra a ensayar durante 5 min. En ese momento los neutrófilos de rata son estimulados por la adición de ionóforo de calcio A23187 (100 μ g/mL) y calcio (26,46 mg/mL). De este modo se activa de modo preferente la síntesis de eicosanoides por la vía 5-LOX. El protocolo seguido se describe en la siguiente tabla:

Minuto	Protocolo [Safayhi et al., 1995]
0	Introducir 975 μ L de suspensión de PMNs
5	5 μ L de producto, extracto o excipiente
10	10 μ L de ionóforo (Cf = 1,9 μ M)
12	10 μ L de Ca ²⁺ (Cf = 1,8 mM)
17	1000 μ L de MeOH/HCl 1 N (97:3) a 0 °C Cerrar, agitar e introducir en baño de hielo

Cada serie consta de un máximo de 10 problemas (extractos, productos o referencias) con un control al principio y otro al final (excipiente). En cada experimento se toman tres muestras de células (5×10^6 PMNs) en un volumen final de 975 μ L de PBS y se procede a la determinación de la actividad 5-LOX en las condiciones del ensayo. Una muestra se incuba en presencia de excipiente, otra en ausencia de éste y a la tercera no se le añade ionóforo. Tras procesar las muestras e inyectarlas en el HPLC, en las dos primeras se debe observar una producción de

LTB₄ y 5-HETE en la proporción 1:1 y en la tercera una ausencia significativa de producción. Esto indica un correcto funcionamiento del metabolismo del AA endógeno, ausencia de inhibición de alguna de las vías metabólicas y falta de preactivación.

F. Ensayo de la actividad COX-1 en plaquetas humanas

Se sigue el protocolo de Safayhi et al. (1995; 2000) reduciendo el tiempo de producción a 1 min [Laufer et al., 1995]. La actividad COX-1 se mide atendiendo a la producción de 12-HHTrE y 12-HETE. Las células (80×10^6 plaquetas humanas) se suspenden en IKP en un volumen final de 975 μ L y se introduce el tubo eppendorf en un baño a 37 °C. A continuación se incuba con la muestra a ensayar durante 5 min. En ese momento las plaquetas son estimuladas por la adición de ionóforo de calcio A23187 (100 μ g/mL) y calcio (26,46 mg/mL). El protocolo seguido se recoge en la siguiente tabla:

Minuto	Protocolo [Safayhi et al. 1995; 2000]
0	Introducir 975 μ L de suspensión de plaquetas
5	5 μ L de producto, extracto o excipiente
10	10 μ L de Ca ²⁺ (Cf = 1,8 mM)
12	10 μ L de Ionóforo (Cf = 1,9 μ M)
13	1000 μ L de MeOH/HCl 1 N (97:3) a 0 °C
	Cerrar, agitar e introducir en baño de hielo

Cada serie consta de un máximo de 6 problemas (extractos, productos o referencias) con un control al principio y otro al final (excipiente). En cada experimento se toman tres muestras de células (80×10^6 plaquetas) en un volumen final de 975 μ L de HBSS con Ca²⁺ y Mg²⁺ y se procede a

la determinación de la actividad COX-1 en las condiciones del ensayo. Una muestra se incuba en presencia de excipiente, otra en ausencia de éste y a la tercera no se le añade ionóforo. Tras procesar las muestras e inyectarlas en el HPLC, en las dos primeras se debe observar una producción 12-HHTrE y 12-HETE en la proporción 1:1 y en la tercera una ausencia significativa de producción. Esto indica un correcto funcionamiento del metabolismo del AA endógeno, ausencia de inhibición de alguna de las vías metabólicas y falta de preactivación.

G. Extracción de los eicosanoides en fase sólida

Para la extracción en fase sólida de los eicosanoides se sigue el protocolo de Werz et al. (1998), utilizando columnas de fase reversa (RP-18) de pequeño tamaño, dispuestas en batería y acopladas a vacío para acelerar el proceso. Como se produce una pequeña pérdida de los metabolitos que se encuentran en la fracción disuelta en las membranas celulares, se recurre al uso de un patrón interno, como es la prostaglandina B₂ (PGB₂) añadiendo a cada muestra 10 µL y agitando energicamente en un vórtex. Previa a la extracción en fase sólida y tras la adición de PGB₂, las muestras se centrifugan durante 5 min a 12000 xg a 4 °C. El proceso seguido para la extracción en fase sólida de los eicosanoides se recoge en la siguiente tabla:

Fase	Eluyente	Fase de extracción	Vacío
Activación	1 mL MeOH 100%	Lavado	20 a 10 (mmHg)
	1 mL H ₂ O	Equilibrado	
Introducción muestra	2 mL sobrenadante	Extracción sólido/líquido	
Elución selectiva	1 mL H ₂ O	Compuestos polaridad alta	
	1 mL MeOH 25%	Compuestos polaridad media	
	300 µL MeOH 100%	Compuestos no polares y eicosanoides	4 a 5 (mmHg)

H. Análisis de LTB₄ y 12-HHTrE por HPLC

Tras la inyección de las muestras (100 µL) se lleva a cabo la separación de los eicosanoides, según las condiciones dadas por Safayhi et al. (1995). Para la detección de LTB₄ se emplea un sistema de elución en gradiente utilizando: A) MeOH/TFA 0,007%, B) H₂O/TFA 0,007%, con flujo de 1 mL/min y presión de 200 bar. Para la detección de 12-HHTrE y 12-HETE se emplea una elución isocrática utilizando: C) MeOH/H₂O/TFA (74:26:0,007), D) MeOH 100%, con flujo de 1 mL/min y presión de 200 bar.

1) Programa de elución para los metabolitos de la 5-LOX

Minuto	a	b
0 – 3	50%	50%
3 – 27	74%	260%
27,1 – 27,6	100%	0%
27,7 – 40,0	50%	50%

a: MeOH/TFA 0,007%

b: H₂O/TFA 0,007%

2) Programa de elución para los metabolitos de la COX-1

Minuto	c	d
0 – 27,0	100%	0%
27,1 – 27,6	0%	100%
27,7 – 40,0	100%	0%

c: MeOH/H₂O/TFA (74:26:0,007)

d: MeOH 100%

I. Cuantificación de LTB₄ y 12-HHTrE.

Una vez obtenidos los cromatogramas y las correspondientes áreas de cada pico, se calcula: para el ensayo de la actividad 5-LOX, la media del cociente LTB₄/PGB₂ en cada muestra, para el ensayo de la actividad COX-1, la media del cociente 12-HHTrE/PGB₂ en cada muestra.

La media de los valores de los controles iniciales y finales de una serie será el 100% de producción de cada metabolito en dicha serie. Se refieren los cocientes de las muestras a este valor para obtener los porcentajes de producción y/o de inhibición respecto al control. Cada rata es considerada un n (experimento independiente). Los resultados son la media \pm error (n = 3 como mínimo).

J. Ensayo de la liberación de elastasa en leucocitos humanos estimulados con TPA

La elastasa es una metaloproteína con actividad enzimática proteasa que degrada el colágeno y los proteoglicanos del cartílago, la elastina y la membrana basal. Además, puede convertir el fibrinógeno en fibrina y activar los factores del complemento C5a y C3b con sus importantes acciones como quimiotáctico y opsonina respectivamente. La elastasa neutrofílica humana ha sido implicada en varias situaciones fisiopatológicas, entre ellas la proliferación de músculo liso, secreción de moco, inducción de hiperreactividad de vías aéreas, etc., por lo que se sugiere que una inhibición de esta enzima mejoraría estos desórdenes funcionales y patológicos [Safayhi et al., 1997; Mitsuhashi et al., 1999].

El método se basa en la capacidad reductora de la elastasa formándose productos que absorben como es el BOC (*N*-tert-butilbutoxicarbonil-L-alanina-*p*-nitrofenil éster. A partir de este sustrato se libera *p*-nitrofenol que absorbe a 414 nm. Para determinar la actividad de los compuestos

sobre la liberación de elastasa se procede del siguiente modo: distribuir en tubos de 1,5 mL $1,25 \times 10^6$ de PMNs humanos en 500 μL de HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} . Para cada extracto tenemos un blanco al que no se le añade TPA y un problema que en este caso si que ha recibido TPA. El protocolo seguido se recoge en la siguiente tabla:

Minuto	Protocolo [Barret, 1981]
0	Introducir en baño con agitación a 37 °C
5	Añadir 5 μL de extracto (problema y blanco)
10	Añadir 5 μL de TPA disolución problema o DMSO (blanco)
25	Sacar, cerrar e introducir en hielo

Centrifugar (4000 r.p.m., 4 °C, 10 min). Distribuir en los pocillos de la microplaca dos alicuotas de 200 μL de sobrenadante. Añadir a cada pocillo 5 μL de BOC. Incubar en estufa a 37 °C durante 30 min. Medir la absorbancia a 414 nm. El porcentaje de inhibición de la liberación de elastasa se calcula según la expresión matemática:

$$\%I = \frac{A_c - A_p}{A_c} \times 100$$

Siendo A_c = absorbancia del control y A_p = absorbancia del problema.

K. Inhibición de la producción de NO en macrófagos RAW 264.7

Basado en el método descrito por De León et al. (2003). Se prepara una curva patrón de nitritos para poder extrapolar las absorbancias que se obtengan con los productos y conocer su concentración. Se preparan concentraciones de crecientes desde 80 μM hasta 2,5 μM . Se añaden 100 μL de cada disolución al pocillo correspondiente y 100 μL del reactivo de Griess (Naftilendiamina al 0,1% en H_2O y sulfanilamida al 1% en H_3PO_4). Se siembran 2×10^6 células/mL en una placa de 96 pocillos y

se dejan incubar 24 h para que la población se doble. Se elimina el medio y se añaden 200 μL medio fresco sin suero fetal bovino. Se añaden los productos a las concentraciones finales de: control y blanco (DMSO al 0,5%), productos objeto de estudio (0,1-50 μM) y se deja incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera del 5% en CO_2 durante 3 h. La liberación de NO se estimula mediante la adición de 20 μL de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se toman alícuotas de 100 μL del sobrenadante a las 24 h y se disponen en otra placa de 96 pocillos, añadiendo 100 μL del reactivo de Griess. Se mide la absorbancia a 570 nm.

L. Inhibición de la liberación de TNF- α e IL-1 β en macrófagos RAW

264.7

Método establecido por Kuo et al. (2003). En una placa de 96 pocillos se siembran 2×10^5 células en 200 μL de medio completo por pocillo. Se añade el producto a las concentraciones finales de: control y blanco (DMSO al 0,5%), productos objeto de estudio (0,1-50 μM) y se deja incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ en una atmósfera del 5% en CO_2 durante 3 h. Pasado este tiempo se adicionan 10 μL de PHA 0,5 mg/mL y se deja incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 h o 72 h, en función del mediador. A las 24 h se mide IL-1 β y a las 72 h TNF- α . Posteriormente, se centrifugan las placas a 1200 r.p.m. durante 5 min para que sedimenten las células y se miden las distintas citocinas en los sobrenadantes mediante un ensayo de unión enzimática específica (ELISA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.7. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

III.7.1. REACCIÓN CON EL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIL HIDRAZIL (DPPH)

Se ha seguido el protocolo de Cavin et al. (1998). Se introduce en un tubo de reacción 10 µL de la muestra a ensayar, vehículo o compuestos de referencia (butilhidroxitolueno o BHT, quercetina, ácido ascórbico) a las concentraciones estudiadas y 990 µL de la disolución de DPPH (20 mg/mL). Tras incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min, se lee la absorbancia a 517 nm. La capacidad captadora de radicales libres (capacidad de decoloración) se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\%I = \frac{\overline{\Delta A_m} - \overline{\Delta A_c}}{\overline{\Delta A_c}} \times 100$$

Siendo $\overline{\Delta A_c}$ = media aritmética del incremento de la absorbancia del control, y $\overline{\Delta A_m}$ = media aritmética del incremento de la absorbancia del problema.

Preparación de la solución de DPPH (20 mg/L)		Precauciones
Disolución Madre (DM) (200 mg/L)	10 mg DPPH en MeOH c.s.p. 50 mL	Conservar en refrigerador a 4°C en envase de vidrio color topacio y envuelto en papel de aluminio
DPPH (20 mg/L)	Dilución 1/10 DM (1 mL de DM + 9 mL MeOH)	Controlar día a día la absorbancia a 517 nm respecto al día de preparación. Descartar DM con una disminución superior al 20%

Ensayo con DPPH				
	Blanco control	Control	Blanco muestra	Muestra
Muestra	-	-	10 µL	10 µL
Vehículo	10 µL	10 µL	-	-
DPPH (20 mg/ml)	-	990 µL	-	990 µL
Metanol	990 µL	-	990 µL	-
Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min Leer la absorbancia a 517 nm				

III.7.2. REACCIÓN CON EL RADICAL 2,2'-AZINO-BIS (3-ETILBENZTIAZOLIN- 6-SULFONATO DE AMONIO (ABTS^{•+}))

El radical ABTS^{•+} se produce utilizando una mezcla de reacción que contiene ABTS (3,5 mM) y persulfato de potasio (1,25 mM) en agua destilada. La mezcla de reacción se prepara 12 h antes de su uso y se mantiene a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Se ajusta la absorbancia de la disolución ABTS^{•+} a 0,7 unidades a 732 nm con tampón fosfato pH 7,4 [Pannala et al., 2001]. La actividad antioxidante se evalúa midiendo el cambio de absorbancia a 732 nm de la solución de ABTS^{•+} cuando se alcanza el estado estacionario [Arnao, 1999]. La capacidad captadora de radicales libres se calcula según la fórmula:

$$\%I = \frac{\overline{Ac} - \overline{Am}}{\overline{Ac}} \times 100$$

Siendo \overline{Ac} = media aritmética de la absorbancia del control, y \overline{Am} la media aritmética de la absorbancia de la muestra.

Preparación de radical ABTS	
Disolución madre de ABTS - 3,5 mM	ABTS 17,5 mg Agua destilada c.s.p. 9,9 mL
Solución de persulfato de potasio (125 mM)	K ₂ S ₂ O ₈ 34,0 mg Agua destilada c.s.p. 1,0 mL
Formación de radical ABTS	ABTS (3,5 mM) 9,9 mL K ₂ S ₂ O ₈ (125 mM) 0,1 mL Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad al menos 12 horas. El radical ABTS formado es estable por 2 días

Ensayo	Se ajusta la absorbancia de la disolución 1,25 mM ABTS ^{•+} para que 900 µL de solución ABTS ^{•+} diluida + 100 µL de agua destilada sea de 0,7 unidades a 732 nm
	ABTS ^{•+} diluida 900 µL Agua destilada 100 - X µL Muestra X (5 - 50 µL)
Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min Leer la absorbancia a 730 nm	

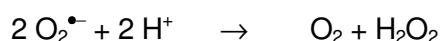
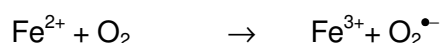
III.7.3. MEDIDA DE LA CAPACIDAD REDUCTORA: MÉTODO FRAP

La determinación de la capacidad reductora se lleva a cabo por el método de Benzie y Strain (1996), utilizando tampón acético-acetato de sodio 0,3 M a pH 3,6 conteniendo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (1 mM) y FeCl₃ (2 mM). Las soluciones deben ser preparadas el mismo día del ensayo. Para la medida de la capacidad antioxidante se mezcla un volumen de la muestra con 10–100 volúmenes del reactivo recientemente preparado. Se determina la absorbancia a 593 nm a

tiempo 0 (A_0) y luego de 8 min (A_8). La diferencia (A_8) – (A_0) se compara con la obtenida en una determinación paralela utilizando una sal de Fe^{2+} ($FeSO_4$, 100–1000 μM) como compuesto de referencia. Las actividades de las muestras en estudio se expresan como equivalentes de Fe^{2+} . También se puede utilizar ácido ascórbico como compuesto de referencia. El tiempo que se requiere para completar la reacción puede ser muy variable en función de los compuestos o mezclas de ellos a estudiar, variando desde segundos hasta minutos, aunque se considera que tras 8 minutos la reacción se completa, al menos con la mayoría de compuestos ensayados. La relación dosis–respuesta es lineal hasta un ΔAbs de 2,0 para concentraciones de compuestos de 1 mM o superiores. Se puede realizar también un monitoreo cinético determinando las pendientes de crecimiento de la absorbancia a tiempos variables, si el objetivo del trabajo lo requiere.

III.7.4. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HOMOGENADO DE CEREBRO DE RATA

El protocolo a seguir es la peroxidación lipídica no enzimática con Fe^{2+} / ascorbato [Kang et al., 2003], en el que la generación no enzimática de HO^\bullet puede ocurrir a partir la autoxidación de Fe^{2+} , la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 y la posterior reacción del H_2O_2 con el Fe^{2+} remanente promueve la formación de radical HO^\bullet que iniciará la peroxidación lipídica de las membranas.



Se utilizan ratas Wistar machos (200-250 g) en ayunas desde el día anterior. Los animales son sacrificados y los cerebros son rápidamente extirpados y colocados en solución amortiguadora Tris-HCl (20 mM, pH

7,4) sobre hielo. Se pesa el órgano, se corta en trozos y se lava tres veces con la solución tamponada fría. Se homogeneiza con tampón en proporción 1:10 p/v. En todo momento se mantienen en baño agua/hielo. Se centrifuga a 12000 $\times g$ durante 30 min a 4°C. El sobrenadante es retirado.

Para un volumen final de 1 mL se toman 0,97 ml del homogenado de cerebro en tampón 20 mM M Tris-HCl, pH 7,4; se induce la peroxidación por la adición de 10 μL de ascorbato (Cf: 100 μM) y 10 μL de FeSO_4 (Cf = 10 μM). Se incuban los tubos problemas y control (contienen 10 μL de la sustancia problema y su vehículo respectivamente) a 37 °C durante 60 min. Se paraliza la reacción por agregado de 1 mL de una solución 28% (p/v) de TCA y se adiciona 1,5 mL de TBA 1% (p/v), la mezcla se calienta en baño de agua a 95 °C durante 15 min. Se enfrían, se centrifuga para remover la proteína y se mide la absorbancia del sobrenadante a 532 nm.

La actividad antioxidante se evalúa mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica, según la fórmula siguiente:

$$\%I = \frac{\overline{\Delta Ac} - \overline{\Delta Am}}{\overline{\Delta Ac}} \times 100$$

Siendo $\overline{\Delta Ac}$ = media aritmética de la absorbancia del control, y $\overline{\Delta Am}$ la media aritmética de la absorbancia de la muestra.

	Muestra	Blanco Muestra	Control	Blanco Control	Concentración final (Cf)
Homogenado cerebro	970 μ L	970 μ L	970 μ L	970 μ L	
Muestra a ensayar	10 μ L	10 μ L	-	-	
Vehículo	-	-	10 μ L	10 μ L	
Agua destilada	-	10 μ L	-	10 μ L	
Acido ascórbico 10 mM	10 μ L	-	10 μ L	-	100 μ M
FeSO ₄ : 1 mM	10 μ L	-	10 μ L	-	10 μ M
Incubar en baño de agua a 37 °C - 60 min					
TCA (28 %)	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L	
TBA (1 %)	1500 μ L	1500 μ L	1500 μ L	1500 μ L	
Incubar en baño de agua a 95 °C durante 15 min, enfriar Centrifugar a 3000 r.p.m. a 4 °C durante 15 min Leer la absorbancia a 532 nm					

Disoluciones
Buffer 20 mM Tris-HCL: pH 7,4 Disolver 0,6055 g de Tris-base (PM = 121,1) en 200 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7,4 con HCl 0,1N y completar hasta 250 mL con agua destilada
Acido ascórbico: 10 mM Disolver 17,613 mg de ácido ascórbico (PM = 176,13) en 10 mL de agua destilada
Sulfato de hierro (II): 1 mM Disolver 2,7802 mg de FeSO ₄ ·7 H ₂ O (PM = 278,02) en 10 mL de agua destilada (Cf = 1 mM)
Sustancia de referencia: Butilhidroxitolueno (BHT)
Muestra problema: Extractos o productos aislados

III.7.5. INHIBICIÓN DE LA ACCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO: RADICAL SUPERÓXIDO

Conforme al protocolo seguido [Sanz et al., 1994] la mezcla de reacción (volumen total de 1 mL, en cubeta de plástico o cristal) contiene 680 μL de tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$ (50 mM, pH 7,4), 10 μL hipoxantina 10 mM (Cf = 100 μM), 100 μL $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM (Cf = 1 mM), 100 μL NBT 1 mM (Cf = 100 μM) y 10 μL del producto a ensayar, de la referencia pirogalol o del vehículo. La reacción se inicia con la adición de 100 μL de xantina oxidasa (0,06 UI/mL) diluida recientemente, determinando cinética de la variación de la absorbancia a 560 nm durante 2 min.

El grupo control presenta el máximo de radical superóxido generado durante la reacción según nuestras condiciones experimentales. También ensayamos blancos de la reacción, en los que no se adiciona la enzima para comprobar que no existe reducción espontánea del NBT. Si adicionamos a la mezcla de reacción un producto que se comporte como captador de radicales superóxido, disminuye la velocidad de la reacción de reducción del NBT. Es importante ensayar blancos del producto a fin de descartar una posible interferencia del producto en estudio con el sistema detector, ya que algunos compuestos podrían reducir al NBT.

