



***UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA***

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS***

***DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS***

---

Trabajo de Tesis de Maestría en Plantas Medicinales

***“Hedyosmum goudotianum Solms y Hedyosmum translucidum  
Cuatrec., especies medicinales nativas del Ecuador: elementos  
botánicos de diagnóstico y actividades farmacológicas”***

---

Tesista: Bióloga Nubia Alejandra Guzmán Salinas

Directora: Prof. Mg. Sc. Marta Colares

Co-directora: Prof. Dra. María Inés Ragone

La Plata – 2020

# Dedicatoria

A las plantas

## **Agradecimientos**

A las personas que conforman la Facultad de Ciencias Exactas, el Departamento de Ciencias Biológicas de dicha unidad académica y la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata. En especial, a quienes me hicieron partícipe de sus conocimientos y experiencias, los docentes del Magíster en Plantas Medicinales.

A mi directora de tesis Mg. Sc. Marta Colares y a mi co-directora Dra. María Inés Ragone por compartir conmigo el interés en el desarrollo de este tema, mil gracias por su conocimiento, paciencia, orientación y ayuda, que sin duda influenciaron en el camino de mi profesión.

A la Dra. Alicia Consolini, directora del Magíster, por permitirme inmiscuir en este amplio e interesante mundo de las plantas medicinales, con el apoyo necesario en el transcurso de esta maestría.

A los investigadores del laboratorio de Morfología Comparada de Espermatofitas (LAMCE) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, y del laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), por ayudarme con las herramientas adecuadas para el desarrollo del trabajo experimental de esta tesis.

A mis colegas y amigos Danilo Minga, Mayra Jiménez, Adolfo Verdugo y Henry Garzón, por ser parte fundamental en mi desarrollo profesional y personal, además de brindarme la información y apoyo necesario para el desarrollo de esta tesis.

De manera especial agradezco a mi familia, aunque limitados por la distancia, sus palabras, energía y ánimos fueron fundamentales para culminar con este objetivo.

A mis amigos y compañeros.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	9
<b>1.1. CONTEXTO ACTUAL DEL PROBLEMA</b> .....	10
<b>1.2. ANTECEDENTES</b> .....	13
<b>1.2.1. Familia Chloranthaceae</b> .....	13
1.2.1.1 Generalidades .....	13
1.2.1.2 Distribución geográfica y ecología.....	14
1.2.1.3 Características morfológicas .....	15
1.2.1.4 Relevancia de los usos.....	16
1.2.1.5 Farmacología y fitoquímica.....	17
<b>1.2.2 Género <i>Hedyosmum</i></b> .....	20
1.2.2.1 Generalidades .....	20
1.2.2.2 Características morfológicas .....	21
1.2.2.3 Relevancia del uso medicinal .....	22
1.2.2.4 Farmacología y fitoquímica.....	24
<b>1.2.3 Antecedentes de las especies en estudio</b> .....	28
<b>1.2.3.1 <i>Hedyosmum goudotianum</i> Solms</b> .....	28
1.2.3.1.1 Nombres comunes .....	28
1.2.3.1.2 Distribución geográfica .....	29
1.2.3.1.3 Descripción morfológica .....	29
1.2.3.1.4 Relevancia del uso medicinal .....	30
1.2.3.1.5 Farmacología y fitoquímica.....	30
<b>1.2.3.2 <i>Hedyosmum translucidum</i> Cuatrec.</b> .....	32
1.2.3.2.1 Nombres comunes .....	32
1.2.3.2.2 Distribución geográfica .....	32
1.2.3.2.3 Descripción morfológica .....	33
1.2.3.2.4 Relevancia del uso medicinal .....	34
1.2.3.2.5 Farmacología y fitoquímica.....	35
<b>1.3 EL USO DE PLANTAS MEDICINALES: RIESGOS Y BENEFICIOS</b> .....	36
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>2.1 Objetivos generales</b> .....	38
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	38