Se realiza la determinación cinética de la variación de la absorbancia durante 2 min y los resultados se expresan como porcentajes de inhibición de la reducción del NBT. El porcentaje de inhibición de la producción de radical superóxido se expresa según la fórmula:

$$\%I = \frac{\overline{\Delta A_c} - \overline{\Delta A_m}}{\overline{\Delta A_c}} \times 100$$

Siendo $\overline{\Delta A_c}$ = media aritmética del incremento de la absorbancia del grupo control, y $\overline{\Delta A_m}$ la media aritmética del incremento de la absorbancia de la muestra.

	Muestra	Blan co Mue stra	Control	Blanco Control	Concentración final (Cf)
Tampón fosfato-KOH (50 mM)	680 μ L	780 μ L	680 μ L	780 μ L	
Hipoxantina 10 mM	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	100 μ M
Na ₂ EDTA·2 H ₂ O 10 mM	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	1 mM
NBT 1 mM	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ L	100 μ M
Muestra problema	10 μ L	10 μ L	-	-	-
Vehículo	-	-	10 μ L	10 μ L	-
Agitar y mezclar bien					
Xantina oxidasa	100 μ L	-	100 μ L	-	0,06 UI/mL
Leer la absorbancia a 560 nm durante 2 min					

III.7.6. EFECTO QUELANTE SOBRE EL ION FERROSO

La actividad quelante de la muestra objeto de estudio frente al ion Fe²⁺ se determina mediante el protocolo de [Dinis et al., 1994]. La muestra (100 μ g) se mezcla con 0,925 mL de agua destilada, se hace reaccionar durante 30 s con FeCl₂ (2 mM, 25 μ L). A continuación se añaden 50 μ L de TPTZ 5 mM, se mezcla, se deja en reposo durante 10 min a

temperatura ambiente, y a continuación se mide la absorbancia de la mezcla a 593 nm. EDTA se utiliza como control positivo. El descenso en la absorbancia indica una fuerte actividad quelante.

El porcentaje de inhibición de la producción de radical superóxido se expresa según la fórmula:

$$\%I = \frac{\overline{\Delta Ac} - \overline{\Delta Am}}{\overline{\Delta Ac}} \times 100$$

Siendo $\overline{\Delta Ac}$ = media aritmética del incremento de la absorbancia del grupo control, y $\overline{\Delta Am}$ la media aritmética del incremento de la absorbancia de la muestra.

	Blanco control	Control	Blanco muestra	Muestra
Agua destilada	915 μ L	915 μ L	965 μ L	915 μ L
Muestra	-	-	10 μ L	10 μ L
Vehículo	10 μ L	10 μ L	-	-
FeCl ₂ , 2 mM	25 μ L	25 μ L	25 μ L	25 μ L
Agitar y dejar reposar durante 30 seg a temperatura ambiente				
TPTZ, 5 mM		50 μ L	-	50 μ L
Agitar y dejar reposar durante 10 min				
Medir absorbancia a 593 nm				

III.7.7. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

Los fenoles totales se determinan por reducción del reactivo de Folin – Ciocalteu [Waterman y Roque, 1994] de los fenoles que produce un pigmento azul en solución alcalina. La curva de calibración se realiza con compuestos o mezclas de compuestos estandarizados representativos de la muestra ensayada.

Solución de Na ₂ CO ₃ 20% (p/v)	Na ₂ CO ₃ 20 g Agua destilada csp 100 mL
Reactivo de Folin - Ciocalteu	
Solución estándar - 0,1 mg/ mL	Catequiza, Ácido tánico, Ácido cafeico, etc. (1 – 10 µg)
Ensayo	Muestra..... X µL Agua destilada (850 – X) µL Na ₂ CO ₃ 20% p/v 100 µL Reactivo de Folin – Ciocalteu ...50 µL
Incubar a temperatura ambiente durante 30 min. Leer absorbancia a 760 nm	

III.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están expresados como la media aritmética \pm desviación estándar, o por la desviación típica y el error tipo de las muestras.

El análisis estadístico ha sido realizado mediante el ensayo de varianza ANOVA seguido del test de la *t* de Dunnett para comparaciones múltiples y del test de la *t* de Student para comparaciones simples. Los valores de *P* inferiores a 0,05 (*) se consideran significativos y los de *P* inferiores a 0,01 muy significativos (**). Los porcentajes de inhibición (%I) fueron calculados a partir de las diferencias entre los grupos problemas y los controles. Las concentraciones inhibitorias-50 (CI₅₀) y

dosis inhibitorias-50 (DI_{50}) fueron calculadas por medio de la regresión lineal a partir de los porcentajes de inhibición obtenidos al menos a cuatro concentraciones diferentes o tres dosis diferentes.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. *SCHINUS MOLLE*

IV.1.1. EXTRACCIÓN

Los frutos secos y pulverizados (298 g) de *Schinus molle* se trituraron y extrajeron con MeOH a temperatura ambiente (4 × 500 mL). El extracto metanólico se concentró hasta sequedad, obteniendo un residuo seco de 91,3 g.

IV.1.2. FRACCIONAMIENTO

El residuo obtenido se fraccionó directamente mediante gel-filtración en columna de Sephadex LH-20 (6 × 50 g) utilizando MeOH como fase móvil (6 × 500 mL). Una vez analizadas mediante CCF las diferentes fracciones, éstas se reunificaron por similitud cromatográfica en 4, que se denominaron A, B, C y D. La fracción-A se sometió a un fraccionamiento mediante VLC utilizando silicagel H (5 × 250 g) como fase estacionaria y mezclas CH₂Cl₂-MeOH como fase móvil (100:0, 95:5, 90:10 y 50:50). Se obtuvieron 129 fracciones de 100 mL. Las fracciones A₁₂₀₋₁₂₉ obtenidas con CH₂Cl₂-MeOH 1:1 (1000 mL, 6,6 g) se reunificaron y recromatografiaron en VLC utilizando silicagel H (3 × 220 g) y mezclas CH₂Cl₂-AcOEt (100:0, 90:10, 80:20, 50:50 y 0:100) como fase móvil. Las fracciones obtenidas se reunificaron por similitud cromatográfica en un total de 9 fracciones. La fracción A₁₂₀₋₁₂₉(7) (1,2 g) eluida con mezclas 1:1, se recromatografió (VLC) utilizando silicagel H (120 g) y CH₂Cl₂-AcOEt 50:50 como eluyente. Se obtuvieron 171 subfracciones de 25 mL. De las subfracciones 75-120 (1150 mL) se aisló un compuesto puro que se denominó **SM-2** (50 mg).

La fracción A₁₂₀₋₁₂₉(8) (1,98 g) se cromatografió (VLC) sobre silicagel H (200 g) eluyendo con mezclas CH₂Cl₂-AcOEt (8:2), obteniéndose un total de 8 subfracciones. A partir de la subfracciones 18-52 reunificadas (1020 mL) se obtuvo un compuesto puro al que se denominó **SM-1** (120 mg). La fracción A₁₂₀₋₁₂₉(9) (2,3 g) se cromatografió (VLC) sobre silicagel H (230 g) y mezclas CH₂Cl₂-AcOEt (8:1) como fase móvil, obteniéndose un total de 30 subfracciones de 30 mL. De la subfracción 7-10 (210 mL) se obtuvieron otros 80 mg del compuesto **SM-1**.

La fracción-C (1,0 g) se cromatografió en columna de silicagel eluyendo con CH₂Cl₂-MeOH (7:3) dando un total de 40 fracciones una vez reunificadas por similitud cromatográfica. De las fracciones C₂₀₋₂₁ se aisló un compuesto puro que se denominó **SM-3** (300 mg).

IV.1.3. IDENTIFICACIÓN

El compuesto **SM-1** se ha identificado por medios fisicoquímicos y espectroscópicos como el ácido 3-*epi*-isomasticadienolálico o ácido (13 α ,14 β ,17 α ,20*S*,24*Z*)-3 α -hidroxi-21-oxolanostan-8,24-dien-26-oico.

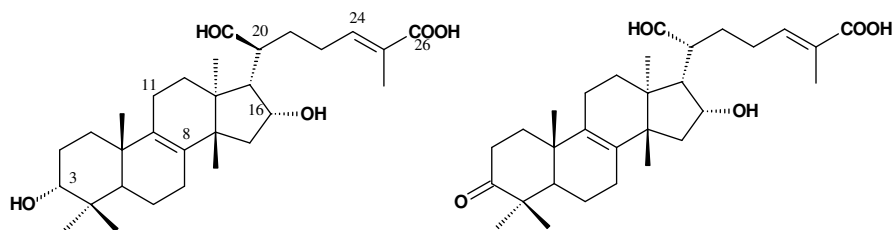
Los datos de identificación se recogen en la tabla.

El compuesto **SM-2** se identificó comparando los datos espectrales obtenidos con los valores bibliográficos previamente publicados. El compuesto se ha identificado como el ácido isomasticadienonálico o ácido (13 α ,14 β ,17 α ,20*R*,24*Z*)- 3,21-dioxolanostan-8,24-dien-26-oico. Los datos de identificación se recogen en la tabla.

El compuesto **SM-3**, a diferencia de los anteriores, se trata de un compuesto fenólico, que da positiva las reacciones de flavonoides, el cual ha sido identificado como la biflavona chamaejasmina. Los datos de identificación se recogen a continuación.

SM-1	$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +23,6$ (c 0,5, CHCl ₃)	R _f 0,37, silicagel, CH ₂ Cl ₂ /MeOH (15:1)
SM-2	$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +29,9$ (c 0,5, CHCl ₃)	R _f 0,45, silicagel, CH ₂ Cl ₂ /MeOH (15:1)
SM-3	$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -39,4$ (c 0,5, CHCl ₃)	R _f 0,31, silicagel, CH ₂ Cl ₂ /MeOH (15:1)

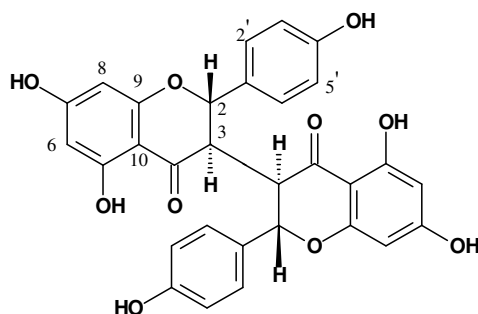
Los espectros de los compuestos **SM-1** y **SM-2**, han sido realizados en CDCl₃ (400 MHz) y los valores obtenidos coinciden con los citados por Pozzo-Balbi et al. (1978) y Olafsson et al. (1997). El EM-IE de **SM-1** dio una masa molecular de M⁺ = 470 y en el caso de **SM-2** fue 468 (M⁺).



Ácido 3-*epi*-isomasticadienolálico (SM-1) Ácido isomasticadienonálico (SM-2)

C	SM-1		SM-2	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	29,6		29,6	
2	25,8		25,8	
3	76,0	3,44, <i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 2,8 Hz	76,0	3,44, <i>t</i> , 1H, <i>J</i> = 2,8 Hz
4	37,2		37,2	
5	44,7		44,7	
6	18,7		18,7	
7	27,2		27,2	
8	132,8		132,8	
9	134,6		134,6	
10	37,7		37,7	
11	21,3		21,3	
12	29,6		29,6	
13	44,0		43,6	
14	49,7		20,0	
15	29,7		20,0	
16	28,6		20,0	
17	45,2		44,8	
18	16,8	0,77, <i>s</i> , 3H	16,2	0,77, <i>s</i> , 3H
19	20,0	0,95, <i>s</i> , 3H	20,0	0,95, <i>s</i> , 3H
20	55,4		55,2	
21	206,2	9,51, <i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 5,5 Hz	205,5	9,54, <i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 4,0 Hz
22	26,7		26,4	
23	27,5		27,5	
24	144,6	6,03, <i>tc</i> , <i>J</i> = 7,5 y 1,4 Hz	144,6	6,03, <i>tc</i> , <i>J</i> = 7,5 y 1,4 Hz
25	127,2		127,2	
26	172,5	1,92, <i>c</i> , 3H, <i>J</i> = 1,4 Hz	172,5	1,92, <i>c</i> , 3H, <i>J</i> = 1,4 Hz
27	20,5		20,5	
28	28,1	0,96, <i>s</i> , 3H	28,1	0,96, <i>s</i> , 3H
29	22,3	0,85, <i>s</i> , 3H	22,3	0,85, <i>s</i> , 3H
30	24,4	0,89, <i>s</i> , 3H	24,4	0,89, <i>s</i> , 3H

El espectro EM-FAB⁺ de chamaejasmina (**SM-3**) da un pico de 543 (M⁺+1). El espectro UV tiene un máximo característico $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (nm) = 296 y el espectro IR presenta bandas a las frecuencias $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ (cm⁻¹) = 3300 y 1620. Los datos obtenidos en el espectro de RMN realizado en CH₃OD (400 Mz) se presentan en la siguiente tabla. Los valores coinciden con los previamente publicados por Niwa et al. (1986).



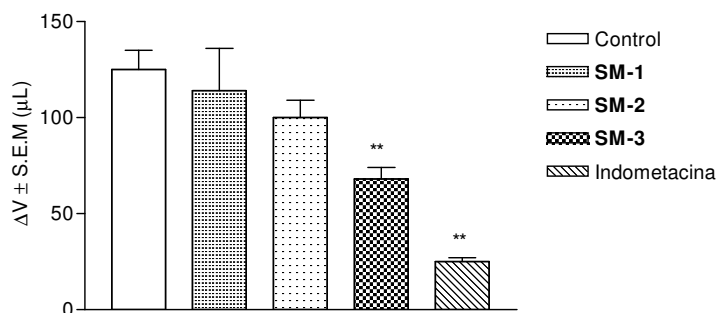
		SM-3	
C		¹³ C	¹ H
2	2''	81,0	2,78, <i>d</i> , 4H, <i>J</i> = 12 Hz
3	3''	50,3	5,78 <i>d</i> , 4H, <i>J</i> = 12 Hz
4	4''	198,4	
5	5''	165,8	
6	6''	97,4	5,80, <i>s</i> , 2H
7	7''	168,6	
8	8''	96,6	5,89, <i>s</i> , 2H
9	9''	162,3	
10	10''	103,8	
1'	1'''	130,9	
2'	2'''	129,2	6,76, <i>d</i> , 2H, <i>J</i> = 8 Hz
3'	3'''	116,6	6,96, <i>d</i> , 2H, <i>J</i> = 8 Hz
4'	4'''	158,9	
5'	5'''	116,6	6,96, <i>d</i> , 2H, <i>J</i> = 8 Hz
6'	6'''	129,2	6,76, <i>d</i> , 2H, <i>J</i> = 8 Hz

IV.1.4. ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Un *screening* previo de actividad antiinflamatoria de diversas plantas utilizadas en medicina popular, sirvió para realizar una selección de especies activas (resultados no publicados). Entre ellas, se eligió *Schinus molle* por sus propiedades y por ser una especie que posee triterpenos del tipo lanostanoide, grupo fitoquímico que nuestro grupo de investigación viene estudiando desde hace algunos años con excelentes resultados. El extracto metanólico activo se fraccionó y se obtuvieron los 3 componentes mayoritarios anteriormente citados, los cuales han sido objeto de un completo estudio de actividad antiinflamatoria. Las pruebas seleccionadas, en función de la actividad previamente conocida para este tipo de principios, han sido: edema plantar agudo inducido por carragenina y PLA₂, edema agudo en oreja de ratón inducido por TPA e inflamación auricular inducida por aplicación repetida de TPA. Finalmente, se ha procedido al estudio del efecto de los 3 compuestos sobre la enzima 5-LOX.

A. Edema agudo inducido por carragenina en pata de ratón

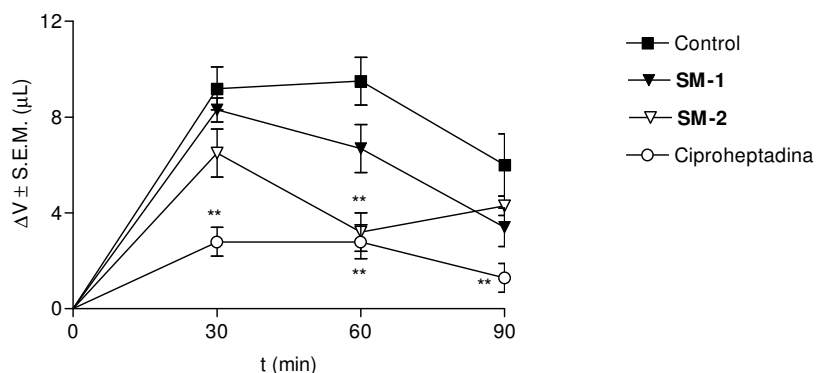
Efecto de los compuestos aislados (**SM-1**, **SM-2** y **SM-3**) a la dosis de 50 mg/kg (*p.o.*) e indometacina a 10 mg/kg (*p.o.*), 3 h después de la administración de carragenina en la aponeurosis plantar del ratón. ΔV = incremento del volumen de la pata en μL (media \pm S.E.M.). $n = 6$. Test *t* de Dunnett ** $P < 0,01$. En este test, solo la biflavanona (**SM-3**) tuvo actividad significativa (46% de inhibición) a las 3 horas de la administración del agente inflamatorio (figura). Los triterpenos carecen de efecto en esta prueba.



h	Control		SM-1		SM-2		SM-3		Indometacina	
	ΔV±SEM	%I	ΔV± SEM	%I	ΔV± SEM	%I	ΔV± SEM	%I	ΔV± SEM	%I
1	60 ± 7	-	56 ± 5	7	88 ± 9	-46	82 ± 13	-36	55 ± 5	8
3	125 ± 10	-	114 ± 22	9	100 ± 9	20	68 ± 6**	46	25 ± 2**	80
5	102 ± 8	-	92 ± 5	1	102 ± 8	0	93 ± 5	9	67 ± 7**	34

B. Edema agudo inducido por PLA₂ en pata de ratón

Efecto de **SM-1** y **SM-2** a la dosis de 30 mg/kg (i.p.) y ciproheptadina a la dosis de 5 mg/kg (i.p.) sobre el edema en pata de ratón inducido por PLA₂ de *Naja mossambica* a los 30, 60 y 90 minutos después de la administración del agente irritante. ΔV = incremento del volumen de la pata en μL (media ± S.E.M.). $n = 6$. Test t de Dunnett ** $P < 0,01$. Solo **SM-2** fue significativamente activo a los 60 min con un 66% de inhibición (figura), en un rango similar de actividad que el fármaco de referencia. **SM-1** y **SM-3** no tuvieron actividad en esta prueba.



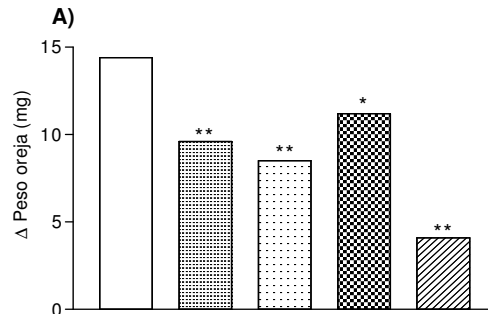
min	Control		SM-1		SM-2		SM-3		Ciproheptadina	
	ΔV± SEM	%I	ΔV± SEM	%I	ΔV± SEM	%I	ΔV± SEM	%I	ΔV± SEM	%I
30	92 ± 9	-	93 ± 8	-1	65 ± 1	29	83 ± 5	10	28 ± 6**	70
60	95 ± 10	-	72 ± 15	24	32 ± 8**	66	67 ± 1	29	28 ± 7**	71
90	60 ± 13	-	35 ± 5	42	43 ± 4	28	34 ± 8	43	13 ± 6**	78

C. Inflamación subcrónica inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón

Efecto antiinflamatorio de **SM-1**, **SM-2** y **SM-3** a la dosis de 0,5 mg/oreja (5 aplicaciones, tópica) y dexametasona a la dosis de 0,05 mg/oreja (5 aplicaciones, tópica) sobre la inflamación subcrónica provocada por aplicación repetida de TPA en la oreja de ratón. La figura **A** representa el edema expresado como incremento de peso respecto al grupo control tratado solo con acetona ($10,1 \pm 0,3$ mg). La figura **B** representa la infiltración de neutrófilos expresada como contenido en mieloperoxidasa (MPO). $n = 6$. Test t de Dunnett: * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$.

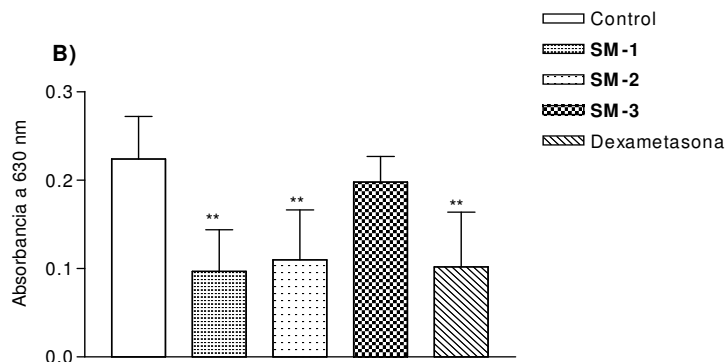
Los tres compuestos ensayados modularon la inflamación inducida por la aplicación repetida de TPA, siendo los triterpenos **SM-1** y **SM-2** los compuestos más activos con un 33% y 41% de inhibición del edema, respectivamente. La biflavanona (**SM-3**) solo inhibió el edema un 22%,

mientras que el fármaco de referencia lo redujo en un 72%. En cuanto a la infiltración leucocitaria, el flavonoide no la afectó, mientras que los triterpenos la redujeron en un 57% y 51%, respectivamente, mientras que dexametasona lo hizo en un 54%.



	Control	SM-1	SM-2	SM-3	Dexametasona
Edema (mg)	14,40	9,60	8,50	11,20	4,10
%l	–	33	41	22	72

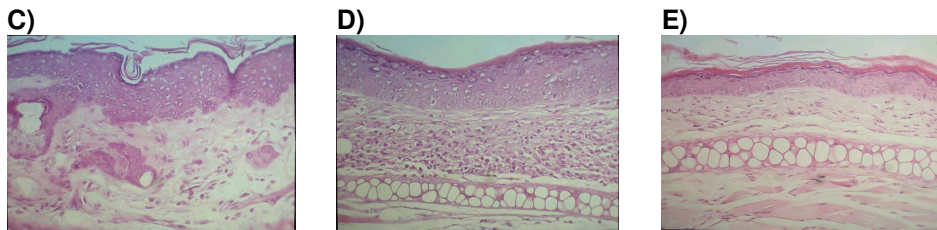
Edema inducido por aplicación repetida de TPA expresado en mg



	Control	SM-1	SM-2	SM-3	Dexa
MPO (Abs) $\times 10^{-3}$	224 \pm 48	97 \pm 47	110 \pm 56	198 \pm 29	102 \pm 62
%l	–	57	51	12	54

Infiltración leucocitaria expresada como contenido en MPO. Valores en absorbancia

El estudio histológico de las muestras obtenidas del grupo tratado solo con TPA (control) muestran las características lesiones inflamatorias: edema intenso, infiltrado difuso en la dermis predominando neutrófilos, linfocitos y macrófagos, así como hiperplasia de fibroblastos y fibrosis papilar. La epidermis presenta papilomatosis, acantosis e hiperqueratosis, pero no espongirosis ni exocitosis (**C**). El corte histológico de las muestras obtenidas de los ratones tratados con el compuesto **SM-2** no presenta edema en la dermis y solo un pequeño infiltrado focal de linfocitos. El resto de valores son similares a los del grupo control pero de menor intensidad, excepto el espesor epitelial que no fue modificado (**D**). La muestra procedente de los ratones tratados con **SM-1** presenta un perfil similar al de **SM-2**, pero con menor efecto sobre la infiltración de linfocitos. El perfil histológico de las muestras obtenidas de ratones tratados con la biflavanona (**SM-3**) es similar al anterior pero con menor efecto sobre la inflamación e infiltración leucocitaria. El grupo del fármaco de referencia, dexametasona, no presenta ni edema, ni infiltración, solo hipertrofia e hiperplasia de fibroblastos y fibrosis papilar, junto a los indicadores de la epidermis, indican que el tejido estuvo inflamado pero se ha reducido drásticamente. El espesor del epitelio fue claramente inferior en este grupo (**E**).



Cortes histológicos de orejas procedentes del test TPA crónico: control (C), **SM-2** (D) y dexametasona (E). Hematoxilina-eosina $\times 16$

D. Viabilidad celular. Ensayo de MTT

La viabilidad celular de los compuestos aislados demuestra que la biflavanona (**SM-3**) carece de toxicidad a la concentración de 100 μM , mientras que los triterpenos (**SM-1** y **SM-2**) no presentan efectos tóxicos sobre las células ensayadas (leucocitos de rata) a la dosis 25 μM o inferior.

E. Inhibición de la producción de LTB_4 en leucocitos PMN de rata

La preincubación de leucocitos peritoneales de rata con **SM-3** tras estimulación con ionóforo de calcio A23187 produjo una inhibición dosis dependiente de la producción de LTB_4 . La CI_{50} calculada para **SM-3** fue de 29,8 μM (15–43 μM , 95% intervalo de confianza). El coeficiente de correlación (r^2) para la regresión lineal fue de 0,9993 ($P = 0,0169$, significativa). A la máxima concentración ensayada (25 μM), los dos triterpenos redujeron la síntesis de LTB_4 un 45%. El fármaco de referencia, apigenina, dio una CI_{50} de 14,0 μM (5–50 μM , $r^2 = 0,9946$; $P = 0,0053$, significativa).

	Inhibición %	CI_{50} (μM)
SM-1 (25 μM)	45	>25
SM-2 (25 μM)	45	>25
SM-3 (50 μM)	80	29,8
Apigenina	–	14,0

IV.1.5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los tres compuestos aislados han sido estudiados como potenciales antioxidantes. Solo la biflavanona (**SM-3**) tuvo una cierta actividad, inhibiendo la peroxidación lipídica inducida por Fe^{2+} -ácido ascórbico en

homogenado de cerebro de rata, aunque a una concentración relativamente alta (380,1 μM). Este compuesto también actúa como captador del radical ABTS, pero no DPPH. A 100 μM inhibió la xantina oxidasa, pero con un porcentaje de inhibición de 32,7, sin embargo no se determinó la CI_{50} debido a la interferencia que producen concentraciones mayores a la descrita con el sistema de detección. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

Actividad inhibidora de la peroxidación lipídica y captadora de radicales libres en diversos sistemas de los compuestos de *Schinus molle*. Valores expresados en concentración μM

CI_{50} (μM)				
	DPPH	ABTS	Radical superóxido	Peroxidación lipídica
SM-1	>100	>100	>100	>1000
SM-2	>100	>100	>100	>1000
SM-3	>100	1,9	>100	380,1

IV. 2. *LYSIMACHIA FOENUM-GRAECUM*

IV.2.1. EXTRACCIÓN

Las partes aéreas de *Lysimachia foenum-graecum* (7,0 Kg) se extrajeron con acetona 70% (3 \times 25 L) a temperatura ambiente. Tras filtrar, el líquido extractivo se concentró en rotavapor a presión reducida hasta masa siruposa, que a continuación se extrajo con AcOEt (6 L) y *n*-BuOH (6 L).

IV.2.2. FRACCIONAMIENTO

El extracto *n*-BuOH se evaporó hasta sequedad en rotavapor, dando un residuo de 230 g que fue fraccionado mediante cromatografía en columna de silicagel (9 \times 120 cm) eluyendo en gradiente con mezclas

CHCl₃-MeOH (1:0-0:1, saturadas con H₂O, 30 L cada una), hasta obtener 8 fracciones (I-VIII). La fraction III (20 g) se recromatografió sobre columna de silicagel (7 × 100 cm) utilizando en este caso como fase móvil mezclas CHCl₃-MeOH-H₂O (8:2:0,1, 20 L) y a continuación se cromatografiaron en fase reversa (RP-18, 3,5 × 60 cm) utilizando MeOH-H₂O (60:40, 4 L) como fase móvil y finalmente una cromatografía semipreparativa (HPLC, RP-18, CH₃CN-H₂O-THF, 38:57:5,0, 2 L) hasta obtener los compuestos puros que se denominaron **LF-2** (32 mg), **LF-3** (59 mg) y **LF-4** (78 mg). La fraction IV (15 g) se sometió a una cromatografía de media presión (columna para MPLC de 5 × 50 cm), silicagel como fase estacionaria y CHCl₃-MeOH-H₂O (10:3:0,1, 10 L) como fase móvil. A continuación se recromatografió utilizado una columna RP-18 semipreparativa (HPLC) y CH₃CN-H₂O-THF (32:63:5,0, 2 L) como fase móvil, obteniendo dos compuestos puros que se denominaron **LF-1** (132 mg) y **LF-5** (84 mg).

IV.2.3. IDENTIFICACIÓN

El compuesto **LF-1** se trata de un polvo blanco de fórmula molecular C₆₃H₁₀₀O₂₅ deducida del EM [M-1]⁻ a *m/z* 1255 en el FABMS— así como del análisis de los datos de RMN de ¹H y ¹³C. El estudio de los datos espectrales indica que **LF-1** es un saponósido con genina triterpénica y 4 monosacáridos. El espectro ¹³C RMN presenta 63 señales de carbonos, de los cuales 23 fueron asignados a los 4 monosacáridos, 30 al triterpeno y los 10 restantes a los 2 grupos angeloilos presentes en la molécula. Los protones de los siete grupos metilos terciarios y el protón olefínico trisustituido (δ_H 5,43, brs) en el ¹H NMR, conjuntamente con las señales correspondientes del ¹³C RMN, sugieren un esqueleto olean-12-eno. La comparación detallada entre los datos del espectro ¹³C RMN de **LF-1** y los recopilados en la bibliografía [Yoshikawa et al., 1996; 1998]

sugieren que la genina de **LF-1** corresponde al compuesto previamente identificado por Tuntiwachwuttikul et al., (1997) [$3\beta,16\alpha,21\beta(Z),22\alpha(Z)$] olean-12-en-3,16,21,22,28-pentol-21,22-bis (2-methyl-2-butenato) (21, 22-*O*-diangeloil barringtogenol C).

Las 4 unidades de monosacáridos fueron determinadas mediante los espectros HMQC-TOCSY y con la ayuda de los espectros COSY, HMQC y HMBC. La señal del proton anomérico a δ_H 5,37 (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz) y 6 señales de C correlacionadas se observan en el espectro HMQC-TOCSY, cuya secuencia fue correlacionada de la siguiente forma δ_C 105,1 (C-1), 77,3 (C-2), 76,4 (C-3), 71,8 (C-4), 78,1 (C-5) y 62,9 (C-6), correspondiente a una unidad glucosa. De forma análoga, otra unidad de glucosa fue identificada en el análisis del espectro HMQC-TOCSY. Un 6-deoxi monosacárido fue elucidado a partir del C metilo a δ_C 19,0 y el correspondiente al doblete del H del metilo a δ_H 1,79 ($J = 5,8$ Hz). El espectro HMQC-TOCSY presenta correlaciones entre el H anomérico del 6-deoxi azúcar y las señales de los C δ_C 101,6 (C-1) and 72,4 (C-2), y del H del metilo a δ_H 1,79 (1H, *d*, $J = 5,8$ Hz) con las señales de los C δ_C 19,0 (C-6), 69,5 (C-5), 74,7 (C-4) y 72,7 (C-3), indicando que se trata de una unidad ramnosa. Las señales remanentes de 5 C sugieren la presencia de una pentosa cuyo H anomérico a δ_H 4,94 (1H, *brs*) está correlacionado con las 4 señales de C a δ_C 104,6 (C-1), 80,9 (C-2), 72,4 (C-3) y 74,9 (C-4) en el espectro HMQC-TOCSY, implicando la presencia de una unidad arabinosa. El metileno oxigenado a δ_C 63,7 fue asignado a la posición C-5 de la arabinosa mediante el análisis del espectro H-H COSY y HMBC.

La posición glicosídica en la genina fue establecida en el C-3, en base a la correlación HMBC entre el H anomérico de la arabinosa a δ_H 4,94 (1H, *brs*) con δ_C 89,1 (C-3). La conectividad entre las unidades del

monosacárido se estableció siguiendo las correlaciones HMBC: H-1 (δ_{H} 5,37) de la glucosa interior con el C-2 (δ_{C} 80,9) de arabinosa; H-1 (δ_{H} 5,25) de la glucosa exterior con C-4 (δ_{C} 74,9) de arabinosa; H-1 (δ_{H} 6,39) de ramnosa con C-2 (δ_{C} 77,3) de glucosa interior. La configuración anomérica de las 2 glucosas se determinó como β a partir de las constantes de acoplamiento de los H anoméricos. Igualmente, la configuración de los H anoméricos de ramnosa y arabinosa se determinó como α . De esta forma, la estructura completa del compuesto **LF-1** fue elucidada como 3-*O*- { α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil} 21,22-*O*-diangeloil barringtogenol C, compuesto que fue denominado **Foenumósido A**.

Foenumósido A (LF-1): polvo blanco; $[\alpha]_{\text{D}}^{23,3} = -10,71$ (*c* 0,14, MeOH); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) = 212 nm (4,36); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ = 3427, 2928, 1704, 1643, 1455, 1387, 1241, 1165, 1075 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, piridina- d_5) δ_{H} 1,18 (3H, s, Me-23), 1,04 (3H, s, Me-24), 0,83 (3H, s, Me-25), 0,86 (3H, s, Me-26), 1,81 (3H, s, Me-27), 1,10 (3H, s, Me-29), 1,33 (3H, s, Me-30), 3,16 (1H, *dd*, H-3), 0,70 (1H, *d*, $J = 11,3$ Hz, H-5), 1,66 (1H, *m*, H-9), 5,43 (1H, *brs*, H-12), 4,51 (1H, *brs*, H-16), 3,11 (1H, *dd*, H-18), 6,69 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz, H-21), 6,31 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz, H-22), 3,41 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz, H-28a), 3,66 (1H, *d*, $J = 10,8$ Hz, H-28b), 5,97 (1H, *cc*, H-3'), 2,07 (3H, *d*, $J = 7,0$ Hz, Me-4'), 2,01 (3H, s, Me-5'), 5,91 (1H, *cc*, H-3''), 2,04 (3H, *d*, $J = 7,0$ Hz, Me-4''), 1,90 (3H, s, Me-5''); ^1H y ^{13}C RMN (ver tabla); FABMS (negativo) m/z 1255 [M-1] $^-$, 1110, 948, 809, 742, 643, 513, 421, 325, 205, 159, 99; HRESIMS (negativo) m/z [M-1] $^-$ 1255,6500 (calcd 1255,6475 para $\text{C}_{63}\text{H}_{99}\text{O}_{25}$).

Al compuesto **LF-2** se le asignó una fórmula molecular de $C_{60}H_{96}O_{25}$ a partir de las señales del FABMS-, que dio un pico m/z 1215 $[M-1]^-$, junto con el análisis de los espectros de RMN. En el estudio comparado de los espectros de ^{13}C NMR de **LF-2** y de **LF-1**, se observa la pérdida de un radical angeloil y la presencia de un acetilo. El desplazamiento a campo bajo, δ_C 66,5 (C-28), indica que la posición C-28 de la genina está sustituida por un grupo acetoxilo, el cual fue confirmado por las correlaciones entre las señales de H a δ_H 4,22 (H_2 -28, *brs*) con la señal de éster carbonílico a δ_C 170,8, y entre la señal del H del metilo de acetilo a δ_H 1,98 (3H, *s*) con las señales de C a δ_C 66,5 (C-28) y 170,8 ($-CO-$) en el espectro HMBC. La presencia de un hidroxilo en la posición C-22 fue determinada por las correlaciones HMBC entre la señal de H a δ_H 4,48 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz) y las señales de C a δ_C 67,7 (C-16), 47,2 (C-17), 81,2 (C-21) y 66,5 (C-28), sugiriendo la pérdida de un angeloil en la posición C-22. La estereoquímica de H-21 y H-22 se determinó como α y β , orientación establecida tras el análisis de los datos REOSY de **LF-2**. Las señales de RMN correspondientes a los azúcares de **LF-1** y **LF-2** demuestran que los 2 compuestos comparten el mismo patrón de sustitución. De esta forma la estructura del compuesto **LF-2** fue determinada como: 3-O- $\{\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2)- $[\beta$ -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil} 21-O-angeloil-28-O-acetil barringtogenol C, y se denominó **Foenumósido B**.

Foenumósido B (LF-2): polvo blanco, $[\alpha]_D^{24.0} = -1,25$ [α] (c 0,13, MeOH); UV λ_{max}^{MeOH} ($\log \epsilon$) = 204 nm (4,14); IR $\nu_{max}^{KBr} = 3432, 2927, 1716, 1634, 1456, 1386, 1239, 1163, 1074, 1041$ cm^{-1} ; 1H RMN (400 MHz, piridina- d_5) δ_H 1,16 (3H, *s*, Me-23), 1,01 (3H, *s*, Me-24), 0,82 (3H, *s*, Me-25), 0,97

(3H, s, Me-26), 1,79 (3H, s, Me-27), 1,11 (3H, s, Me-29), 1,30 (3H, s, Me-30), 3,12 (1H, *dd*, H-3), 0,68 (1H, *d*, $J = 11,3$ Hz, H-5), 1,62 (1H, *m*, H-9), 5,46 (1H, *brs*, H-12), 4,72 (1H, *brs*, H-16), 2,84 (1H, *dd*, H-18), 6,49 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz, H-21), 4,48 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz, H-22), 4,22 (1H, *brs*, H-28), 5,89 (1H, *cc*, H-3'), 2,03 (3H, *d*, $J = 8,8$ Hz, H-4'), 1,97 (1H, *s*, H-5'), 1,98 (3H, *s*, COCH₃); ¹H y ¹³C RMN (ver tabla); FABMS (negativo) m/z [M-1]⁻ 1215, 1069, 907, 809, 663, 599, 511, 421, 325, 233, 159, 99; HRESIMS (negativo) m/z [M-1]⁻ 1215,6127 (calcd 1215,6162 para C₆₀H₉₅O₂₅).

LF-3 presenta un pico cuasimolecular a m/z 1215,6149 [M-1]⁻ en el HRESIMS-, consistente con una fórmula molecular de C₆₀H₉₆O₂₅. Los datos de RMN (ver tabla) entre los compuestos **LF-2** y **LF-3** presentan gran similitud. La única diferencia estriba en que la posición C-16 de **LF-3** está sustituida por un grupo acetoxilo, como se puede observar en el estudio de la correlación HMBC entre la señal de H a δ_{H} 5,90 (H-16) y el grupo carbonilo a δ_{C} 170,1, y entre el H del metilo de acetilo a δ_{H} 2,5 con δ_{C} 71,6 (C-16), mientras que el acetoxilo está sustituido en la posición C-28 en el compuesto **LF-2**. De esta forma la estructura del compuesto **LF-3** ha sido establecida como 3-*O*-{ α -L-ramnopiranosil (1→2)- β -D-glucopiranosil (1→2)-[β -D-glucopyranosyl (1→4)]- α -L-arabinopiranosil} 16-*O*-acetil-21-*O*-angeloil barringtogenol C, el cual ha sido denominado **Foenumosido C**.

Foenumoside C (LF-3): polvo blanco, $[\alpha]_{\text{D}}^{23,9} -23,03^{\circ}$ (c 0,15, MeOH); UV (MeOH): λ_{max} (log ϵ) = 207 nm (4,15); IR (KBr) $\nu_{\text{max}} = 3430, 2930, 1716, 1640, 1455, 1379, 1254, 1161, 1070, 1043$ cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, piridina-d₅) δ_{H} 1,16 (3H, s, Me-23), 1,01 (3H, s, Me-24), 0,76 (3H, s, Me-25), 0,73 (3H, s, Me-26), 1,47 (3H, s, Me-27), 1,13 (3H, s, Me-29), 1,29 (3H, s, Me-30), 3,07 (1H, *dd*, $J = 11,3, 3,7$ Hz, H-3), 0,62 (1H, *d*, $J =$

11,3 Hz, H-5), 1,60 (1H, m, H-9), 5,34 (1H, brs, H-12), 5,90 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-16), 2,95 (1H, dd-símil, H-18), 5,97 (1H, d, $J = 10,1$, H-21), 4,78 (1H, d, $J = 10,1$ Hz, H-22), 3,65 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-28a), 3,91 (1H, d, $J = 10,3$ Hz, H-28b), 5,87 (1H, cc, H-3'), 2,00 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-4'), 1,92 (3H, s, H-5'), 2,5 (3H, s, COCH₃); ¹H and ¹³C NMR (ver tablas); FABMS (negativo) m/z [M-1]⁻ 1215, 1158, 1069, 907, 809, 741, 599, 339, 205, 159, 99; HRESIMS (negativo) m/z [M-1]⁻ 1215,6149 (calcd 1215,6162 para C₆₀H₉₅O₂₅).