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
<b>3.1 Material vegetal</b> .....	40
3.1.1 Sitio de recolección .....	40
3.1.2 Recolección, tratamiento y almacenamiento del material vegetal .....	41
<b>3.2 Estudios Anatómicos</b> .....	42
<b>3.3 Extracción del material vegetal</b> .....	43
3.3.1 Preparación de los extractos de <i>Hedyosmum goudotianum</i> (Hg) y <i>Hedyosmum translucidum</i> (Ht) .....	43
<b>3.4 Estudio fitoquímico preliminar para la detección de flavonoides de <i>Hedyosmum translucidum</i></b> .....	44
3.4.1. Reacciones de caracterización de flavonoides.....	44
3.4.1.1. Reacción de Shinoda .....	45
3.4.1.2. Reacciones de caracterización en papel.....	45
3.4.2. Análisis cromatográfico de flavonoides por cromatografía en capa delgada .....	46
<b>3.5. Actividades Farmacológicas</b> .....	46
3.5.1. Animales empleados en los estudios de actividad farmacológica.....	46
3.5.2. Estudio de la actividad antiespasmódica .....	47
3.5.2.1. Soluciones y drogas empleadas .....	48
3.5.2.2. Preparado biológico de intestino aislado de rata .....	49
3.5.2.3. Curvas concentración – respuesta (CCR) acumulativas de carbacol .....	50
3.5.2.4. Curvas concentración – respuesta (CCR) acumulativas de calcio .....	50
3.5.3. Estudio de la actividad central.....	51
3.5.3.1. Soluciones y drogas empleadas .....	51
3.5.3.2. Mediciones de la movilidad espontánea en ratones.....	51
3.5.3.2.1. Test de campo abierto en ratones .....	51
3.5.3.3. Evaluación de la actividad ansiolítica .....	53
3.5.3.3.1. Test de supresión de alimento .....	53
3.5.3.3.2. Test de laberinto en cruz elevado.....	54
3.5.3.4. Evaluación de la actividad antidepresiva.....	55
3.5.3.4.1. Test de suspensión de cola .....	55
3.5.3.5. Estudio del efecto anorexígeno.....	56
3.5.4. Tratamiento estadístico de los datos.....	57

<b>4. RESULTADOS</b> .....	59
<b>4.1 Estudios botánicos</b> .....	60
4.1.1 Anatomía foliar de <i>Hedyosmum goudotianum</i> Solms .....	60
4.1.2. Anatomía foliar de <i>Hedyosmum translucidum</i> Cuatrec.....	64
<b>4.2 Estudios fitoquímicos</b> .....	71
4.2.1 Reacciones de caracterización de flavonoides de <i>H. translucidum</i> .....	71
4.2.1.1 Reacción de Shinoda .....	71
4.2.1.2. Reacciones de toque sobre papel .....	71
4.2.2. Análisis cromatográfico de flavonoides por CCD de <i>H. translucidum</i> .....	74
<b>4.3 Estudios farmacológicos</b> .....	75
4.3.1 Efectos antiespasmódicos sobre músculo liso intestinal de los extractos hidroalcohólicos (tintura 20%) de <i>H. goudotianum</i> y <i>H. translucidum</i> .....	75
4.3.1.1 Efectos de <i>H. goudotianum</i> sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de Carbacol.....	75
4.3.1.2 Efectos de <i>H. translucidum</i> sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de Carbacol.....	77
4.3.1.3 Efectos de <i>H. goudotianum</i> sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de Calcio.....	79
4.3.1.4 Efectos de <i>H. translucidum</i> sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de Calcio.....	80
4.3.2 Efectos sobre la actividad central en ratones de los extractos acuosos (infusión 5%) de <i>H. goudotianum</i> y <i>H. translucidum</i> .....	81
4.3.2.1 Efectos sobre la movilidad espontánea y enderezamientos.....	81
4.3.2.1.1 Test de campo abierto.....	81
4.3.2.2 Efectos de las infusiones al 5% p/v de <i>H. goudotianum</i> y <i>H. translucidum</i> sobre la ansiólisis en ratones .....	83
4.3.2.2.1 Test de laberinto en cruz elevado .....	83
4.3.2.2.2 Test de supresión de alimento .....	85
4.3.2.3 Efectos de las infusiones al 5% p/v de <i>H. goudotianum</i> y <i>H. translucidum</i> sobre la actividad anorexígena en ratones.....	87
4.3.2.4 Efectos antidepresivos de las infusiones al 5% p/v de <i>H. goudotianum</i> y <i>H. translucidum</i> .....	89
4.3.2.4.1 Test suspensión de cola .....	89