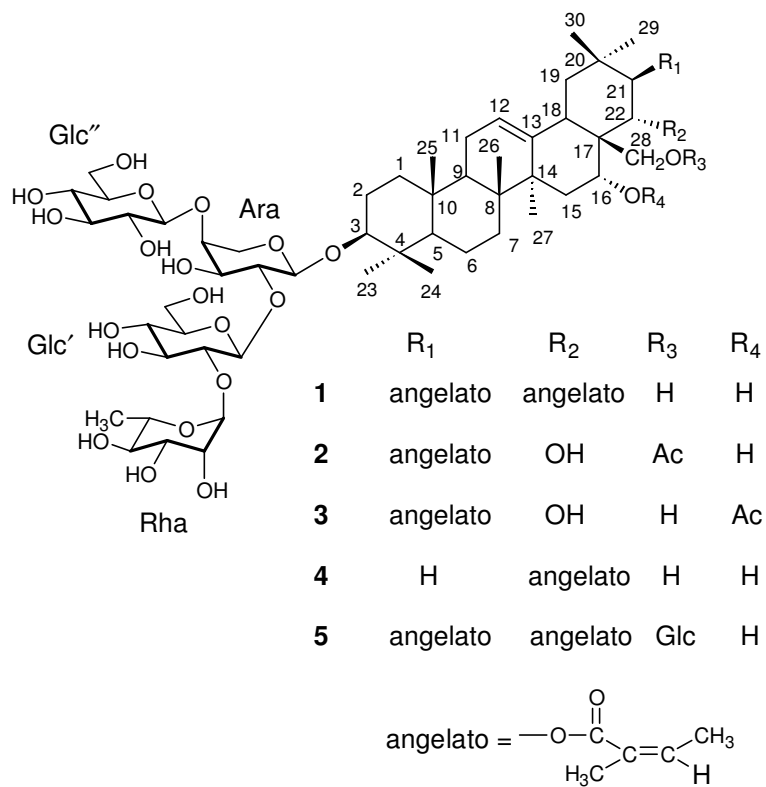
Al compuesto **LF-4** se le asignó un peso molecular de 1158, como indica el pico cuasimolecular a m/z 1157 [M-1]⁻ en el FABMS-, que se corresponde con una fórmula molecular de C₅₈H₉₄O₂₃. En el espectro ¹³C RMN (ver tabla) se observan 58 señales de C. Existe una estrecha correlación entre las señales de RMN de **LF-4** y **LF-1**, lo que implica que **LF-4** posee similar genina y la misma cadena polisacárida en posición C-3. Comparando los espectros de ambos compuestos, en el de **LF-4** se aprecia la eliminación de un resto angeloil en las posiciones C-21 or C-22, y un metino oxigenado que es reemplazado por un metileno. El par de protones de metileno a δ_H 2,82 (1H) y 2,04 (1H), ambos superpuestos a otros, están directamente unidos al C de señal a δ_C 41,8 como se observa en el experimento HMQC, presentando interacciones HMBC con las señales de los C a δ_C 44,9 (C-17), 73,0 (C-22), 32,1 (C-20) y 25,3 (C-30), indicando la pérdida del angeloil del C-21 en el caso de **LF-4**. H-22 tiene una orientación β como se aprecia en la correlación REOSY de H-22 con Me-30 y H-18. En base a estas evidencias, la estructura de **LF-4** se asigna como 3-O-{ α -L-ramnopiranosil(1→2)- β -D-glucopiranosil(1→2)- [β -D-glucopiranosil(1→4)]- α -L-arabinopiranosil} 21-dehidroxi-22-O-angeloil barring- togenol C, el cual ha sido denominado como **Foenumósido D**.

Foenumoside D (LF-4): polvo blanco, $[\alpha]_D^{23,7} = -1,2$ (*c* 0,14, MeOH); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ ($\log \epsilon$) = 207 nm (4,17); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} = 3425, 2929, 1692, 1641, 1457, 1386, 1241, 1160, 1074 \text{ cm}^{-1}$; ^1H NMR (400 MHz, piridina- d_5) δ_{H} 1,15 (3H, s, Me-23), 1,01 (3H, s, Me-24), 0,81 (3H, s, Me-25), 0,86 (3H, s, Me-26), 1,84 (3H, s, Me-27), 1,04 (3H, s, Me-29), 1,28 (3H, s, Me-30), 3,12 (1H, *dd*, $J = 11,5, 3,8 \text{ Hz}$, H-3), 0,62 (1H, *d*, $J = 11,3 \text{ Hz}$, H-5), 1,68 (1H, *m*, H-9), 5,38 (1H, *brs*, H-12), 4,69 (1H, *dd*, H-16), 3,09 (1H, *brs*, H-18), 2,82 (1H, superpuesto, H-21a), 2,04 (1H, superpuesto, H-21b), 6,21 (1H, *dd*, $J = 11,6, 6,3 \text{ Hz}$, H-22), 3,55 (1H, *d*, $J = 10,1 \text{ Hz}$, H-28a), 3,69 (1H, *d*, $J = 10,1 \text{ Hz}$, H-28b), 5,91 (1H, *cc*, H-3'), 2,08 (3H, *d*, $J = 7,3 \text{ Hz}$, Me-4'), 1,19 (3H, s, Me-5'); ^1H y ^{13}C RMN (ver tablas); FABMS (negativo) m/z $[\text{M}-1]^-$ 1157, 1075, 1011, 995, 929, 849, 809, 599, 527, 449, 379, 325, 233, 159, 99; HRESIMS (negativo) m/z $[\text{M}-1]^-$ 1157,6132 (calcd 1157,6107 para $\text{C}_{58}\text{H}_{93}\text{O}_{23}$).

El compuesto **LF-5** se obtuvo como un polvo blanco, de fórmula molecular $\text{C}_{69}\text{H}_{110}\text{O}_{30}$, como se deduce del pico cuasimoleculal a m/z 1417 $[\text{M}-1]^-$ en el FABMS– y el análisis de los espectros de RMN. El peso molecular de **LF-5** es de 162 unidades de masa más que **LF-1**, lo que implica una hexosa adicional. El espectro RMN (ver tabla) de la genina de **LF-5** es prácticamente superponible al de **LF-1**, indicando que ambos compuestos comparten la misma genina. En el espectro HMQC-TOCSY, un H anomérico adicional a δ_{H} 4,71 está correlacionado con las señales de los 6 C a δ_{C} 104,5 (C-1), 75,2 (C-2), 78,4 (C-3), 71,8 (C-4), 78,2 (C-5) y 63,0 (C-6), características de una unidad de glucosa unida a la posición C-28 de la aglicona ya que presenta correlación HMBC entre el H anomérico a δ_{H} 4,71 y el C a δ_{C} 73,2 (C-28). La configuración del H anomérico de la glucosa se estableció como β en virtud de la constante de acoplamiento del H anomérico. Con estos datos, la configuración de

la estructura **LF-5** se estableció como 3-*O*-{ α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil} 21,22-*O*- diangeloil barringtogenol C 28-*O*-glucopiranosido, denominado **Foenumósido E**.

Foenumósido E (LF-5): polvo blanco, $[\alpha]_D^{22,8} = -3,65$ (*c* 0,14, MeOH); UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ (log ϵ) = 211 nm (4,34); IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}} = 3432, 2927, 1706, 1639, 1458, 1388, 1358, 1243, 1163, 1077, 1042 \text{ cm}^{-1}$; ^1H RMN (400 MHz, piridina- d_5) δ_{H} 1,17 (3H, s, Me-23), 1,03 (3H, s, Me-24), 0,85 (3H, s, Me-25), 1,03 (3H, s, Me-26), 1,79 (3H, s, Me-27), 1,07 (3H, s, Me-29), 1,28 (3H, s, Me-30), 3,13 (1H, *dd*, H-3), 0,68 (1H, *d*, $J = 11,1$ Hz, H-5), 1,68 (1H, *dd*, H-9), 5,42 (1H, *brs*, H-12), 4,72 (1H, *brs*, H-16), 2,87 (1H, *dd*, H-18), 6,67 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz, H-21), 6,21 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz, H-22), 3,41 (1H, *d*, $J = 9,3$ Hz, H-28a), 4,04 (1H, *d*, $J = 9,3$ Hz, H-28b), 5,94 (1H, *cc*, H-3'), 2,05 (3H, *brs*, Me-4'), 1,98 (3H, s, Me-5'), 5,89 (1H, *cc*, H-3''), 2,05 (3H, *brs*, Me-4''), 1,81 (3H, s, Me-5''); ^1H y ^{13}C RMN (ver tablas); FABMS (negativo) m/z $[\text{M}-1]^-$ 1417, 1336, 1256, 1220, 1110, 886, 748, 599, 465, 279, 183, 99; HRESIMS (negativo) m/z $[\text{M}-1]^-$ 1417,6977 (calcd 1417,7003 para $\text{C}_{69}\text{H}_{109}\text{O}_{30}$).



Estructuras químicas de los saponósidos aislados de *Lysimachia foenum-graecum*

^{13}C RMN (δ) de las agliconas de los compuestos **LF-1**, **LF-2**, **LF-3**, **LF-4**, y **LF-5**. Espectros RMN obtenidos en piridina- d_5 , 400 MHz, 25 °C; desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (p.p.m.)

C	LF-1	LF-2	LF-3	LF-4	LF-5	C	LF-1	LF-2	LF-3	LF-4	LF-5
1	38,9	38,9	38,8	38,9	38,9	23	28,1	28,1	28,0	28,1	28,1
2	26,5	26,5	26,4	26,5	26,4	24	16,7	16,7	16,8	16,7	16,7
3	89,1	89,1	89,0	89,1	89,1	25	15,9	15,7	15,6	15,7	15,8
4	39,6	39,6	39,5	39,6	39,5	26	16,9	17,1	16,5	16,9	16,9
5	55,8	55,8	55,8	55,8	55,7	27	27,6	27,5	27,0	27,6	27,6
6	18,5	18,5	18,3	18,5	18,5	28	63,7	66,5	64,7	63,6	73,2
7	33,1	33,2	33,0	33,1	33,0	29	29,6	29,9	30,1	33,6	29,5
8	40,1	40,1	40,0	40,1	40,2	30	20,4	20,3	20,2	25,3	20,5
9	47,0	47,0	46,9	47,0	46,9	Angeloilo					
10	36,8	36,9	36,8	36,8	36,8	1'	167,7	168,6	168,3	168,1	167,7
11	23,9	24,0	23,8	23,9	23,9	2'	129,0	129,5	129,2	129,5	128,9
12	124,0	124,1	124,5	123,8	124,5	3'	137,1	136,2	136,9	136,7	137,3
13	142,7	142,8	141,8	143,7	142,1	4'	15,8	16,0	16,0	15,9	15,9
14	41,7	41,9	41,4	41,6	41,6	5'	21,1	20,8	21,2	21,1	21,0
15	34,9	34,7	30,9	35,1	34,8	1''	168,2				168,2
16	68,7	67,7	71,6	70,2	68,1	2''	129,1				129,1
17	48,1	47,2	47,3	44,9	46,9	3''	137,2				137,8
18	40,2	40,6	39,8	40,9	40,9	4''	15,9				15,9
19	47,3	47,3	47,6	47,5	46,9	5''	20,9				20,8
20	36,4	36,2	36,1	32,1	36,3	Acetilo					
21	78,8	81,2	80,5	41,8	78,2	1''		170,8	170,1		
22	73,7	71,1	70,6	73,0	74,7	2''		21,1	22,3		

^{13}C RMN de los azúcares de los compuestos **LF-1**, **LF-2**, **LF-3**, **LF-4** y **LF-5**. Espectros RMN obtenidos en piridina- d_5 , 400 MHz, 25 °C; desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (p.p.m.). Las asignaciones están hechas en función de los datos de los espectros ROESY, HMQC, COSY, HMBC, HMQC-TOCSY. * = señales superpuestas con otras señales

C	LF-1	LF-2	LF-3	LF-4	LF-5
3-O-cadena tetraazucarada					
Ara					
1	104,6	104,6	104,6	104,5	104,5*
2	80,9	81,0	80,9	80,9	80,8
3	72,4*	72,4*	72,4*	72,4	72,4*
4	74,9*	74,8	74,9*	74,8	74,9*
5	63,7	63,6	64,6	63,7	63,7
Glc'					
1	105,1	105,5	105,5	105,8	105,5
2	77,3	77,3	77,3	77,4	77,4
3	76,4	76,5	76,4	76,5	76,4
4	71,8	71,7	71,8	71,7	71,7
5	78,1	78,1	78,1	78,1	78,1
6	62,9	62,9	62,9	62,9	62,9
Rha					
1	101,6	101,6	101,6	101,6	101,6
2	72,4*	72,4*	72,4*	72,5	72,4*
3	72,7	72,7	72,7	72,8	72,7
4	74,7	74,7	74,7	74,9*	74,7
5	69,5	69,5	69,4	69,5	69,5
6	19,0	19,0	19,0	19,0	19,0
Glc''					
1	103,1	103,1	103,1	103,1	103,2
2	74,9*	74,9	74,9*	74,9*	74,9*
3	79,5	79,6	79,6	79,6	79,6
4	71,9	71,9	71,9	71,9	71,9
5	78,4	78,4	78,4	78,5	78,5
6	62,7	62,7	62,7	62,6	62,6
Glc''' en C-					
28					
1					104,5*
2					75,2
3					78,4
4					71,8
5					78,2
6					63,0

¹H RMN de los azúcares de los compuestos **LF-1**, **LF-2**, **LF-3**, **LF-4** y **LF-5**. Espectros RMN obtenidos en piridina-*d*₅, 400 MHz, 25 °C; desplazamientos químicos (δ) en partes por millón (p.p.m.). Las asignaciones están hechas en función de los datos de los espectros ROESY, HMQC, COSY, HMBC, HMQC-TOCSY. * = señales superpuestas con otras señales.

C	LF-1	LF-2	LF-3	LF-4	LF-5
3- <i>O</i> -cadena tetraazucarada					
Ara					
1	4,94 (<i>brs</i>)	4,91 (<i>brs</i>)	4,88 (<i>brs</i>)	4,91 (<i>brs</i>)	4,93 (<i>brs</i>)
2	4,55	4,55	4,56	4,57	4,57
3	4,68	4,68*	4,68	4,72	4,68
4	4,26	4,27	4,28*	4,25	4,25
5	4,32 y 3,78	4,30* y 3,76	4,34 y 3,78	4,32 y 3,78	4,32 y 3,79
Glc'					
1	5,37 (<i>d</i> , 7,6)	5,37 (<i>d</i> , 8,8)	5,38 (<i>d</i> , 7,6)	5,37 (<i>d</i> , 7,3)	5,37 (<i>d</i> , 7,8)
2	4,04	4,07	4,07	4,06	4,05*
3	4,28	4,25	4,28*	4,29	4,28
4	4,18	4,22*	4,22*	4,22	4,17*
5	4,08	4,30*	4,06	4,04	4,08
6	4,35 y 4,24	4,35 y 4,22*	4,37 y 4,22*	4,38 y 4,23	4,35 y 4,23
Rha					
1	6,39 (<i>brs</i>)	6,40 (<i>brs</i>)	6,41 (<i>brs</i>)	6,41 (<i>brs</i>)	6,40 (<i>brs</i>)
2	4,51	4,69	4,70	4,51	4,50
3	4,59	4,68*	4,67	4,59	4,61
4	4,52	4,57	4,58	4,52	4,55
5	5,01	5,03	5,04	5,03	5,02
6	1,79 (<i>d</i> , 5,8)	1,77 (<i>d</i> , 5,8)	1,80 (<i>d</i> , 5,7)	1,79 (<i>d</i> , 5,8)	1,79 (<i>d</i> , 5,8)
Glc''					
1	5,25 (<i>d</i> , 7,8)	5,27 (<i>d</i> , 7,5)	5,27 (<i>d</i> , 7,3)	5,24 (<i>d</i> , 7,0)	5,24 (<i>d</i> , 7,5)
2	4,17	4,17	4,16	4,14	4,18
3	4,16	4,14	4,17	4,16	4,17*
4	4,13	4,12	4,13	4,12	4,14*
5	3,80	3,79	3,78	3,80	3,81
6	4,57 y 4,48	4,59 y 4,49	4,53 y 4,48	4,55 y 4,48	4,58 y 4,47
Glc''' en C-28					
1					4,71 (<i>d</i> , 8,0)
2					3,99
3					4,26
4					4,14*
5					4,05*
6					4,44, 4,39

IV.2.4. ESTUDIO DE ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

A. Estudio de la viabilidad celular

Previamente al estudio de actividad *in vitro*, se realizó el ensayo de viabilidad celular en presencia de los principios **LF-1**, **LF-2**, **LF-3**, **LF-4** y **LF-5**. Los compuestos **LF-1**, **LF-2** y **LF-4** presentaron citotoxicidad frente a leucocitos polimorfonucleares de rata y humanos a concentraciones 10 μM y superiores, con porcentajes de supervivencia del 50%. El compuesto **LF-3** presenta toxicidad frente a células de rata pero no frente a células humanas a concentraciones de 10 y 50 μM (100% viabilidad). En el caso del compuesto **LF-5** no presentó toxicidad frente a leucocitos polimorfonucleares de rata ni humanos a concentraciones comprendidas entre 10 y 100 μM .

B. Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico

Solo el compuesto **LF-5** pudo ser ensayado como posible inhibidor de la producción de LTB_4 en leucocitos peritoneales de rata. La producción se redujo notablemente a 100 μM (81%), siendo un efecto dosis-dependiente por lo que se determinó la concentración mínima inhibitoria, obteniendo un valor CI_{50} de 74 μM . Cuando se ensayó la actividad de **LF-5** a 100 μM frente a las enzimas COX-1 y 12-LOX, se obtuvieron valores del 14% de inhibición para la COX-1, evaluada mediante la producción del metabolito 12-HHTrE, y un 50% frente a la 12-LOX, evaluada mediante la inhibición de la producción del metabolito 12-HETE.

C. Inhibición de la actividad de la enzima elastasa

Todos los compuestos se ensayaron frente a la elastasa humana como potenciales inibidores de la misma. Ninguno de los compuestos aislados inhibió ni la actividad ni la liberación de la enzima.

IV.3. LITHOSPERMUM ERYTHRORHIZON

IV.3.1. EXTRACCIÓN

La raíz de *Lithospermum erythrorhizon* seca y pulverizada (456 g) se trituró y extrajo con MeOH a temperatura ambiente (1500 mL). El líquido metanólico se concentró hasta sequedad, obteniendo un residuo seco de 90 g.

IV.3.2. FRACCIONAMIENTO

El residuo obtenido se fraccionó directamente mediante extracción líquido-líquido, utilizando disolventes de polaridad creciente. El residuo del extracto MeOH se redisolvió en la mínima cantidad de metanol y se emulsionó con agua. La emulsión se extrajo secuencialmente con *n*-hexano (600 mL), CH₂Cl₂ (800 mL), AcOEt (800 mL) y *n*-BuOH (300 mL). Los líquidos extractivos respectivos se concentraron a presión reducida en rotavapor, dando lugar a 4 extractos: hexánico (1,7 g), diclorometánico (4,0 g), acetatoetílico (5,5 g) y butanólico (2,6 g). Sobre los 4 extractos se efectuó un estudio de actividad inhibidora de la producción de LTB₄, siendo el extracto diclorometánico el más activo por lo que se procedió a su fraccionamiento.

De los diferentes subextractos se han identificado por CCF una serie de derivados de la shikonina, los cuales han sido objeto de estudio, conjuntamente con los diferentes subextractos.

IV.3.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

A. Actividad antioxidante

El extracto total metanólico y los subextractos hexánico, diclorometánico, y acetatoetílico, pero no el butanólico, tuvieron actividad significativa en los test DPPH, ABTS y Fe²⁺/ascorbato/homogenado de cerebro, dando

similares efectos en todos los casos, con rangos de CI_{50} comprendidos entre 113 y 90 $\mu\text{g/mL}$ en el test DPPH, entre 24 y 11 $\mu\text{g/mL}$ en el test ABTS, y entre 1,2 y 13 $\mu\text{g/mL}$ en el test de peroxidación lipídica. Sin embargo, ninguno de los extractos demostró capacidad captadora del radical superóxido ni inhibió la actividad de la xantina oxidasa.

Actividad inhibidora de la peroxidación lipídica y captadora de radicales libres en diversos sistemas del extracto metanólico de *Lithospermum erythrorhizon* y los subextractos obtenidos a partir del mismo

CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de los extractos de <i>Lithospermum erythrorhizon</i>					
	MeOH	<i>n</i> -Hexano	CH_2Cl_2	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
DPPH*	113,2	89,7	109,0	92,1	> 100
ABTS**	23,7	15,1	11,4	12,2	> 100
Anión superóxido	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Peroxidación lipídica	12,6	1,2	5,6	8,6	>100

B. Efecto quelante sobre el ion ferroso

La capacidad quelante de la sustancia de referencia es significativa ya que reduce la concentración de catalización del metal de transición en la peroxidación lipídica. Sin embargo, ni el extracto metanólico total ni las subfracciones obtenidas presentaron efecto quelante.

C. Equivalencia en fenoles totales

El estudio del contenido en compuestos fenólicos (fenoles totales) expresados en μg equivalentes de quercetina por mg de extracto dio una variación comprendida entre 4,0 (extracto BuOH) y 64,0 (extracto AcOEt). Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla.