<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	90
<b>5.1 Estudios anatómicos</b> .....	92
<b>5.2 Estudios fitoquímicos de <i>Hedyosmum translucidum</i></b> .....	97
<b>5.3 Estudios farmacológicos</b> .....	99
5.3.1 Estudio del efecto de la tintura de <i>Hedyosmum goudotianum</i> y <i>Hedyosmum translucidum</i> sobre el músculo liso gastrointestinal. ....	100
5.3.2 Estudio de los efectos de la infusión sobre la conducta de ratones <i>Hedyosmum goudotianum</i> y <i>Hedyosmum translucidum</i> .....	108
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	116
<b>6.1. Estudios anatómicos</b> .....	117
<b>6.2. Estudios farmacológicos</b> .....	118
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	121

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1. CONTEXTO ACTUAL DEL PROBLEMA

En nuestro planeta, existen organismos que son imprescindibles para el desarrollo de la vida: las plantas; las cuales resultan indispensables para la vida del resto de los organismos, incluido el ser humano, sufriendonos de oxígeno, refugio, combustible, alimento y medicina. El reino de las plantas consta de más de 250.000 especies, de las cuales un estimado de 60.000 son utilizadas por sus propiedades medicinales, nutricionales y aromáticas (WHO & CBD, 2015), lo que representa un 24% de todas las especies existentes en el mundo.

La primera evidencia del uso de remedios herbales se remonta hace 60 mil años, en un sitio de entierro en una cueva de Neanderthal (Padua *et al.*, 1999); probablemente el descubrimiento de las propiedades de las plantas utilizadas como medicina, en principio se da a manera de prueba y error, fundamentado en que estos recursos eran la única opción, en ese entonces factible para tratar alguna enfermedad. Desde la fecha los seres humanos hemos aprendido a reconocer y categorizar las plantas de acuerdo a sus usos, conocimiento que empieza a acumularse y transmitirse a través de las generaciones; en la actualidad cerca del 80% de la población mundial utiliza y confía aún en los remedios provenientes de las plantas para procurarse de salud y bienestar (Padulosi *et al.*, 2002).

Si bien, las plantas se encuentran inmersas en la cotidianidad de todos los habitantes, la importancia sobre la aplicación de sus usos es más pronunciada en comunidades rurales. En Ecuador, según indica De la Torre y colaboradores (2008), las causas de los usos estarían ligadas al bajo poder adquisitivo de la mayoría de la población, que no tienen acceso a medicamentos; a la carencia de un sistema oficial de salud; pero principalmente a que el conocimiento médico ancestral es inmenso y con ello la diversidad que posee el país.

En Ecuador, han sido documentadas alrededor de 3.200 especies vegetales con usos medicinales, dentro de las cuales la mayoría son especies nativas (75%), es decir que se originaron o llegaron naturalmente al país; un 5% endémicas, aquellas que solamente habitan en Ecuador; e introducidas un 11%. Para la preparación de los remedios, las plantas se emplean ya sea en su totalidad o alguna de sus partes, generalmente las hojas son las más utilizadas, seguido de flores, cortezas, raíces, frutos y semillas; preparadas en infusión, en maceraciones, emplastos; para aliviar principalmente manifestaciones fácilmente perceptibles, como dolores de estómago, cabeza, resfriados; también para tratar infecciones ya sea por bacterias, virus y hongos; curar heridas y lesiones, así como también tratar desórdenes del sistema nervioso central (De la Torre *et al.*, 2008).

Los efectos que producen el uso de ciertas especies vegetales sobre el cuerpo humano están relacionados con la variedad de compuestos biológicos activos que éstas poseen, comúnmente trabajando en sinergia unos con otros; el impacto puede ser directo, basado en la acción farmacológica, e indirecto relacionado con la posible interacción que se puede presentar con otras especies que se consumen, repercutiendo en repuestas positivas o negativas (Mamedov, 2012).

Dadas las propiedades y la posible toxicidad que pueden presentar las plantas al ser utilizadas con fines medicinales, una equivocación en la forma de su uso o en la identificación de la especie, puede costar la vida de la persona que la consuma, de este hecho radica la importancia que tienen los estudios científicos de avalar su uso y correcta identificación taxonómica, con la responsabilidad que implica la realización de los mismos.

Definitivamente el campo de la investigación en el mundo de las plantas y sus aplicaciones, es uno de los más descuidados, no sólo se puede presenciar una falta de responsabilidad al difundir, comercializar o consumir productos de procedencia vegetal, sino que la información con la que se cuenta es escasa y en muchos casos no está avalada científicamente (Padulosi *et al.*, 2002). Es preciso trabajar sobre un sistema esquematizado cuyas proyecciones abarquen distintas áreas de estudio empezando por la botánica, ecología, etnografía, farmacología, fitoquímica; desarrollar trabajos de investigación que complementen los conocimientos tradicionales que se han generado desde hace miles de años atrás.

La flora útil es un patrimonio que debe protegerse, ayuda a mejorar la situación actual de las comunidades, a establecer criterios para una repartición justa de beneficios, así como determinar indicadores de aprovechamiento sostenible (Ríos *et al.*, 2007). Sin embargo, la extracción de las especies de su ambiente natural junto con la degradación de sus hábitats reduce estas posibilidades. La lenta recuperación de los ecosistemas y regeneración de las poblaciones vegetales en su estado natural, conducen a un camino cercano hacia la pérdida de éstas y junto con esto el saber milenario de los pueblos asociados; por lo cual, es urgente generar una conciencia sobre el cuidado de los ecosistemas, promoviendo el respeto hacia la naturaleza y las prácticas ancestrales de cada región.

Dentro de este contexto se desarrolla el presente trabajo, con el objetivo fundamental de sistematizar información sobre dos especies nativas y utilizadas en Ecuador, pertenecientes a la familia Chloranthaceae: *Hedyosmum goudotianum* Solms y *Hedyosmum translucidum* Cuatrec. Generar información botánica sobre las características macroscópicas y microscópicas de estas especies, representando una herramienta básica para la identificación

taxonómica de las mismas. Profundizar el estudio de la farmacodinamia a nivel de la conducta espontánea, antidepresiva, anorexígena y a nivel del músculo liso gastrointestinal, en la búsqueda de validar el uso etnomedicinal de ambas especies autóctonas del Ecuador.