Contenido de fenoles totales en extractos de *Lithospermum erythrorhizon*

Extracto	μg equivalentes de quercetina / mg de extracto
Total (MeOH)	39,0
<i>n</i> -Hexano	53,5
CH ₂ Cl ₂	60,0
AcOEt	64,0
<i>n</i> -BuOH	4,0

En paralelo se ha estudiado la actividad antioxidante de shikonina y sus derivados. Estos compuestos se encuentran presentes en la especie estudiada y se ha puesto de manifiesto su presencia mediante técnicas cromatográficas. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla:

CI ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) <i>n</i> = 3					
	ABTS	DPPH	Superóxido	XOD	Fe ²⁺ /ascorbato/ cerebro
Shikonina	1.93	56.3	>100	>100	6.3
Deoxishikonina	1.89	>100	>100	>100	4.3
Isobutilshikonina	1.87	>100	>100	>100	6.9
(β,β -dimetilacril)-shikonina	2.09	>100	>100	>100	4.7
Isovalerilshikonina	2.58	>100	>100	>100	3.9
(2-metil- <i>n</i> -butiril)-shikonina	4.57	>100	>100	>100	6.8

D. Actividad antiinflamatoria

El extracto diclorometánico fue estudiado como potencial antiinflamatorio en función de su actividad como antioxidante, el rendimiento extractivo y características cromatográficas. El extracto redujo el edema inducido por carragenina un 40% (**P* < 0,05) y 51% (***P* < 0,01) a 1 h y 3 h, respectivamente, desapareciendo el efecto a las 5 h.

Frente al edema agudo inducido por TPA en oreja de ratón, el extracto diclorometánico (1 mg/oreja) redujo significativamente el edema un 82% (** $P < 0,01$), frente al 92% de indometacina (0,5 mg/oreja).

Actividad antiinflamatoria del extracto diclorometánico de *Lithospermum erythrorhizon*. ΔP = incremento de peso en mg; ΔV = incremento de volumen en μL . * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ en test de t de Dunnett

	TPA		Carragenina					
	4 h		1 h		3 h		5 h	
	$\Delta P \pm \text{SEM}$	%I	$\Delta V \pm \text{SEM}$	%I	$\Delta V \pm \text{SEM}$	%I	$\Delta V \pm \text{SEM}$	%I
Control	$17,3 \pm 1,2$	–	105 ± 5	–	153 ± 1	–	137 ± 2	–
Extracto CH_2Cl_2	$3,2 \pm 0,8^{**}$	82	$63 \pm 1^*$	40	$75 \pm 3^{**}$	51	100 ± 1	27
Indometacina	$1,4 \pm 0,4^{**}$	92	–	–	–	–	–	–
Ibuprofeno	–	–	73 ± 2	30	$83 \pm 1^{**}$	46	$85 \pm 1^*$	38

IV.4. FORSYTHIA SUSPENSATA

IV.4.1. EXTRACCIÓN

Los frutos secos y pulverizados de *Forsythia suspensa* (500 g) se trituraron y a continuación se procedió a la extracción mediante maceración a temperatura ambiente con MeOH (5×1000 mL). El líquido extractivo se concentró a presión reducida en rotavapor, obteniendo un residuo seco de 50,6 g.

IV.4.2. FRACCIONAMIENTO

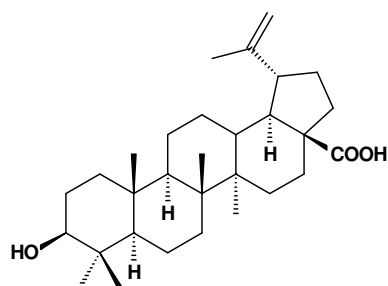
El extracto seco metanólico se redisolvió en una mezcla MeOH- H_2O (1:10) dando lugar a un precipitado amarillo al enfriar en nevera (4°C). El precipitado seco (31 g) se emulsionó en H_2O (600 mL) y se procedió a un fraccionamiento líquido-líquido, utilizando disolventes de polaridad creciente. Se extrajo de forma secuencial con *n*-hexano (3×150 mL), CH_2Cl_2 (3×200 mL), AcOEt (3×200 mL) y *n*-BuOH (3×150 mL). Los

líquidos extractivos se concentraron a presión reducida en rotavapor, obteniendo los 4 extractos secos correspondientes: hexánico (5,3 g), diclorometánico (10,4 g), acetatoetílico (2,4 g) y butanólico (1,7 g). Todos los extractos se estudiaron como posibles inhibidores de la actividad 5-LOX y fue el diclorometánico el que inhibió de forma más clara la producción de LTB₄ (ver sección IV.4.4), por lo que se procedió solo al fraccionamiento cromatográfico de este extracto.

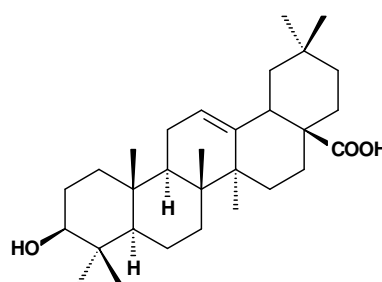
El extracto CH₂Cl₂ se cromatografió sobre silicagel (VLC) utilizando como fase móvil CH₂Cl₂ y mezclas de CH₂Cl₂-AcOEt de polaridad creciente (95:5 hasta 0:100) y finalmente se eluyó con MeOH. Las fracciones 11-13 eluidas con CH₂Cl₂-AcOEt (50:50) se reunificaron por similitud cromatográfica, dando lugar por precipitación a un compuesto que fue purificado por repetidas precipitaciones en MeOH. Al compuesto aislado se le denominó **FS-1** (100 mg). Las fracciones 16 a 21, eluidas con MeOH se reunificaron por similitud cromatográfica, observándose un compuesto mayoritario que se purifica por precipitación en MeOH, y se le denomina **FS-2** (600 mg).

IV.4.3. IDENTIFICACIÓN

El compuesto **FS-1** se ha identificado por medios fisicoquímicos y espectroscópicos como el ácido betulínico y **FS-2** como ácido oleanólico. Los valores de desplazamientos de RMN de ¹H y ¹³C se recogen en la tabla.



Ácido betulínico (FS-1)



Ácido oleanólico (FS-2)

C	FS-1		FS-2	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	38,6		38,5	
2	26,7		27,4	
3	78,5	3,19, <i>dd</i> , 1H	78,7	3,44, <i>dd</i> , 1H
4	38,5		38,7	
5	55,1		55,2	
6	18,1		18,3	
7	34,1		32,6	
8	40,4		39,3	
9	50,3		47,6	
10	36,9		37,0	
11	20,6		23,1	1,96, <i>bdrs</i> , 2H
12	25,3		122,1	5,49, <i>s</i> , 1H
13	38,0		143,4	
14	42,2		41,6	
15	30,4		27,7	
16	32,1		23,4	
17	56,3		46,4	
18	46,8		41,3	3,30, <i>dd</i> , 1H β
19	49,0	2,99, <i>ddd</i> , 1H	45,8	1,83 1H α ; 1,32 1H β
20	150,6		30,6	
21	29,4		33,8	1,46 1H α - 1,23 1H β
22	37,0		32,3	1,82 1H α - 2,04 1H β
23	27,6	0,93, <i>s</i> , 3H	28,1	1,24, <i>s</i> , 3H
24	15,1	0,75, <i>s</i> , 3H	15,6	1,02, <i>s</i> , 3H
25	15,6	0,82, <i>s</i> , 3H	15,3	0,93, <i>s</i> , 3H
26	15,8	0,96, <i>s</i> , 3H	16,8	1,04, <i>s</i> , 3H
27	14,4	0,97, <i>s</i> , 3H	26,0	1,30, <i>s</i> , 3H
28	179,3		181,0	
29	109,2	4,60, <i>d</i> , 1H - 4,73, <i>d</i> , 1H	33,1	0,97, <i>s</i> , 3H
30	19,0		23,6	1,02, <i>s</i> , 3H

Los valores de punto de fusión y $[\alpha]_D$ coinciden respectivamente con los de los ácidos betulínico y oleanólico y se recogen en la siguiente tabla.

FS-1	$[\alpha]_D^{25} = + 7,9$ (c 0,5, CHCl ₃)	Punto de fusión: 275-278 °C
FS-2	$[\alpha]_D^{25} = + 79,5$ (c 0,5, CHCl ₃)	Punto de fusión: 306-308 °C

IV.4.4. ESTUDIO DE ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

A. Actividad inhibidora de la producción de LTB₄

El extracto MeOH de *Forsythia suspensa* se ensayó como potencial inhibidor de la síntesis de LTB₄, dando porcentajes de inhibición del 100% a 100 μM y del 58% a 50 μM. A continuación se procedió al fraccionamiento y estudio de las subfracciones para seleccionar la más activa. Sin embargo, ninguna de las 4 fracciones obtenidas a partir del extracto MeOH superaron el efecto del extracto de partida. Los porcentajes de inhibición de la producción de LTB₄ obtenidos fueron los siguientes:

	100 μM	50 μM
Extracto total MeOH	100%	58%
Subextracto Hexánico	17%	–
Subextracto CH ₂ Cl ₂	46%	–
Subextracto AcOEt	40%	–
Subextracto BuOH	38%	–

Como del subextracto diclorometánico se aislaron **FS-1** y **FS-2**, que al tratarse de principios conocidos y estudiados por nuestro grupo de investigación, no se continuó con su estudio.

B. Actividad antioxidante

Los cuatro subextractos han sido estudiados como potenciales antioxidantes, en virtud de los resultados previos realizados por nuestro grupo con el extracto hidroetanólico. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

Actividad inhibidora de la peroxidación lipídica y captadora de radicales libres en diversos sistemas de los subextractos de *Forsythia suspensa*. E.A.A. = Equivalentes de ácido ascórbico por mg de extracto. E.Q. = Equivalencia en μg de quercetina por mg de extracto

	Cl ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				E.A.A.	E.Q.
	DPPH	ABTS	HX - XOD	Fe ²⁺ -ascorbato	FRAP	Fenoles totales
<i>n</i> -Hexano	>200	>200	>200	>200	69	25,5
CH ₂ Cl ₂	>200	>200	>200	>200	108	22,1
EtOAc	12,8	14,4	115,9	62,2	548	74,8
<i>n</i> -BuOH	3,4	5,1	37,4	40,5	1313	134,0

Los extractos hexánico y diclorometánico no fueron activos en ninguna de las pruebas realizadas. El extracto acetatoetílico, y sobre todo el butanólico claramente inhibieron la peroxidación lipídica inducida por Fe²⁺-ascorbato en homogenado de cerebro de rata, y actuó como captador de radicales DPPH, ABTS y superóxido. A 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ los extractos no inhibieron la actividad de la xantina oxidasa. La determinación del poder reductor (FRAP) y el contenido en fenoles totales expresados en quercetina, justifican la mayor actividad de los extractos polares.

IV.5. *ISODON XEROPHILUS*

IV.5.1. EXTRACCIÓN

Las hojas *Isodon xerophilus* (8,3 kg) secas y pulverizadas, se extrajeron con acetona 70%. El líquido extractivo se concentró a presión reducida

en rotavapor hasta obtener un residuo de 660 g. A continuación se suspendió en agua y se realizó una extracción con AcOEt y posteriormente con *n*-BuOH. La fracción soluble en AcOEt se concentró, dando un residuo de 440 g.

IV.5.2. FRACCIONAMIENTO

La fracción soluble en AcOEt se cromatografió en columna de silicagel, eluyendo con CHCl₃, mezclas de CHCl₃-Me₂CO (90%, 80%, 70%, 60% y 50%) y finalmente con Me₂CO. Se obtuvieron directamente un compuesto (**IX-0**, 1,0 g) y 7 fracciones (I-VII). La fracción-III eluida con CHCl₃-MeOH (80:20) una vez concentrada se cromatografió en MPLC utilizando fase reversa RP-18 y mezclas MeOH-H₂O de polaridad creciente, obteniendo un producto puro denominado **IX-1** (2 g). La fracción-4 eluida con CHCl₃-MeOH (70:30) una vez concentrada se cromatografió en MPLC utilizando fase reversa RP-18 y mezclas MeOH-H₂O de polaridad creciente, obteniendo un producto puro denominado **IX-2** (200 mg).

De la fracción III también se aislaron otros compuestos previamente descritos en esta especie. Al redissolver la fracción en acetona, cristalizó un compuesto puro que se denominó **IX-3** (298 mg). El sobrenadante se cromatografió en columna de silicagel y éter de petróleo-AcOEt. La fracción eluida con éter de petróleo-AcOEt (8:2), se purificó posteriormente en fase reversa (RP-18) con MeOH-H₂O (2:3) como fase móvil dando el compuesto **IX-4** (900 mg) e **IX-5** (340 mg). La fracción eluida con éter de petróleo-AcOEt (1:1) posteriormente se purificó en silicagel y *n*-hexano-*i*-PrOH (5:1) como fase móvil y finalmente en fase reversa (RP-18) con MeOH-H₂O (65:35) como eluyente. Se obtuvo un compuesto denominado **IX-6**.

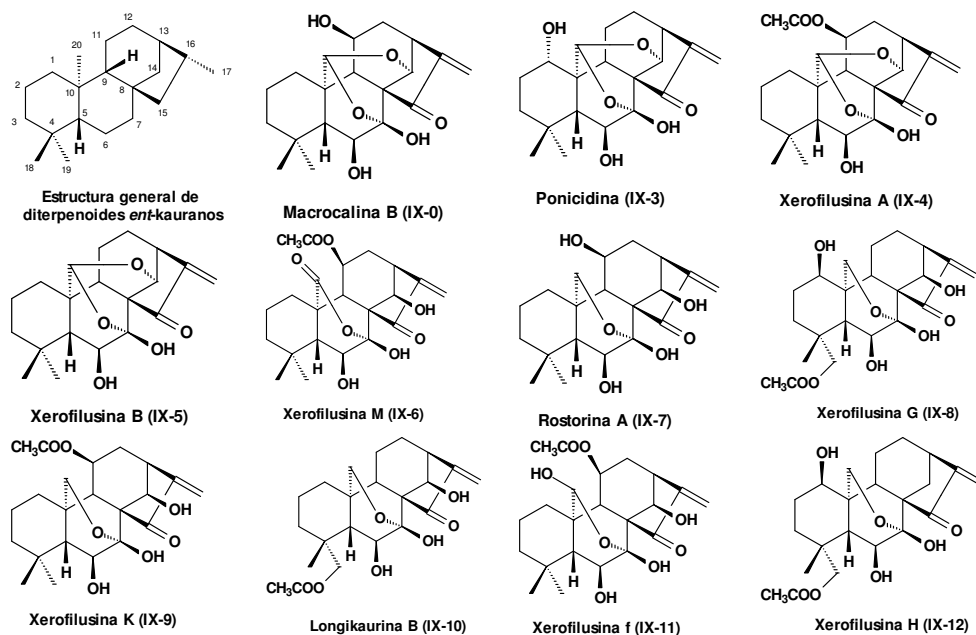
En la fracción VI cristalizan unas agujas incoloras que se recristalizan en MeOH, dando lugar al compuesto **IX-7** (1,1 g). El sobrenadante se purifica por gel-filtración y se cromatografía en fase reversa eluyendo en gradiente de MeOH-H₂O (60:40 a 90:10) como fase móvil. La fracción eluida con la mezcla 8:2 se recromatografió sobre silicagel eluyendo con éter de petróleo-AcOEt (7:3) y la fracción de esta columna se purificó sobre silicagel y éter de petróleo-*i*-PrOH (4:1) dando lugar a 2 compuestos que se denominan **IX-8** (3,3 g) e **IX-9** (88 mg). La fracción VII dio lugar directamente al compuesto **IX-10** (260 mg), tras cromatografía en silicagel y precipitación. Finalmente, los otros 2 compuestos que serán objeto de estudio habían sido previamente aislados de esta especie, se denominan **IX-11** e **IX-12** [Hou et al., 2000b].

IV.5.3. IDENTIFICACIÓN

Los compuestos **IX-0** e **IX-3** a **IX-12** habían sido previamente descritos y han sido identificados como los diterpenoides siguientes

Compuesto	Denominación	Referencia bibliográfica
IX-0	Macrocalina B	Hou et al., 2000a
IX-3	Ponicidina	Li et al., 2002
IX-4	Xerofilusina A	Hou et al., 2000a
IX-5	Xerofilusina B	Hou et al., 2000a
IX-6	Xerofilusina M	Li et al., 2002
IX-7	Rostorina A	Hou et al., 2001b
IX-8	Xerofilusina G	Hou et al., 2001b
IX-9	Xerofilusina K	Hou et al., 2001b
IX-10	Longikaurina B	Hou et al., 2001b
IX-11	Xerofilusina F	Hou et al., 2000b y Hou et al., 2001a
IX-12	Xerofilusina H	Hou et al., 2000b y Hou et al., 2001a

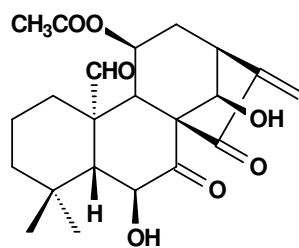
Las estructuras químicas de todos los *ent*-diterpenoides aislados de *Isodon xerophilus* se recogen a continuación



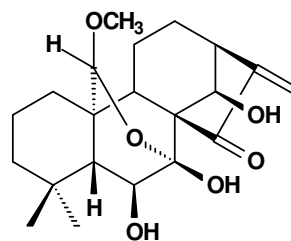
El espectro ^1H -RMN del compuesto **IX-1** presenta un singlete de acetilo característico a δ 1,80 (3H, s) y en el ^{13}C -RMN a δ 169,2 y 21,4, señales ausentes en el IX-2. La presencia de un carbonilo conjugado con un metileno exocíclico se observó en los espectos UV e IR, y se confirma en el ^1H -RMN δ 5,95 y 9,51 (cada uno 1H, s) para **IX-1** y δ 6,28 y 5,50 (cada uno 1H, s) para **IX-2**, y ^{13}C -RMN δ 207,4, 149,1 y 116,5 para **IX-1** y δ 209,6, 153,2 y 119,9 para **IX-2**, correspondientes a los carbonos 15, 16 y 17 respectivamente. La presencia de 2 grupo ceto a δ 199,6 (C-7) y 207,4 (C-15) y 1 aldehído a δ 204,7 (C-20) diferencia **IX-1** de **IX-2**, el cual presenta 1 ceto a δ 209,6 (C-15), 1 metoxilo a δ 92,9 (C-20) y 1 hidroxilo a δ 99,6 (C-7) correspondiente a un carbono cetálico, unido por un epoxi al C-20. Ambas moléculas presentan un hidroxilo en conformación β en el C-6 a δ 4,26 (1H, d) para **IX-1** y δ 4,28 (1H, d) para

IX-2, y ^{13}C -RMN δ 207,4, 149,1 y 116,5 para **IX-1** y δ 209,6, 153,2 y 119,9 para **IX-2**. Todos los datos citados nos llevan a establecer la estructura de **IX-1** como 6 β ,14 β -dihidroxi-11 β -acetoxi-*ent*-kaur-16-en-7,15-dioxo-20-al, y para **IX-2** como 6 β ,7 β ,14 β -trihidroxi-20-metoxi-11 β -acetoxi-7 α ,20-epoxi-*ent*-kaur-16-en-15-ona.

Los datos espectrales de ^{13}C -RMN y ^1H -RMN obtenidos para los compuestos **IX-1** y **IX-2** se recogen a continuación.



IX-1



IX-2

C	Compuesto IX-1		Compuesto IX-2	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
1	28,6	1,80 m y 1,42 m	30,0	2,21* y 1,37*
2	19,4	1,93 m y 1,44 m	19,3	1,80* y 1,37*
3	41,5	1,20 m y 1,11 m	40,4	1,34 *
4	35,4	–	34,8	–
5	63,3	2,01 d	57,1	1,80 *
6	74,1	4,26 d	75,6	4,68 d
7	199,6	–	104,4	–
8	57,1	–	63,0	–
9	52,4	2,62 s	53,9	3,50 d
10	43,5	–	45,1	–
11	67,5	5,05 m	20,3	1,56 m y 1,37*
12	33,9	2,92 m y 1,56 m	31,6	2,21* m y 1,37*
13	39,1	3,66, d	42,3	2,85 d
14	70,1	5,41 s	75,6	4,68 s
15	207,4	–	210,8	–
16	149,1	–	154,2	–
17	116,5	5,95 s y 5,51 s	119,8	5,31 s y 5,03 s
18	32,6	1,02 s	35,0	1,05 s
19	21,5	0,91 s	23,3	0,90 s
20	204,7	10,95 s	100,6	5,95 s
CH ₃ CO	169,2	–	–	–
CH ₃ CO	21,4	1,80 s	–	–
CH ₃ O	–	–	60,7	3,35 s

* Las señales correspondientes están superpuestas. El espectro **IX-1** está realizado en piridina deuterada (C₆D₅N) y el **IX-2** en metanol deuterado (CD₃OD).

IV.5.4. ESTUDIO DE ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

A. Ensayo de viabilidad celular

Todos los compuestos se han ensayado frente a leucocitos PMN de rata y macrófagos murinos RAW 264.7. Los resultados se recogen en la tabla.

B. Inhibición de producción de NO en macrófagos murinos RAW 264

Los diterpenoides aislados de *Isodon xerophilus* reducen la producción de nitritos en macrófagos murinos RAW 264.7 con diferente potencia. Solo los principios **IX-6** e **IX-7** dieron valores de CI_{50} superiores a 10 μ M. Los resultados se recogen en la tabla.