## **1.2. ANTECEDENTES**

### **1.2.1. Familia Chloranthaceae**

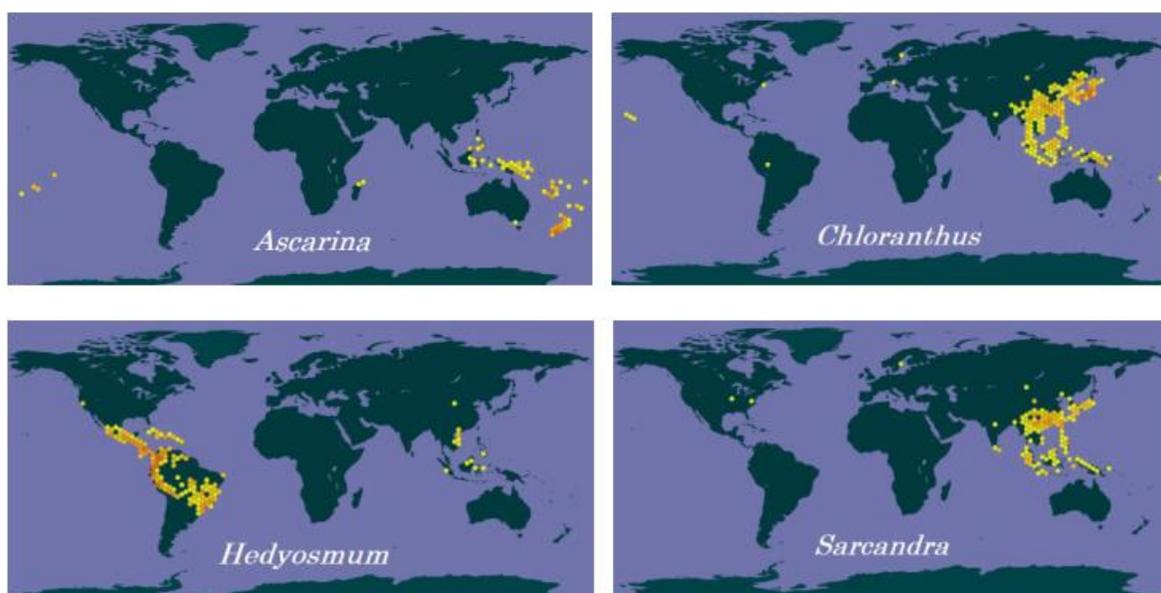
#### **1.2.1.1 Generalidades**

Chloranthaceae es una familia relativamente pequeña, con alrededor de 75 especies pertenecientes a cuatro géneros: *Ascarina* J.R. Forst. & G. Forst., *Sarcandra* Gardner, *Chloranthus* Sw. y *Hedyosmum* Sw. (Kubitzki *et al.*, 1993; Todzia, 1993). Esta familia tiene un rol muy importante en el entendimiento del origen y temprana diversificación de las Angiospermas, la abundancia de muchos de los fósiles encontrados de hojas, flores y polen provenientes del Cretácico inferior, podrían indicar que esta familia fue la antecesora de las primeras angiospermas y que estuvo ampliamente extendida en este periodo con unos pocos taxa presentes a la fecha (Todzia, 1988; Todzia, 1993).

Actualmente, en el sistema de clasificación taxonómica APG IV, la familia Chloranthaceae se encuentra ubicada en una politomía entre los clados Magnoliides y eudicots/monocots/Ceratophyllaceae; no existe el soporte necesario para colocar a esta familia como grupo hermano de las magnoliides como sugieren otros autores, y como se indicaba en el anterior sistema de clasificación APG III (2006), quedando en la actualidad como un linaje independiente (APG IV, 2016; Soltis *et al.*, 2019).

### 1.2.1.2 Distribución geográfica y ecología

Chloranthaceae es una familia con una distribución pantropical, con tres géneros del viejo mundo y uno del nuevo mundo; *Ascarina* consta de alrededor de 12 especies originarias de las Islas del este del Pacífico y Madagascar; *Chloranthus* con 15 especies distribuidas principalmente en Asia Oriental con su centro de máxima diversidad en China; el género *Hedyosmum* con el mayor número de taxa (45 spp.) casi todas originarias de los trópicos de América, distribuidas desde México hasta el sur de Brasil, con una sola especie en Asia; y *Sarcandra* con sólo tres especies presentes en Asia (Todzia, 1993; The plant list, 2013) (Figura 1).



**Figura 1:** Mapa de distribución de los géneros de la familia Chloranthaceae (GBIF, 2020).

Con base en las características de sus flores, dos tipos de polinización, se sabe, que ocurren en las especies de esta familia: anemófila, presumiblemente para el género *Hedyosmum* debido a sus largas inflorescencias estaminadas con abundante polen, larga temporada de floración, relativamente grandes estigmas y flores de color verde; y *Ascarina*

por sus características florales unisexuales, con relativamente largas anteras y estigmas, y flores sin olor. *Chloranthus* y *Sarcandra* debido a sus flores bisexuales, anteras relativamente pequeñas y a veces flores con olor, su polinización es principalmente por insectos y los frutos dispersados por aves (Todzia, 1993).

### **1.2.1.3 Características morfológicas**

Árboles, arbustos o hierbas con hojas simples, opuestas, usualmente glabras y con margen dentado; peciolos connados formando una vaina en la base de la hoja, vaina distintiva a lo largo del tallo, que puede ser muy corta, en el caso de los géneros *Sarcandra*, *Chloranthus* y algunas especies de *Ascarina*, o una vaina muy larga, como en muchas especies de *Hedyosmum*; venación pinnada (Todzia, 1993).