C. Inhibición de la producción de TNF- α e IL-1 β en macrófagos murinos RAW 264.7

Los *ent*-diterpenos estudiados actúan de diferente forma frente a la producción de TNF- α e IL-1 β en macrófagos murinos RAW 264.7. Los resultados afectan tanto a la potencia como a la producción, ya que algunos de los compuestos incrementan la producción a las diluciones mayores, mientras que actúan como inhibidores a concentraciones 1 μ M y superiores.

El diterpeno **IX-3** inhibe la producción de IL-1 β a diferentes concentraciones, siendo su IC_{50} en cualquier caso inferior a 12,5 nM. El compuesto **IX-2** inhibe claramente la producción (99%) a concentraciones de 50 nM y superiores, sin embargo a concentraciones de 1 nM e inferiores, produce una clara estimulación de la producción. El diterpeno **IX-5** produce una clara estimulación a todas las dosis ensayadas, siendo la respuesta creciente en función de la dilución (66,

222 y 516 de incremento a concentraciones de 100, 50 y 12,5 nM, respectivamente).

Los compuestos **IX-0**, **IX-2**, **IX-5**, **IX-9** y **IX-12** inhiben la producción de TNF- α con valores superiores al 50% a concentraciones inferiores a 0,1 μ M. Los diterpenos **IX-1**, **IX-3** y **IX-7**, inhiben la producción a concentraciones superiores a 10 μ M, sin embargo todos ellos incrementan la producción a concentraciones de 0,1 μ M e inferiores. Los valores de CI_{50} de la inhibición de la producción de TNF- α de los compuestos **IX-4**, **IX-6**, **IX-8** y **IX-11** es superior a 10,0 μ M.

Todos los diterpenos ensayados, excepto **IX-6** y **IX-7**, inhiben la producción de nitritos a concentraciones inferiores a >10 μ M, destacando la potencia de los principios **IX-2** y **IX-5**, con valores inferiores a 0,3 μ M, y **IX-4**, **IX-9**, **IX-10** y **IX-11**, con valores inferiores a 0,9 μ M. Todos los valores de CI_{50} se recogen en la siguiente tabla.

	Toxicidad celular		CI_{50} NO	CI_{50}	
	RAW 264.7	PMNL rata		IL-1 β	TNF- α
IX-0	> 25 μ M	\geq 25 μ M	3,70 μ M	n.d.	< 0,1 μ M
IX-1	> 10 μ M	> 10 μ M	2,10 μ M	n.d.	> 10 μ M *
IX-2	> 1 μ M	> 1 μ M	0,24 μ M	< 50 nM	< 0,1 μ M
IX-3	> 25 μ M	> 10 μ M	2,02 μ M	< 12,5 nM	> 10 μ M *
IX-4	> 1 μ M	> 10 μ M	0,54 μ M	n.d.	> 10 μ M
IX-5	> 1 μ M	> 10 μ M	0,29 μ M	+	< 0,1 μ M
IX-6	> 50 μ M	> 50 μ M	>10 μ M	n.d.	> 10 μ M
IX-7	> 10 μ M	> 10 μ M	>10 μ M	n.d.	> 10 μ M *
IX-8	> 10 μ M	> 10 μ M	7,80 μ M	n.d.	> 10 μ M
IX-9	> 10 μ M	> 1 μ M	0,65 μ M	n.d.	< 0,1 μ M
IX-10	> 10 μ M	> 10 μ M	0,73 μ M	n.d.	1,0 – 0,1 μ M
IX-11	> 25 μ M	> 25 μ M	0,81 μ M	n.d.	> 10 μ M
IX-12	> 25 μ M	> 50 μ M	2,41 μ M	n.d.	< 0,1 μ M

RAW 264.7 = macrófagos murinos RAW 264.7. PMNL = leucocitos polimorfonucleares peritoneales de rata. CI_{50} = concentración inhibitoria-50. + = estimulación de la producción de citocinas. n.d. = no determinada. * Los diterpenos incrementan la producción de TNF- α a concentraciones < 0,1 μ M.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. *SCHINUS MOLLE*

En diversos trabajos previos, nuestro grupo describió la actividad antiinflamatoria y anti-PLA₂ de diferentes triterpenos tetracíclicos [Cuéllar et al., 1996; Giner-Larza et al., 2000a,b,c ; Giner-Larza et al., 2002]. En conjunto, los artículos precedentes demostraron que este grupo fitoquímico posee indudables efectos en modelos crónicos de inflamación [Giner-Larza et al., 2000a; Giner-Larza et al., 2002], pero no poseen relevancia en modelos agudos, excepto en el test de PLA₂. Los resultados obtenidos con estos nuevos compuestos ratifican los datos previos, ya que los triterpenos estudiados son inactivos en el edema inducido por carragenina, mientras que el compuesto **SM-2** inhibió significativamente el edema inducido por PLA₂ a los 60 min. La administración subplantar de PLA₂ produce un edema en la pata tiempo-dependiente. El edema, inducido por la liberación de histamina y serotonina a partir de los mastocitos, es sensible al pre-tratamiento con ciproheptadina, un inhibidor dual serotoninérgico e histaminérgico, corticosteroides e inhibidores selectivos de la PLA₂ [Cirino et al., 1989]. Los datos experimentales obtenidos con **SM-2** en el edema inducido por PLA₂ presenta similares valores que los obtenidos en este mismo modelo, previamente descrito para los lanostanoides de *Poria cocos* [Giner-Larza et al., 2000a], sin embargo los principios de *Schinus molle* presentan un mayor grado de citotoxicidad y diferente comportamiento sobre el metabolismo del ácido araquidónico. En un trabajo previo, Jain et al. (1995) describieron la relevancia de los grupos carboxílicos en la cadena lateral (C-26 o C-27) de los lanostanos, incidiendo en la importancia de la distancia entre los grupos carboxílicos y el núcleo

tetracíclico, la cual debe ser de 8 Å para que posea actividad anti-fosfolipasa. Los lanostanoides **SM-1** y **SM-2**, aislados en el presente trabajo presentan analogías estructurales con los reportados por Jain et al., sin embargo solo uno de los triterpenos aislados de *Schinus molle* modificó moderadamente el edema inducido por PLA₂, y ambos tuvieron reducida actividad sobre la producción de LTB₄ en leucocitos peritoneales de rata, sobre todo si se comparan los resultados actuales con los previamente obtenidos por nuestro mismo grupo para compuestos relacionados [Cuéllar et al., 1996; Giner-Larza et al., 2000a; Giner-Larza et al., 2002].

La principal diferencia estructural entre los compuestos **SM-1** y **SM-2** es la estereoisomería del C-20 y el grado de oxidación del C-3. Mientras que la presencia de un carbonilo o hidroxilo en C-3 no parece tener relevancia, la estereoisomería en C-20 podría tener una mayor influencia en la actividad de los triterpenos, pudiendo producir diferentes respuestas farmacológicas, como por ejemplo la capacidad para inhibir la actividad PLA₂ *in vivo* [Cuéllar et al., 1996; Giner-Larza et al., 2000a; Giner-Larza et al., 2002; Jain et al., 1995]. Ambos compuestos reducen de forma similar la inflamación subcrónica inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón, sin embargo no existen evidencias previas sobre la actividad antiinflamatoria de triterpenos derivados del esqueleto eufano [Giner-Larza et al., 2000c], aunque sí se ha descrito el efecto antiinflamatorio de triterpenos con esqueleto tirucallano y apotirucallano, por lo que es la primera vez que se describe la actividad antiinflamatoria para un compuesto derivado del eufano (**SM-2**).

El tercer compuesto aislado (**SM-3**) es el único compuesto que inhibió el edema agudo inducido por carragenina en pata de ratón, teniendo una marcada actividad a las 3 horas. En este momento, la formación del

edema es principalmente debido a la liberación de metabolitos del ácido araquidónico por el efecto de la COX. La bibliografía recoge diversas referencias sobre la actividad de biflavonas, principalmente ginkgetina y amentoflavona, pero no existen referencias sobre la actividad antiinflamatoria de biflavanonas o de chamaejasmina. En el caso de amentoflavona, se le ha descrito como un inhibidor dual de PLA₂ y COX [Kim et al., 1998a,b], mientras que ginkgetina ha sido estudiado como antiinflamatorio, antiartrítico y analgésico [Kim et al., 1999], como inhibidor de la actividad PLA₂ [Kim et al., 2001], así como su efecto sobre la inducción de TNF- α e iNOS [Baek et al., 1999]. Además, se ha descrito la inhibición de la producción de PGE₂ debida a la reducción de la expresión de COX-2, sin afectar directamente a la actividad COX-1 o COX-2 [Kwak et al., 2002]. Nuestros resultados *in vitro* e *in vivo* están en la línea de los previamente descritos para biflavonas, ya que **SM-2** no solo inhibió el edema inducido por carragenina, sino que redujo la inflamación en oreja de ratón inducida por aplicación repetida de TPA de forma significativa, aunque débilmente (solo un 26%). Además inhibió la producción de LTB₄ en leucocitos polimorfonucleares de rata, con una IC₅₀ de 29,8 μ M.

Como resumen, se puede afirmar que los triterpenos de *Schinus molle* tienen actividad antiinflamatoria, con un efecto similar a los triterpenoides tetracíclicos aislados de otras especies. Un estudio específico con otros isómeros estructurales podría mejorar el conocimiento del mecanismo de acción y la relación estructura química-actividad farmacológica de este grupo de compuestos fitoquímicos como antiinflamatorios e inhibidores de la actividad de PLA₂. Además, la actividad de chamaejasmina, junto con la actividad referida para otros biflavonoides, abre una nueva vía de estudio del efecto y eficacia de estos compuestos como antiinflamatorios,

principalmente como inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico en ambas vías, la COX y la LOX.

V. 2. *LYSIMACHIA FOENUM-GRAECUM*

Cinco nuevos saponósidos se han descrito en la naturaleza, 4 de tipo monodesmosídico y uno bidesmosídico. El análisis espectral de los compuestos ha permitido establecer que todos ellos son derivados de una genina tipo oleanano, concretamente se pueden considerar modificaciones del principio 28-hidroxi-oleanano conocido como eritrodiol. Todos tienen idéntica cadena azucarada en C-3, estando la diferencia fundamental en la presencia y distribución de sustituyentes en los carbonos C-21 y C-22.

La toxicidad selectiva observada entre los 5 saponósidos aislados, puede ser de gran interés para los estudios realizados con extractos y principios de esta especie. El compuesto **LF-5** demostró baja toxicidad frente a leucocitos de rata y humanos, inhibiendo la producción de LTB₄ (metabolito 5-LOX), 12-HETE (metabolito 12-LOX) y HHTrE (metabolito COX). Ambas enzimas están directamente implicadas en el desarrollo y metabolismo de líneas de células cancerígenas y procesos inflamatorios como asma y arthritis [Hong et al., 1999; Avis et al., 2001], lo que abre una vía de estudio de análogos estructurales como citotóxicos o antiinflamatorios, en función del patrón de sustitución y respuesta farmacológica. Estos datos confirman la selectividad de la toxicidad celular de los saponósidos monodesmosídicos frente a los bidesmosídicos.

En diversos estudios previos, nuestro grupo demostró la actividad antiinflamatoria del eritrodiol [Recio et al., 1995a, Máñez et al., 1997;

Huguet et al., 2000], siendo uno de los compuestos con mayor efectividad y potencia dentro del campo de los triterpenos pentacíclicos, por lo que la actividad de los saponósidos de *Lysimachia foenum-graecum* están relacionados con los de la genina una vez liberada tras ser metabolizado el heterósido correspondiente.

V.3. LITHOSPERMUM ERYTHORHIZON

Los extractos metanólico (total), hexánico, diclorometánico y acetatoetílico de *Lithospermum erythrorhizon* inhiben la peroxidación lipídica, pero no actúan de forma relevante como captadores de radical superóxido ni DPPH. En el potencial mecanismo de acción se descarta la capacidad quelante, lo que sugiere un posible efecto antioxidante como *chain-breaking*. En el estudio del contenido en fenoles totales sorprende la presencia de fenoles relativamente alta en el extracto *n*-hexánico, lo que se corresponde con el extraño comportamiento cromatográfico, sobre todo entre los diferentes extractos, ya que todos presentan una gran analogía en su composición química a pesar del protocolo extractivo utilizado.

De todos los subextractos obtenidos, se ha estudiado la actividad antiinflamatoria del diclorometánico, el cual inhibió el edema agudo inducido por TPA en oreja de ratón y el edema agudo inducido por carragenina en pata de ratón, siendo su efectividad mayor a las 3 h del desarrollo del edema. Papageorgiou et al. (1999) describieron el efecto antiinflamatorio de shikonina y algunos de sus derivados frente al edema inducido por carragenina, justificando en parte el efecto antiinflamatorio como consecuencia de la inhibición de la producción de LTB₄ y 5-HETE. Además, shikonina tiene propiedades cicatrizantes y antiulcerosas, y existen diversos estudios en humanos que demuestran su efectividad clínica como cicatrizante. Todo esto demuestran que shikonina y sus

derivados son los principios responsables de la actividad antiinflamatoria, efecto que está ratificado con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, incluyendo sus propiedades antioxidantes.

La toxicidad de shikonina y sus derivados se puede considerar baja, ya que los datos experimentales demuestran que si bien la DL_{50} vía intraperitoneal es de 20 mg/kg, la administración oral da valores > 1000 mg/kg. Shikonina y sus derivados tampoco tienen efectos mutagénicos en el test de Ames [Papageorgiou et al., 1999].

V.4. FORSYTHIA SUSPensa

Forsythia suspensa había sido previamente descrita como antiinflamatoria y antioxidante. El extracto hidroetanólico inhibió los edemas agudos inducidos en oreja de ratón por ácido araquidónico y TPA, la inflamación inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón y la reacción de hipersensibilidad inducida por oxazolona [Cuéllar et al., 1998]. Este mismo extracto inhibió la peroxidación lipídica en microsomas hepáticos de rata inducida por Fe^{2+} -ascorbato y CCl_4 -NADPH, la captación del radical superóxido generado por el sistema hipoxantina/xantina oxidasa y la degradación de desoxiribosa inducida por Fe^{3+} -EDTA [Schinella et al., 2002]. El extracto total se fraccionó con disolventes de polaridad creciente, obteniendo resultados diferentes entre ellos cuando se ensaya la actividad antioxidante y antiinflamatoria. En el primer caso, los extractos polares fueron los activos, mientras que en el segundo caso lo fue el extracto diclorometánico. La actividad antioxidante de los subextractos acetatoetílico y butanólico ha sido determinada y se justifica en función del alto contenido en compuestos fenólicos (lignanós, fenilpropanoides y fenoles simples) [Tang y Eisenbrand, 1992]. Previamente, Ozaki et al.

(1997) habían demostrado que la actividad antiinflamatoria de *Forsythia suspensa* es debida a compuestos no polares. Este hecho es confirmado con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que la actividad se mantiene en la fracción soluble en CH₂Cl₂, de la cual se han aislado los dos compuestos mayoritarios, ácido betulínico y ácido oleanólico. Ambos compuestos han sido previamente descritos como antiinflamatorios por nuestro propio grupo de investigación [Recio et al., 1995a; Máñez et al., 1997; Huguet et al., 2000].

Los efectos farmacológicos del ácido betulínico han sido recientemente revisados, incluyendo sus propiedades antiinflamatorias [Yogeeswari y Sriram, 2005]. Este triterpeno ha demostrado en diversos estudios previos su capacidad para inhibir significativamente los edemas agudos inducidos por carragenina y serotonina en pata de ratón, y por propiolato de etilfenilo (EPP) y TPA en oreja de ratón, además, el efecto antiinflamatorio es modificado por la presencia de cicloheximida y actinomicina D, pero no por progesterona, lo que indica un mecanismo de acción en el cual la síntesis de proteínas está implicada, pero no el receptor glucocorticoide [Recio et al., 1995a]. El ácido betulínico tampoco posee efecto sobre la inflamación subcrónica inducida tras administraciones repetidas de TPA en oreja de ratón, aunque si modificó la infiltración leucocitaria [Máñez et al., 1997]. Posteriormente se observó la inhibición de los edemas agudos inducidos por mezerein, DPT y DPP, pero solo cuando se administran conjuntamente, no cuando hay pretratamiento. También los edemas inducidos por briostatina-1 en oreja de ratón y bradicinina en pata de ratón, y por glucosa oxidasa (GOD) en pata de rata son significativamente reducidos por este triterpeno, sin embargo no actuó sobre los edemas inducidos por ácido araquidónico, resiniferatoxina o xileno. Estos resultados indican que el ácido betulínico es efectivo en los procesos inflamatorios en los cuales

está implicada la enzima PKC, y la producción de radicales libres, pero no aquellos que implican inflamación neurogénica ni metabolismo del ácido araquidónico por la vía lipoxigenasa [Huguet et al., 2000]. Si embargo, un estudio realizado por Tseng y Liu (2005) demostraron que ácido betulínico es capaz de interactuar con diversas PLA₂, como la de páncreas bovino o veneno de *Naja nigrocollis*, lo que implica directamente a este triterpeno con el metabolismo del ácido araquidónico, si bien lo hace a nivel de su liberación mediada por la enzima PLA₂, pero no por el metabolismo LOX.

Takada y Aggarwal (2003) estudian el mecanismo de acción del ácido betulínico como agente supresor de la carcinogénesis inducida por activación del factor de transcripción NF-κB, así como su papel como inmunomodulador y antiinflamatorio, y demuestran que el ácido betulínico suprime la activación del NF-κB inducida por diferentes agentes, como TNF-α, TPA, humo de cigarro, ácido okaídico, IL-1 y H₂O₂, no siendo el efecto específico de ningún tipo de célula. El efecto se produce por la inhibición de NF-κB activado por diferentes receptores de TNF (TNFR), NF-κB cinasa e IκBα cinasa, afectando la producción de proteínas proinflamatorias como COX-2 y metaloproteinasa-9 inducidas por diferentes agentes inductores del proceso inflamatorio, lo que justifica el mecanismo de acción antiinflamatorio del ácido betulínico, por la disminución de mediadores y apoptosis de células proinflamatorias [Takada y Aggarwal, 2003; Eiznhamer y Xu, 2004].

Respecto al efecto antiinflamatorio del ácido oleanólico también ha sido demostrado experimentalmente en diversos trabajos de investigación. Liu (1995 y 2005) ha revisado todos los datos experimentales respecto a la farmacología de este compuesto, incluyendo sus propiedades antiinflamatorias. Entre otros datos recopila los efectos del ácido

oleanólico sobre los edemas inducidos por carragenina y dextrano en pata de rata, y artritis inducida por formaldehído y adyuvante en rata y ratón. El pretratamiento con el triterpeno reduce la permeabilidad vascular inducida por ácido acético e histamina en rata. También ha sido efectivo frente a la reacción de hipersensibilidad retardada inducida por inyección de eritrocitos de cordero (SRBC) o la aplicación tópica de dinitroclorobenceno (DNCB). Respecto a los posibles mecanismos de acción, se publicaron hasta esa fecha diversos trabajos, de cuyas conclusiones se destacan como posibles mecanismos los siguientes: inhibición de la liberación de histamina en mastocitos, inhibición de la actividad lipoxigenasa y ciclooxigenasa, inhibición de la actividad elastasa e inhibición de la vía clásica del complemento, posiblemente a través de la C₃-convertasa.

Más recientemente, Huguet et al. (2000) describieron el efecto sobre los edemas inducidos por TPA, 13-tetradecanoato de 12-desoxiforbol (DPT) y 13-fenilacetato de 12-desoxiforbol (DPP) en oreja de ratón, tanto en pre- como post-tratamiento, efecto que difiere claramente del obtenido cuando ensayaron el ácido betulínico. También el edema inducido por briostatina-1 en oreja de ratón y bradicinina en pata de ratón, y por glucosa oxidasa (GOD) en pata de rata son significativamente reducidos, no siendo activo sobre los edemas inducidos por ácido araquidónico, resiniferatoxina o xileno. Respecto al posible mecanismo de acción, Díaz et al. (2000) hipotetizan la inhibición de producción de PGE₂ y LTC₄ como el responsable del efecto antiinflamatorio, no siendo activo sobre la producción de TXB₂. Sin embargo, la posible causa de esta inhibición no es aportada por estos autores. Dinkova-Kostova et al. (2005) demostraron el potente efecto de varios derivados del ácido oleanólico, incluyendo su 3-oxo derivado o ácido oleanónico, sobre la inducción de iNOS y COX-2 por IFN- γ en macrófagos de ratón, sin

embargo el ácido oleanólico no fue activo, lo cual lleva a la hipótesis de un posible transformación metabólica en el organismo. Esta diferencia farmacológica se manifiesta en otros modelos experimentales de inflamación, como previamente demostraron Giner-Larza et al. (2001) siendo el ácido oleanólico activo frente a la inflamación inducida por aplicación repetida de TPA en oreja de ratón, mientras que el ácido oleanólico fue inactivo. En el edema agudo inducido por PLA₂ ambos compuestos son activos pero con diferente comportamiento en tiempo y efecto. En los estudios *in vitro* se demostró también el diferente comportamiento, siendo el 3-oxo derivado activo como inhibidor de la producción de LTB₄ (actividad 5-LOX) y de HHTrE (actividad COX-1), mientras que ácido oleanólico fue inactivo.