Los dientes, denominados “Chlorantoides”, son una de las características distintivas de esta familia, caracterizados por tener una vena media (secundaria o terciaria) acompañada por dos prominentes, convergentes venas de orden más alto, que entran al ápice del diente o se fusionan con la vena media debajo del ápice (Hickey & Wolfe, 1975). Todzia & Keating (1991) los detallan como más variables, describiendo para esta familia tres distintos tipos:

- Tipo 1: Diente ancho, simétrico, con la vena media usualmente surgiendo de una vena secundaria y situada entre dos venas laterales pequeñas que convergen y terminan en hidátodos.
- Tipo 2: Diente fuertemente, curvado hacia el extremo distal de la hoja, con el ápice orientado al margen distal del sinus (ángulo entrante formado por los segmentos o divisiones en la lámina de una hoja).
- Tipo 3: Diente con un ápice densamente esclerificado.

Flores pequeñas unisexuales o bisexuales en el caso de *Ascarina* y *Hedyosmum*, bisexuales en *Sarcandra* y *Chloranthus*. Frutos una baya con una semilla de cubierta dura, o una drupa frágil con un delgado exocarpo, un carnosos mesocarpo y frágil endocarpo con una especie de arilo creciendo afuera (Todzia, 1993).

#### 1.2.1.4 Relevancia de los usos

La importancia de muchas especies de la familia Chloranthaceae está ligada a los múltiples usos que estas poseen, tanto desde el ámbito medicinal, alimenticio y ambiental (De la Torre *et al.*, 2008). *Sarcandra*, género presente en China, sus semillas asadas se usan como sustituto del sésamo (Fletcher, 2016), se reporta también su uso para la realización de artesanías, con el extracto de la planta junto con una solución viscosa se elabora un hilo natural que puede usarse para la realización de distintas prendas de vestir, además se elaboran productos de aseo personal como pasta dental con acción antibacteriana. *Ascarina* otro género de esta familia, su aceite esencial es muy comercializado en China ya que tiene propiedades calmantes y lo usan con propósitos shamánicos y esotéricos (Figura 2).



**Figura 2:** Productos comercializados, derivados de especies de la familia Chloranthaceae.

Del género *Hedyosmum*, debido a la buena calidad de su madera, muy fuerte y resistente al agua, el tallo se utiliza como material para la construcción de viviendas y postes, así como combustible en la fabricación de carbón; su uso alimenticio es el más frecuente, en todas las regiones en donde las especies de éste género habitan, la infusión de sus hojas se reporta como una bebida aromática muy consumida por los pobladores siendo un sustituto del té o café (Ames, 1949; De la Torre *et al.*, 2008; Kirchner *et al.*, 2010; IUCN, 2019), con las hojas de *H. brasiliense* se elabora un trago a base de agua ardiente y otras hierbas. Los frutos sirven de alimento para muchas especies de aves, además de sembrarse para formar cercas vivas, cumpliendo también una función ecológica.

En cuanto a los usos medicinales de las especies de esta familia, la droga vegetal la conforman principalmente las hojas o en algunos casos la resina, que en países como Perú es colectada para la preparación de cataplasmas reconfortantes (Macbride, 1937); las hojas son usadas principalmente por sus propiedades antiespasmódicas, antisépticas, anticancerígenas, como sedantes, ansiolíticas, para aliviar el dolor y eliminar los forúnculos (Cong-Mei *et al.*, 2008). Las especies *Hedyosmum brasiliense* y *Sarcandra glabra* son las más investigadas, esta última con un total de 44 patentes relacionadas con drogas desarrolladas para curas anticancerígenas y antitumorales (Martínez *et al.*, 2019).

#### **1.2.1.5 Farmacología y fitoquímica**

De las de alrededor de 70 especies representantes de la familia Chloranthaceae, se han estudiado los constituyentes químicos de 21 especies (Zhang *et al.*, 2016), siendo *Sarcandra glabra* la más estudiada, con alrededor de 100 compuestos aislados durante el

periodo 2005 - 2015. Dentro de las principales clases de compuestos encontrados se reportan: terpenos, flavonoides, cumarinas, lignanos, ácidos orgánicos, amidas y esteroides (Todzia, 1993; Cong-Mei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016). La presencia de una serie exclusiva de lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanolide enlace 1,3 es la característica más conspicua de Chloranthaceae (Todzia, 1993), al igual que lindenanolides sesquiterpénicos y sus derivados que son reconocidos como las características taxonómicas símbolo de esta familia y podrían ser utilizados como marcadores quimiotaxonómicos (Kawabata & Mizutani, 1988; Cong-Mei *et al.*, 2008).

Dentro del grupo de los terpenos, los sesquiterpenos y sus derivados son considerados los principales constituyentes de muchas especies de la familia Chloranthaceae (reportados alrededor de 67), los esqueletos más frecuentes de sesquiterpenos encontrados son: eudesmano, germacrano, cadinano, acorano, lindenano, guainano (Cong-Mei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016). Eudesmanos son los encontrados en los géneros *Chloranthus* y *Sarcandra* reportándose un total de 94; a pesar de que la distribución natural de los lindenanos es limitada, se ha encontrado que las plantas de esta familia son inusualmente ricas en estos compuestos y sus derivados (total de 41 compuestos reportados hasta el 2016) principalmente los llamados shizukanolides y chloranthalactonas presentes en *Chloranthus*; la familia de los guaianolides son los principales metabolitos secundarios para los géneros *Chloranthus* y *Hedyosmum*; germacranos con un total de 16 compuestos, cadinanos (10 compuestos), eremophilanos, aromadendranos, elemanos y acoranos, son otros de los constituyentes encontrados en menor cantidad en la familia (Cong-Mei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016). Dos nuevos tipos de Kauranes diterpenoides se encontraron en el género

*Chloranthus* siendo el único reporte de estos compuestos, sessilifol representa el primer ejemplo de compuesto que ocurre naturalmente (Zhang *et al.*, 2016).

Se han reportado alrededor de 47 compuestos flavonoides, considerados muchos de ellos como compuestos bioactivos, entre estos se encuentran chalconas, flavanonas, antocianidinas, flavonoles o glicósidos de flavonoles incluyendo kaempferol, vitexina, isovitexina, orientin, quercetina. Además, se reportan alrededor de 40 cumarinas y sus derivados, aisladas principalmente del género *Chloranthus* (por ejemplo: fraxidin, isofraxidin, isocopoletin, chloracumarina). De *Chloranthus* y *Sarcandra*, también se han aislado algunos lignanos, ácidos orgánicos y esteroides (Cong-Mei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016).

Estudios demuestran que los extractos de la familia Chloranthaceae son altamente activos. Varios autores han probado las propiedades antitumorales de diferentes compuestos de especies, el aceite esencial de *S. glabra*, el extracto crudo de *Chloranthus japonicus*, los compuestos aislados como shizukaols B, C, D, sesquiterpenos, y el extracto etanólico de *C. henryi*, los cuales han mostrado una marcada citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales humanas, inhibiendo la supervivencia de células tumorales, disminuyendo el volumen del tumor, aumentando la vida de los animales de experimentación con fases avanzadas del tumor (Cong-Mei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016).

Otras de las propiedades ampliamente evaluadas han sido la actividad antibacterial y antifúngica principalmente del aceite esencial de algunas especies, resultando positiva contra hongos como: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *Aspergillus sp.*, y bacterias como: *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Zhang *et al.*, 2016).

También han determinado la actividad hepatoprotectora, señalando como el primer reporte de hepatoprotección de compuestos derivados del género *Sarcandra* (Yuan *et al.*, 2006). Los flavonoides extraídos de *S. glabra* promueven el índice de inmunidad concluyendo en su actividad inmunoestimulante con efectos similares al Ginseng (*Panax ginseng*). Se han demostrado también propiedades antiinflamatorias y antiulcerosas del extracto de *S. glabra*, *C. japonicus* y *H. bonplandianum*, con compuestos que podrían reparar las células y promover la reparación de la mucosa gástrica (Cong-Mei *et al.*, 2008).

## **1.2.2 Género *Hedyosmum***

### **1.2.2.1 Generalidades**

El nombre *Hedyosmum* proviene del latín *hedy* que significa agradable y *osmum*, olor o fragancia; refiriéndose al olor similar al limón y anís que emanan todas las partes de la planta de los individuos de este género, característica muy notable en el campo al estrujar o romper alguno de los órganos. Fósiles precursores de *Hedyosmum*, correspondientes al cretácico inferior fueron encontrados en el lado oriental de Norte América y Australia, por lo que Raven & Axelrod (1974) y Todzia (1988), sugieren que el género *Hedyosmum* pudo haberse diferenciado en Laurasia y extenderse a América del Norte y luego América del Sur, tal vez en el tiempo del Neógeno tardío.