El conjunto de resultados justifica el efecto antiinflamatorio del extracto diclorometánico obtenido de *Forsythia suspensa*, así como la inhibición de la producción de LTB₄ observado en nuestro experimento, en base a la inhibición de la liberación de ácido araquidónico por acción directa del ácido betulínico sobre la enzima PLA₂, mientras que el ácido oleanólico actúa sobre otros mediadores o bien transformándose en el organismo a su derivado 3-oxo activo.

V.5. ISODON XEROPHILUS

No existen otros tipos de estudios con esta especie, aunque el número de artículos publicados sobre citotoxicidad de diterpenos aislados del género *Isodon* o compuestos directamente relacionados es muy amplio. De ellos destaca el de Suzuki et al. (2004) sobre el posible mecanismo de acción de algunos de los compuestos de este grupo estructural (*ent*-kauranos). Así el derivado *ent*-11 α -hidroxi-16-kauran-15-ona inhibe selectivamente la expresión de NF- κ B dependiente de TNF- α . La

administración conjunta de ent-11 α -hidroxi-16-kauren-15-ona con TNF- α incrementa espectacularmente la apoptosis de células leucémicas humanas acompañadas por la activación de caspasas. Lee et al. (2002) trabajando con un análogo estructural (kamebakaurina), han demostrado que actúa directamente sobre la proteína p50, manifestándose mediante el bloqueo de la expresión de genes anti-apoptóticos y mejorando la sensibilidad de las células al efecto pro-apoptótico del TNF- α . Los datos experimentales justifican el futuro estudio de este grupo de diterpenoides como potenciales agentes antiinflamatorios o anticancerosos, a la vez que justifica la aplicación de determinadas plantas con estos principios en patologías que cursan con inflamación.

El rango de actividad y potencia de los compuestos varía de uno a otro, sin que se pueda apreciar una clara relación entre la estructura química y toxicidad o actividad farmacológica. Entre los compuestos más potentes como citotóxicos está el derivado **IX-5**, cuyos valores de CI_{50} varían en un rango de 0,05 a 0,21 μ M frente a diversas líneas tumorales [Hou et al., 2000a]. Este compuesto ha sido también en nuestro caso uno de los derivados con mayor actividad, conjuntamente con el compuesto **IX-2**. El análisis de la posible relación entre la actividad citotóxica y la estructura química no permite observar claras analogías y diferencias, ya que la citotoxicidad varía de una célula a otra, la presencia de grupos funcionales comunes como di-epóxidos, acetilo u otro grupo no se traduce en una relación directa. Sí se puede afirmar que los principios **IX-0**, **IX-6**, **IX-11** e **IX-12** son los menos tóxicos frente a los dos tipos celulares estudiados.

Los datos bibliográficos consultados respecto a la actividad citotóxica indican que la presencia de un grupo 15 oxo, 16 α -metileno es el

principal responsable de los efectos farmacológicos de este grupo estructural al reaccionar cuantitativamente con L-cisteína, formando directamente un aducto como se ha demostrado con oridonina (análogo estructural de **IX-8**). También se ha descrito la posible influencia positiva que ejerce la presencia de radicales hidroxilo en la molécula, favoreciendo la actividad antitumoral. Las posiciones más favorables según los autores son 14 β -hidroxi (favorece la unión) y 7-hidroxi, además la conjunción de C-6 hidroxi y C-15 carboxi favorece también la actividad citotóxica [Tang y Eisenbrad, 1992]. Todos los compuestos aislados de *Isodon xerophilus* poseen los grupos funciones C-6 hidroxi, C-15 ceto, y C-7 hidroxi (excepto **IX-1**), además del 16 α -metileno. La presencia adicional del 14 β -hidroxi en diferentes compuestos daría lugar a un potencial incremento de actividad, efecto que no ha podido ser demostrado con nuestros compuestos.

Al ensayar la actividad sobre la producción de nitritos, se pueden hacer varias consideraciones al estudiar series de compuestos análogos. Por ejemplo, la serie **IX-5-IX-0-IX-4** se caracteriza por la presencia de un agrupamiento di-epoxi común y la diferente sustitución en C-11. La introducción de un hidroxilo claramente decrece el efecto, mientras que su bloqueo mediante acetilación incrementa la actividad de este último (0,25 \rightarrow 70 \rightarrow 0,54 μ M, respectivamente). En la serie **IX-9-IX-6** se aprecia una pérdida de efecto con la oxidación del C-20 (0,65 \rightarrow >10 μ M). La introducción de un hidroxilo en C-1 lleva a una considerable pérdida de potencia, como se puede observar en los compuestos **IX-10** (0,73 μ M) e **IX-8** (7,80 μ M), sin embargo la estereoisomería de este hidroxilo no parece modificar la potencia del diterpeno **IX-3** (C1-OH α) y **IX-15** (C1-OH β) con valores de Cl₅₀ de 2,02 y 2,41 μ M, respectivamente.

También se ha ensayado la actividad frente a la producción de citocinas en macrófagos murinos RAW 264.7, observándose en general que algunos compuestos inhibe la producción de TNF- α a concentraciones de 0,1 μ M, con CI_{50} inferiores a este valor (**IX-0**, **IX-2**, **IX-5**, **IX-9** e **IX-12**), pero otros compuestos inhiben a concentraciones de 10 μ M pero estimulan la producción a concentraciones 0,1 μ M o inferiores (**IX-1**, **IX-3** e **IX-7**). El estudio sobre la producción de IL-1 β se ensayó solo con los compuestos **IX-2**, **IX-3** y **IX-5**, observándose una clara inhibición en los dos primeros casos con valores de CI_{50} inferiores a 50 y 12,5 nM, respectivamente, mientras que en el tercer caso hubo un potente incremento de la producción de IL-1 β .

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

Primera. La especie *Schinus molle* posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. De la fracción activa se han aislado dos triterpenos tetracíclicos, los ácidos 3-*epi*-isomasticadienolálico e isomasticadienonálico, una biflavanona, chamejasmina, siendo activos los tres principios en diferentes protocolos experimentales. Se ha demostrado por vez primera la actividad antiinflamatoria de un triterpeno con estructura tipo eufano. El compuesto se ha identificado como ácido isomasticadienonálico o ácido (13 α ,14 β ,17 α ,20*R*,24*Z*)-3,21-dioxolanostan-8,24-dien-26-oico.

Segunda. Se han aislado cinco nuevos saponósidos a partir de la especie *Lysimachia foenum-graecum*, de los cuales, el compuesto identificado como 3-*O*-{ α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopiranosil(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopiranosil}21,22-*O*-diangeloil barringtogenol C 28-*O*-glucopiranosido, denominado foenumósido E, inhibió la producción de LTB₄ en leucocitos peritoneales de rata y 12-HETE en plaquetas humanas, afectando solo ligeramente la actividad ciclooxigenasa.

Tercera. La fracción diclorometánica de *Lithospermum erythrorhizon* reduce el edema auricular inducido por TPA en oreja de ratón y el edema inducido por carragenina en pata de ratón. Los principios responsables de la actividad antiinflamatoria han sido identificados como los principios naftoquinónicos shikonina y sus derivados. El efecto farmacológico de la especie y del extracto está relacionado con las propiedades antioxidantes de los compuestos.

Cuarta. La fracción diclorometánica de *Forsythia suspensa* posee propiedades antiinflamatorias. Los principios activos se han aislado e identificado como ácido oleanólico y ácido betulínico, cuya actividad había sido previamente demostrada por nuestro grupo de investigación.

Quinta. Trece diterpenoides derivados de la estructura *ent*-kaurano, se han aislado e identificado en las hojas de la especie *Isodon xerophilus*. Todos los derivados presentan los agrupamientos 6 β -hidroxi,16-en,18-ceto, lo que les confiere unas propiedades similares debidas a estos grupos reactivos. En general todos inhiben la liberación de nitritos en macrófagos murinos RAW 264.7.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn BZ, Baik KU, Kweon GR, Lim K, Hwang BD (1995) Acylshikonin analogues: synthesis and inhibition of DNA topoisomerase-I. **J Med Chem** **38**: 1044-1047
- Ammon HP, Mack T, Singh GB, Safayhi H (1991) Inhibition of leukotriene B₄ formation in rat peritoneal neutrophils by an ethanolic extract of the gum resin exudate of *Boswellia serrata*. **Planta Med** **57**: 203-207
- Anónimo (1976) *Schinus molle* oil. **Food Cosm Toxicol** **14**: 861
- Anónimo (1993). **Appendix of Traditional Chinese Medicine Resources of Yunnan**. Sciences Press: Beijing (China).
- Anónimo (2005a). Conabio: *Schinus molle*. Pag. 24-27. Website: URL:http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/3-anaca4m.pdf [consulta: 16 Septiembre 2005].
- Anónimo (2005b). Plants for a future. Database search results. Website: URL:<http://www.raintree-health.co.uk/cgi-bin/getpage.pl?/clinical/ntense2plants.html> [consulta: 29 Septiembre 2005].
- Anónimo (2005c). Plants for a future. Database search results. Website: URL:<http://www.ibiblio.org/pfaf/cgi-bin/arr.html?Forsythia+suspensa&CAN=COMIND> [consulta: 17 Octubre 2005].
- Anónimo (2005d). Plants for a future. Database search results. Website: URL: www.ibiblio.org/pfaf/cgi-bin/arr.html?Lithospermum+erythrorhizon&CAN=LATIND [consulta: 9 Noviembre 2005].
- Arisawa M, Ohmura K, Kobayashi A, Morita N (1989) A cytotoxic constituent of *Lysimachia japonica* Thunb. (Primulaceae) and the structure-activity relationships of related compounds. **Chem Pharm Bull** **37**: 2431-2434

- Arnao M, Cano A, Acosta M (1999) Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion. **Free Rad Res** **31**: S89-S96
- Aruoma O (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Res** **523-524**: 9-20
- Avis I, Hong SH, Martínez A, Moody T, Choi YH, Trepel J, Das R, Jett M, Mulshine JL (2001) Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. **FASEB J** **15**: 2007-2009
- Baek SH, Yun SS, Kwon TK, Kim JR, Chang HW, Kwak JK, Kim JH, Kwu KB (1999) The effects of two new antagonists PLA₂ on TNF, iNOS, and COX-2 expression in activated macrophages. **Shock** **12**: 473-478
- Balsinde J, Balboa MA, Insel PA, Dennis EZ (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A₂. **Ann Rev Pharmacol Toxicol** **39**: 175-189
- Barrachina MD, Bello R, Martínez-Cuesta MA, Primo-Yúfera E, Esplugues J (1997) Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. **Phytother Res** **11**: 317-319
- Barret AJ (1981) Leukocyte elastase. **Method Enzymol** **80**: 581-588
- Bello R, Barrachina MD, Moreno L, Primo-Yúfera E, Esplugues J (1996) Effects on arterial blood pressure of the methanol and dichloromethanol extracts from *Schinus molle* L. in rats. **Phytother Res** **10**: 634-635

- Bello R, Beltrán B, Moreno L, Calatayud S, Primo-Yúfera E, Esplugues J (1998) *In vitro* pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. **Phytother Res** **10**: 634-635
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Anal Biochem** **239**: 70-76
- Bernhard RA, Wrolstad R (1963) "Essential oil of *Schinus molle*. Terpene hydrocarbon fraction". **J Food Sci** **28**: 59-63
- Bernhard RA, Shibamoto T, Yamaguchi K, White E (1983) The volatile constituents of *Schinus molle* L. **J Agr Food Chem** **31**: 463-466
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm-Wiss U – Technol** **28**: 25-30
- Brown D (1995) **Encyclopaedia of Herbs and Their Uses**. Dorling Kindersley: Londres
- Camano R (1996) Method for treating bacterial infections. **United States Patent** 5,512,284: April 30
- Camano R (1997) Essential oil composition with bactericide activity. **United States Patent** 5,635,184: June 3
- Cavin A, Hostettmann K, Dyatmyko W, Potterat O (1998) Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Med.** **64**: 393-396
- Chang HT, Kong WL, Tu PF (2004) Chemical and pharmacological advances of study on *Lysimachia*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.** **29**:295-298 (PMID: 15706860)
- Chen CC, Chen HY, Shiao MS, Lin YL, Kuo YH, Ou JC (1999) Inhibition of low density lipoprotein oxidation by tetrahydrofurofuran lignans

- from *Forsythia suspensa* and *Magnolia coco*. **Planta Med** **65**:709-711
- Chen X, Oppenheim JJ, Howard MZ (2001) Shikonin, a component of anti-inflammatory Chinese herbal medicine, selectively blocks chemokine binding to CC chemokine receptor-1. **Int Immunopharmacol** **1**: 229-236
- Chen X, Yang L, Oppenheim JJ, Howard MZ (2002) Cellular pharmacology studies of shikonin derivatives. **Phytother Res** **16**: 199-209
- Cirino G, Peers SH, Wallace JL, Flowers RJ (1989) A study of phospholipase A₂-induced oedema in rat paw. **Eur J Pharmacol** **166**: 505-510
- Cuéllar MJ, Giner RM, Recio MC, Just MJ, Máñez S, Ríos JL (1996) Two fungal lanostane derivatives as phospholipase A₂ inhibitors. **J Nat Prod** **59**: 977-979
- Cuéllar MJ, Giner RM, Recio MC, Just MJ, Máñez S, Cerdá M, Hostettmann K, Ríos JL (1997) Zanthasaponins A and B, anti-phospholipase A₂ saponins from an anti-inflammatory extract of *Zanha africana* root bark. **J Nat Prod** **60**: 1158-1160
- Cuéllar MJ, Giner RM, Recio MC, Just MJ, Máñez S, Cerdá M, Ríos JL (1998) Screening of anti-inflammatory medicinal plants used in traditional medicine against skin diseases. **Phytother Res** **12**: 18-23
- Cuéllar MJ, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Ríos JL (2001) Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. **Fitoterapia** **72**: 221-229

- Cui DB, Wang SQ, Yan MM (2003) Isolation and structure identification of flavonol glycoside from *Lysimachia christinae* Hance. **Yao Xue Xue Bao** **38**: 196-198 (PMID:12830715)
- Dannhardt D, Lehr M (1992) *In vitro* evaluation of 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibitors using bovine neutrophils and platelets and HPLC. **J Pharm Pharmacol** **44**: 419-424
- De León EJ, Alcaraz MJ, Domínguez JN, Charris J, Terencio MC (2003) 1-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-3-(3(2-chloroquinolinyl))-2-propen-1-one, a chalcone derivative with analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. **Inflamm Res** **52**: 246-257
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM (1989) Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear oedema are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacological agents. **Agents Actions** **26**: 335-341
- Del Valle DM, Schwenker G (1987) Preisocalamenediol, a constituent of *Schinus molle*. **Planta Med** (2): 230
- Diamantoglou S (1981) Carbohydrate content and osmotic conditions of leaves and barks of *Pinus halepensis* Mill. and *Schinus molle* L. during the course of a year. **Z Pflanzenphysiol** **103**:157-164
- Diamantoglou S, Kull U (1981) Fatty-acid composition of barks and leaves of *Pinus halepensis* Mill. and *Schinus molle* L. throughout a year. **Ber Deut Bot Gesellschaft** **93**:449-457
- Dikshit A (1986) *Schinus molle*: a new source of natural fungitoxicant. **Appl Environ Microbiol** **51**: 1085-1088
- Dinkova-Kostova AT, Liby KT, Stephenson KK, Holtzclaw WD, Gao X, Suh N, Williams C, Risingsong R, Honda T, Gribble GW, Sporn MB, Talalay P (2005) Extremely potent triterpenoid inducers of the phase

- 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. **Proc Natl Acad Sci USA** **102**:4584-4589
- Dinis TCP, Madeira VMC, Almeida LM (1994) Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-amino salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. **Arch Biochem Biophys** **351**: 161-169
- Domínguez XA, Carmona JF, Venegas RBD (1971) Mexican medicinal plants. 15. Anacardiaceae lignoceric acid and other compounds of *Schinus molle*. **Phytochemistry** **10**: 1687-1690
- Duke JA (1985) **CRC Handbook of Medicinal Herbs**. CRC Press: Boca Raton, pag. 434
- Eiznhamer DA, Xu ZQ (2004) Betulinic acid: a promising anticancer candidate. **IDrugs** **7**: 359-373
- Fang AP, Zhang YJ, Sun XF (1989) Studies on the chemical composition of *Lysimachia fortunei* Maxim. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi** **14**: 739-741,763 (PMID: 2635601)
- Frölich JC (1997) A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. **Trend Pharm Sci** **18**: 30-34
- Gao D, Kakuma M, Oka S, Sugino K, Sakurai (2000) Reaction of β -alkannina (shikonin) with reactive oxygen species: detection of β -alkannin free radicals. **Bioorg Med Chem** **8**: 2561-2569
- Giner RM, Villalba ML, Recio MC, Máñez S, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL (2000) Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. **Eur J Pharmacol** **389**: 243-252

- Giner-Larza EM, Máñez S, Recio MC, Giner-Pons RM, Cerdá M, Ríos JL (2000a) In vivo studies on the anti-inflammatory activity of pachymic and dehydrotumulosic acids. **Planta Med** **66**: 221-227
- Giner-Larza EM, Máñez S, Giner-Pons RM, Recio MC, Ríos JL (2000b) On the anti-inflammatory and anti-phospholipase A₂ activity of extracts from lanostane-rich species. **J Ethnopharmacol** **73**: 61-69
- Giner-Larza EM, Máñez S, Recio MC, Giner-Pons RM, Ríos JL (2000c) A review on the pharmacology of lanostanes and related tetracyclic triterpenes, en **Research Advances in Phytochemistry** (RM Mohan, ed.), Global Research Net Work, Tivandrum (India), pag. 65-82
- Giner-Larza EM, Máñez S, Recio MC, Giner-Pons RM, Prieto JM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL (2001) Oleanonic acid, a 3-oxotriterpene from *Pistacia*, inhibits leukotriene synthesis and has anti-inflammatory activity. **Eur J Pharmacol** **428**: 137-143
- Giner-Larza EM, Máñez S, Giner-Pons RM, Recio MC, Prieto JM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL (2002) Anti-inflammatory triterpenes from *Pistacia terebinthus* galls. **Planta Med** **68**: 311-315
- Góngora L (2002) Compuestos fenólicos de *Phagnalon rupestre* activos en hipersensibilidad y liberación de mediadores proinflamatorios. Tesis doctoral, Universitat de València
- Glaser K (1995) Regulation of phospholipase A₂ enzymes: selective inhibitors and their pharmacological potential. **Adv Pharmacol** **32**: 31-66
- Gu LZ, Zhang BS, Nan JH (1988) Anti-inflammatory effects of two species of *Lysimachia christinae* Hance and *Desmodium*

- styracifolium* (Osbeck) Merr. **Zhong Yao Tong Bao** **13**: 40-42 (PMID:3197221)
- Gundidza M (1993) Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. *Cent Afr J Med* **39**: 231-234
- Henderson WR (1994) The role of leukotrienes in inflammation. **Ann Intern Med** **2**: 684-697
- Hong SH, Avis I, Vos MD, Martínez A, Treston AM, Mulshine JL (1999) Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. **Cancer Res** **59**: 2223-2228
- Hou AJ, Li ML, Jiang B, Lin ZW, Ji SY, Zhou YP, Sun HD (2000a) New 7,20:14,20-diepoxy *ent*-kauranoids from *Isodon xerophilus*. **J Nat Prod** **63**: 599-601
- Hou AJ, Yang H, Jiang B, Zhao QS, Liu YZ, Lin ZW, Sun HD (2000b) Two new *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon xerophilus*. **Chin Chem Lett** **11**: 795-798
- Hou AJ, Yang H, Liu YZ, Zhao QS, Lin ZW, Sun HD (2001a) Novel *ent*-kaurane diterpenoids from *Isodon xerophilus*. **Chin J Chem** **19**: 365-370
- Hou AJ, Zhao QS, Li ML, Jiang B, Lin ZW, Ji SY, Sun HD, Zhou YP, Lu Y, Zheng QT (2001b) New 7,20-epoxy *ent*-kauranoids from *Isodon xerophilus*. **Phytochemistry** **58**: 179-183
- Hu CM, Cheng YW, Cheng HW, Kang JJ (2004) Impairment of vascular function of rat thoracic aorta in an endothelium-dependent manner by shikonin/alkannin and derivatives isolated from roots of *Macrotomia euchroma*. **Planta Med** **70**: 23-28

- Huguet AI, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Ríos JL (2000) Effect of triterpenoids on the inflammation induced by protein kinase C activators, neutrophilically acting irritants and other agents. **Eur J Pharmacol** **410**: 69-81
- Huxley A (1992) **The New RHS Dictionary of Gardening**. MacMillan Press: Basingstoke Hampshire
- Iizuka T, Nagai M (2005) Vasorelaxant effects of forsythiaside from the fruits of *Forsythia suspensa*. **Yakugaku Zasshi** **125**: 219-24 (PMID: 15684577)
- Jain MK, Yu BZ, Rogers JM, Smith AE, Boger ETA, Ostrander RL, Rheingold AL (1995) Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A₂ from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry** **39**: 537-547
- Jiang H, Huang X, Yang Y, Zhang Q. (1997) Studies on the antilipid peroxidation of nine sorts of Chinese herbal medicines with the function of protecting liver. **Zhong Yao Cai** **20**: 624-626 (PMID: 12572505)
- Just MJ, Recio MC, Giner RM, Cuéllar MJ, Máñez S, Bilia AR, Morelli I, Ghelli S, Ríos JL (1997) Three new lupane saponins from *Bupleurum fruticosum*. **Nat Prod Lett** **9**: 167-175
- Kang DG, Yun CK, Lee HS (2003) Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. **J Ethnopharmacol** **87**: 231-236
- Kim HK, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP (1998a) Amentoflavone, a plant biflavone: a new potential anti-inflammatory agent. **Arch Pharm Res** **21**: 406-410

- Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA (1998b) Effects of naturally occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cylooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. **Prostagl Leukotr Essential Fatty Acids 58**: 17-24.
- Kim HK, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP (1999) Inhibition of rat adjuvant-induced arthritis by ginkgetin, a biflavone from *Ginkgo biloba* leaves. **Planta Med 65**: 465-467.
- Kim HP, Pham HT, Ziboh VA (2001) Flavonoids differentially inhibit guinea pig epidermal cytosolic phospholipase A₂. **Prostagl Leukotr Essential Fatty Acids 65**: 281-286.
- Kobayashi M, Kajiwara A, Takahashi M, Ohizumi Y, Shouji N, Takemoto T (1984) 6-Tridecylresorcylic acid, a novel ATPase inhibitor that blocks the contractile apparatus of skeletal muscle proteins. **J Biol Chem 259** : 15007-15009
- Kohda H, Takeda O, Tanaka S (1989) Molluscicidal triterpenoidal saponin from *Lysimachia sikokiana*. **Chem Pharm Bull 37**: 3304-3305
- Kourounakis A.P., Assimopoulou AN, Papageorgiou VP, Gavalas A, Kourounakis PN (2002) Alkannin and shikonin: effect on free radical processes and on inflammation. A preliminary pharmacochemical investigation. **Arch Pharm (Weinheim) 335**: 262-266
- Kumlin M (1996) Analytical methods for the measurement of leukotrienes and other eicosanoids in biological samples from asthmatic subjects. **J Chromatogr A 725**: 29-40
- Kuo YC, Weng SC, Chou CJ, Chang TT, Tsai WJ (2003) Activation and proliferation signals in primary human T lymphocytes inhibited by

- ergosterol peroxide isolated from *Cordyceps cicadea*. **Br J Pharmacol** **140**: 895-906
- Kwak WJ, Han CK, Son KH, Chang SS, Kang SS, Park BK, Kim HP (2002) Effects of ginkgetin from *Ginkgo biloba* leaves on cyclooxygenases and *in vivo* skin inflammation. **Planta Med** **68**: 316-321
- Kweon KR, Baik KU, Lim K, Hwang BD, Ahn BZ (1993) Inhibitory effects of Lithosperma root and its constituents on DNA topoisomerases I and II. **Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res** **34**: A1954
- Laufer S, Neher K, Bayer B, Homman J, Reutter E, Tries S (1995) In vitro test system for the evaluation of dual cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharm Pharmacol Lett** **4**: 166-169
- Lee JH, Koo TH, Hwang BY, Lee JJ (2002) Kaurane diterpene, kamebakaurin, inhibits NF- κ B by directly targeting the DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of antiapoptotic NF- κ B target genes. **J Biol Chem** **277**: 18411-18420
- Li SH, Niu XM, Peng LY, Zhang HJ, Yao P, Sun HD (2002) *Ent*-kaurane diterpenoids from the leaves of *Isodon xerophilus*. **Planta Med** **68**: 946-948
- Liu J (1995) Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol** **49**: 57-68
- Lirussi D, Li J, Prieto JM, Gennari M, Buschiazzo H, Ríos JL, Zaidenberg A (2004) Inhibition of *Trypanosoma cruzi* by plant extracts used in Chinese medicine. **Fitoterapia** **75**: 718-723
- Lu HT, Jiang Y, Chen F (2004) Preparative high-speed counter-current chromatography for purification of shikonin from the Chinese

- medicinal plant *Lithospermum erythrorizon*. **J Chromatogr A** **1023**: 159-163
- Luczak S, Swiatek L, Daniewski (1989) Phenolic acids in herbs *Lysimachia mummularia* L. and *L. vulgaris* L. **Acta Pol Pharm** **46**:381-385 (PMID:2635807)
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB (1970) The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag: Nueva York.
- Máñez S, Recio MC, Giner RM, Ríos JL (1997) Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. **Eur J Pharmacol** **334**: 103-105
- Markham KR (1982) **Techniques of flavonoids identification**. Academic Press: Londres.
- Méndez J (1970) Myricetin glycosides in *Lysimachia punctata*. **Experientia**. **26**:108-109
- Mezei Z, Kis B, Gecse A, Tajti J, Boda B, Telegdy G, Vecsei L (2000) Platelet arachidonate cascade of migraineurs in the icterictal phase. **Platelets** **11**: 222-225
- Mitchell JA, Warner TD (1999) Cyclooxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **Br J Pharmacol** **128**: 1121-1132
- Mitsuhashi H, Nonaka T, Hamamura I, Kishimoto T, Muratani E, Fujii K (1999) Pharmacological activities of TEI-8362, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. **Br J Pharmacol**. **126**: 1147-1152
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** **65**: 55-63

- Mukherjee AB, Cordella-Miele E, Miele L (1992) Regulation of extracellular phospholipase A₂ activity: implications for inflammatory diseases. **DNA Cell Biol** **11**: 233-243
- Needleman P, Isakson PC (1997) The discovery and function of COX-2. **J Rheumatol** **24** (supl. 49): 6-8
- Neves PCA, Neves MCA, Bella Cruz A, Sant'ana AEG, Yunier RA, Calixto JB (1993) Differential effects of *Mandevilla velutina* compounds on paw oedema induced by phospholipase A₂ and phospholipase C. **Eur J Pharmacol** **243**: 213-219
- Niu XM, Li SH, Na Z, Lin ZW, Sun HD (2004) Two novel ent-abietane diterpenoids from *Isodon xerophilus*. **Helv Chim Acta** **87**: 1951-1957
- Niwa M, Otsuji S, Tatematsu H, Liu GQ, Chen XF, Hirata Y (1986) Stereostructures of two biflavanones from *Stellera chamaejasme* L. **Chem Pharm Bull** **34**: 3249-3251
- Oiseth D, Nordal A (1952) The determination of rutin in *Lysimachia vulgaris* L. **Pharm Acta Helv** **27**: 361-363
- Olafsson K, Jaroszewski JW, Smitt UW, Nyman U (1997) Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus molle*. **Planta Med** **63**: 352-355
- Ozaki Y, Rui J, Tang Y, Satake M (1997) Antiinflammatory effect of *Forsythia suspensa* Vahl and its active fraction. **Biol Pharm Bull** **20**: 861-864
- Ozaki Y, Rui J, Tang YT (2000) Antiinflammatory effect of *Forsythia suspensa* (Vahl) and its active principle. **Biol Pharm Bull** **23**: 365-367

- Pannala AS, Chan TS, O'Biren J, Rice-Evans C (2001) Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. **Biochem Biophys Res Comm** **282**: 1161-1168
- Papageorgiou VP, Assimopoulou AN, Couladouros EA, Hepworth D, Nicolaou KC (1999) The chemistry and biology of alkannin, shikonin and related naphthazarin natural products. **Angew Chem Int Ed** **38**: 270-300
- Payá M, Ferrándiz M, Sanz MJ, Bustos G, Blasco R, Ríos JL, Alcaraz MJ (1993) Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. **Phytother Res** **7**: 159-162
- Pelletier SW, Chokshi HP, Desai HK (1986) Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using vacuum liquid chromatography. **J Nat Prod** **49**: 892-900
- Pozzo-Balbi T, Nobile L, Scapini G, Cini M (1976) Triterpenoid ketoacids from *Schinus molle* L. **Gazz Chim Ital** **106**: 785-789
- Pozzo-Balbi T, Nobile L, Scapini G, Cini M (1978) Triterpenoid acids of *Schinus molle* L. **Phytochemistry** **17**: 2107-2110
- Prieto JM (2001) Efecto de plantas antiinflamatorias en la función leucocitaria y procesos biooxidativos. Tesis doctoral, Universitat de València
- Prieto JM, Recio MC, Giner RM, Manez S, Giner-Larza EM, Rios JL (2003) Influence of traditional Chinese anti-inflammatory medicinal plants on leukocyte and platelet functions. **J Pharm Pharmacol** **55**:1275-1282

- Rahman AU, Tomás MA, Frontera MA (1974) Anthocyanins from *Schinus molle* var *areita* (Aguaribay). **An Asoc Quim Arg 62**: 169-170
- Recio MC, Giner RM, Máñez S, Gueho J, Hostettmann K, Ríos JL (1995a) Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. **Planta Med 61**: 9-12
- Recio MC, Just MJ, Giner RM, Máñez S, Ríos JL, Hostettmann K (1995b) Antiinflammatory activity of saikosaponins from *Heteromorpha trifoliata*. **J Nat Prod 58**: 140-144
- Recio MC, Giner RM, Uriburu L, Máñez S, Cerdá M, De la Fuente JR, Ríos JL, (2000) *In vivo* activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sci 66**: 140-144
- Recio MC, Prieto M, Bonucelli M, Orsi C, Máñez S, Giner RM, Ríos JL (2004) Anti-inflammatory activity of two cucurbitacins isolated from *Cayaponia tayuya* roots. **Planta Med 70**: 414-420
- Resch M, Steigel A, Chen ZL, Bauer R (1998) 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lance*. **J Nat Prod 61**: 347-350
- Ríos JL, Recio MC, Giner RM, Máñez S (2004) Métodos de estudio *in vivo* de extractos y productos antiinflamatorios. En **Nuevas Fuentes de Antioxidantes Naturales** (Rosas A, ed.), CYTED, Caracas, pag. 107-116
- Ruffa MJ, Ferraro G, Wagner ML, Calcagno ML, Campo RH, Cavallaro L (2002) Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **J Ethnopharmacol 79**: 335-339

- Rzadkowska-Bodalska H, Olechnowicz-Stepien W (1975) Flavonoids in the herb of yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* L.). **Pol J Pharmacol Pharm.** **27**: 345-348 (PMID:13046978)
- Safayhi H, Sailer ER, Ammon HP (1995) Mechanism of 5-lipoxygenase inhibition by acetyl-11-keto- β -boswellic acid. **Mol Pharmacol** **47**: 1212-1216
- Safayhi H, Boden SE, Schweizer S, Ammon HP (1997) Concentration-dependent potentiating and inhibitory effects of *Boswellia* on 5-lipoxygenase product formation in stimulated PMNL. **Planta Med** **66**: 110-113
- Safayhi H, Rall B, Sailer ER, Ammon HP (2000) Inhibition of boswellic acids on human leukocyte elastase. **J Pharmacol Exp Ther** **281**: 460-463
- Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG (1996) Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol** **118**: 829-838
- Sanz MJ, Ferrándiz M, Cejudo M, Terencio MC, Gil B, Bustos G, Úbeda A, Gunasegaran R, Alcaraz MJ (1994) Influence of series of natural flavanoids on free radical generating system and oxidative stress. **Xenobiotica** **24**: 689-699
- Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich P, Ríos JL (2002) Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. **Life Sci** **70**: 1023-1033
- Schinella GR, Tournier H, Góngora L, Ríos JL (2004) Determinación de la actividad antioxidantes en sistemas biológicos. En **Nuevas**

Fuentes de Antioxidantes Naturales (Rosas A, ed.), CYTED, Caracas, pag.117-129

Schmourlo G, Mendonça-Filho RR, Alviano CS, Costa SS (2005) Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **J Ethnopharmacol** **96**: 563-568

Singh F, Gao D, Lebwohl MG, Wei H (2003a) Shikonin modulates cell proliferation by inhibiting epidermal factor receptor signalling in human epidermoid carcinoma cells. **Cancer Lett** **200**: 115-121

Singh B, Sharma MK, Meghwal PR, Sahu PM, Singh S (2003b) Anti-inflammatory activity of shikonin derivatives from *Arnebia hispidissima*. **Phytomedicine** **10**: 375-380

Slater TF, McDonald-Gibson RG (1987) Introduction to the eicosanoids. En Prostaglandins and related substances, a practical approach (Benedetto C, McDonald-Gibson RG, Nigam S, Slater TF, eds). IRL Press: Oxford, pag. 1-4

Staniforth V, Wang SY, Shyur LF, Yang NS (2004) Shikonins, phytocompounds from *Lithospermum erythrorhizon*, inhibit the transcriptional activation of human tumor necrosis factor α promoter *in vivo*. **J Biol Chem** **279**: 5877-5885

Stanley PL, Steiner S, Havens M, Tramposch KM (1991) Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol** **4**: 262-271

Steinilber D (1994) 5-Lipoxygenase enzyme expression and regulation of activity. **Pharm Acta Helv** **69**: 3-14

- Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y (1981) Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **J Pharm Dyn 4**: 565-575
- Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y (1983) Studies on the mechanism of anti-inflammatory activities of papyriogenin A and C. **J Pharm Dyn 6**: 287-294
- Suzuki K, Ota H, Sumiki S, Sakatani T, Fujikura T (1983) Assay methods for mieloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Anal Biochem 132**: 345-352
- Suzuki I, Kondoh M, Harada M, Koizumi N, Fujii M, Nagashima F, Asakawa Y, Watanabe Y (2004) An ent-kaurene diterpene enhances apoptosis induced by tumor necrosis factor in human leukemia cells. **Planta Med 70**: 723-727
- Sweeney FJ, Pereira MJ, Eskra JD, Carty TJ (1987) The use of 12-hydroxyheptadecatrienoic acid (HHT) as an HPLC/spectrophotometric marker for cyclooxygenase pathway activity in resident rat peritoneal cells. **Prostag Leukotr Med 26**: 171-177
- Takada Y, Aggarwal BB (2003) Betulinic acid suppresses carcinogen-induced NF- κ B activation trough inhibition of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: abrogation of cyclooxygenase-2 and matrix metalloprotease-9. **J Immunol 171**: 3278-3286
- Tanaka S, Tajima M, Tsukada M, Tabata M (1986) A comparative study of anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin. **J Nat Prod 49**: 466-469
- Tang W, Eisenbrand G (1992) **Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and use in Traditional and Modern Medicine**. Springer-Verlag: Berlin, pag 515-519 y 613-619

- Terhune SJ, Hogg JW, Lawrence BM (1974) Essential oils and their constituents. 15. Beta-spathulene, new sesquiterpene in *Schinus molle*. **Phytochemistry** **13**: 865-866
- Thomas GS (1990) **Perennial Garden Plants**. J. M. Dent & Sons: Londres
- Tian JK, Zou ZM, Xu LZ, Yang SL (2002) Studies on chemical constituents in herba of *Lysimachia davurica*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi** **27**: 283-284 (PMID:12774375)
- Tian JK, Zou ZM, Xu LZ, Zhang HW, Mu HM, Yang SL (2004a) Two new triterpenoid saponins from *Lysimachia davurica*. **Yao Xue Xue Bao** **39**: 194-197 (PMID:15171654)
- Tian JK, Zou ZM, Xu LZ, Xu L, Zhang HW, Mu HM, Xie C, Yang SL. (2004b) Two new triterpenoid saponins from *Lysimachia capillipes* Hemsl. **Yao Xue Xue Bao** **39**: 722-725 (PMID: 15606022)
- Tseng HC, Liu YC (2005) Immobilized betulinic acid column and its interactions with phospholipase A₂ and snake venom proteins. **J Sep Sci** **27**: 1215-1220
- Tuntiwachjuttikul P, Pancharoen O, Mahabusarakam W, Wiriyachitpa P, Taylor W C, Bubb W A, Towers G H N (1997) A triterpenoid saponin from *Maesa Ramentacea*. **Phytochemistry** **44**: 491-495
- Wang WJ, Bai JY, Liu DP, Xue LM, Zhu XY (1994) The anti-inflammatory activity of shikonin and its inhibitory effects on leukotriene B₄ biosynthesis. **Yao Xue Xue Bao** **29**: 161-165 (PMID: 8079645)
- Wang HD, Ge F, Guo YS, Kong LD (2002) Effects of aqueous extract in herba of *Lysimachia christinae* on hyperuricemia in mice. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi** **27**: 939-941, 944 (PMID: 12776538)

- Waterman PG, Roque NF (1994) **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell Scientific Publications: Cambridge (MA, USA) pp. 67-133.
- Werz O, Szellas D, Henseler M, Steinhilber D (1998) Nonredox 5-lipoxygenase inhibitors require glutathione peroxidase for efficient inhibition of 5-lipoxygenase activity. **Mol Pharmacol** **54**: 445-451
- W.H.O. World Health Organization (1989) **Medicinal Plants in China**. W.H.O. Regional Office for the Western Pacific: Manila, pag. 134-135
- Wimalaratne PDC, Slessor KN, Borden JH, Chon LJ, Abate T (1996) Isolation and identification of house fly, *Musca domestica* L., repellents from pepper tree, *Schinus molle* L. **J Chem Ecol** **22**: 49-59
- Wu ZY, Raven PH (1994) **Flora of China. Vol. 17 (Verbenaceae to Solanaceae)**. Science Press & Missouri Botanical Garden
- Wu Z, Wu LJ, Li LH, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2004a) Shikonin regulates HeLa cell death via caspase-3 activation and blockage of DNA synthesis. **J Asian Prod Res** **6**: 155-166 (PMID: 15224412)
- Wu Z, Wu L, Li L, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2004b) p53-Mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by shikonin via a caspase-9-dependent mechanism in human malignant melanoma A375-S2 cells. **J Pharmacol Sci** **94**:166-176
- Xie C, Xu LZ, Zhong Z, Yang SL (2002) Flavonol glycosides from *Lysimachia capillipes*. **J Asian Nat Prod Res** **4**: 17-23 (PMID:11991188)
- Yao CZ, Li F, Liu YL, Zhang ZD, Wang JW, Cai BJ, Liu YY, Cheng JH, Zhao SL (1981) Influence of Chinese herb *Lysimachia christinae*

- Hance on immune responses in mice. I. Immunosuppressive effect. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao** 3: 123-126 (PMID:6458406)
- Yao CZ, Zhang ZD, Liu YL, Cheng JH , Liu YY , Zhao SL (1982) Influence of Chinese herb *Lysimachia hemsleyana* Maxim on immune responses in mice. II. Depletion of lymphoid tissue. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao** 4: 286-289 (PMID:6219763)
- Yogeeswari P, Sriram D (2005) Betulinic acid and its derivatives: a review on their biological properties. **Curr Med Chem** 12: 657-666
- Yoshikawa M, Murakami T, Matsuda H, Yamahara J, Murakami N, Kitagawa I (1996) Bioactive saponins and glycosides. III.¹⁾ Horse chestnut. (1): the structures, inhibitory effects on ethanol absorption, and hypoglycemic activity of escins Ia, Ib, IIa, IIb, and IIIa from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L. **Chem Pharm Bull** 44: 1454-1464
- Yoshikawa M, Murakami T, Yamahara J, Matsuda H (1998) Bioactive saponins and glycosides. XII.¹⁾ Horse chestnut. (2): structures of escins IIIb, IV, V, and VI and isoescins, from the seeds of horse chestnut tree (*Aesculus hippocastanum* L., Hippocastanaceae). **Chem Pharm Bull** 46: 1764-1769
- Young JM, De Young LM (1989) Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. En: **Modern Methods in Pharmacology. Pharmacological Methods in the Control of Inflammation** (Spector S, Back N, eds.), Alan R. Liss: New York, pp. 215-231

- Zhang Z, Zhan Q (1999) Studies on chemical constituents of *Lysimachia pentapetala*. **Zhong Yao Cai**. **22**: 28-29 (PMID: 12575059)
- Zhang L, Meng J, Chen H, Han X (2002a) The effects of *n*-butanol fraction of *Lysimachia hemsleyana* on the activities of lymphocytes in mice. **Zhong Yao Cai** **25**: 888-890 (PMID:12685351)
- Zhang L, Meng J, Chen H, Han X (2002b) The extraction and effects on mouse lymphocyte proliferation of immunoregulation components from *Lysimachia hemsleyana*. **Zhong Yao Cai** **25**:720-722 (PMID: 15562719)
- Zhang GG, Song SJ, Ren J, Xu SX (2002c) A new compound from *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl with antiviral effect on RSV. **J Herb Pharmacother** **2**:35-40 (PMID: 15277088)
- Zhou X, Liang GY, Wang DP, Xu BX (2002) Study on the chemical constituents of the volatile oil from *Lysimachia trientaloides* Hemsl. **Se Pu** **20**: 286-288 (PMID:12541960)