Éste género consta de alrededor de 45 especies entre árboles y arbustos, con su centro de diversidad principalmente en bosques de los Andes del norte de Sudamérica, lugar en donde fue descrito por primera vez en el año de 1.778 por Hipólito Ruiz López y José Pavón,

inicialmente con el nombre del género *Tafalla*, desde entonces pocas especies nuevas fueron descritas, hasta inicios del siglo IX en donde redefinen al género como *Hedyosmum* y trabajan con la descripción de nuevas especies, que hasta ese entonces sólo se habían descubierto alrededor de 20 taxones (Todzia, 1988).

El hábitat de dominancia de muchas de las especies de *Hedyosmum* ocurre entre los 600 y 3.000 m s. m. en bosques montanos, bosques húmedos montanos, bosques de estribaciones. Todzia (1988) describe que estas especies tienen tolerancias específicas a la elevación, la mayoría con una distribución estratificada a lo largo de la altitud, factor considerado como uno de los principales mecanismos de aislamiento de estas especies. Por ejemplo, en la misma cordillera se puede observar un reemplazo altitudinal sucesivo de algunos taxones, así como también, un amplio rango de distribución a lo largo de la gradiente de elevación, para otras especies dentro de la misma zona.

En cuanto a su fenología, se describe poca periodicidad en su estado de floración y fructificación, individuos con flores pistiladas son encontrados más frecuentemente que individuos con flores estaminadas y tipo de polinización anemófila. Sus frutos son dispersados principalmente por aves y pequeños roedores (Todzia, 1988; 1993).

#### **1.2.2.2 Características morfológicas**

Arbustos o árboles de hasta 30 m de alto, pocas especies son arbustos trepadores y existe sólo una especie de hábito herbáceo (*Hedyosmum orientale*). Plantas monoicas o dioicas. Corteza suave, de color gris a marrón, madera usualmente blanca tornándose de color naranja a rosado cuando se expone al aire. A menudo presenta raíces de apoyo. Los tallos

exudan un mucílago de color marrón o transparente cuando se cortan. Hojas simples, opuestas, con margen dentado de textura carnosa o coriácea; los márgenes del peciolo de las hojas se expanden y fusionan formando una vaina tubular; estípulas presentes en cada lado de las vainas peciolares. Tricomas presentes en algunas especies, pero la mayoría son glabras (Macbride, 1937; Todzia, 1988; 1990; 1993). Venación semicraspedódroma de acuerdo a la clasificación de Hickey (1974); las venas secundarias son una característica taxonómica importante al igual que la densidad y forma de los dientes de los márgenes, el tipo de vaina peciolar y el indumento (Todzia, 1988). Plantas dioicas con inflorescencias estaminadas axilares o terminales, compuestas de una espiga solitaria o varias espigas subtendidas por un par de brácteas, flores compuestas de un solitario estambre desnudo. Inflorescencias pistiladas axilares o terminales, uni o plurifloras, flores con ovario elipsoidal o trígono, perianto adnado al ovario subtendido por una bráctea floral. Fruto una drupa (Macbride, 1937; Todzia, 1988; 1990; 1993).

### **1.2.2.3 Relevancia del uso medicinal**

Entre sus usos medicinales, en que la droga vegetal la constituyen principalmente sus hojas, en Ecuador las especies *H. cuatrecazanum* y *H. luteynii* preparadas a manera de infusión se utilizan para tratar afecciones de los riñones; *H. scabrum*, *H. sprucei* y *H. goudotianum*, para el dolor estomacal y la diarrea (Jorensen *et al.*, 1999; De la Torre *et al.*, 2008; Guerrini *et al.*, 2016). Esta última especie además es utilizada para tratar dolores de cabeza; el brote remojado de *H. sprucei* en agua caliente con comino se utiliza por sus propiedades antiespasmódicas; las hojas de *H. translucidum* junto con la decocción de la flor de begonia y toronjil se usan para tratar los nervios; *H. racemosum* con *Bixa orellana*

(achiote) se usa para reducir hinchazones y junto con *Cordia nodosa* para tratar mordeduras de serpientes (De la Torre *et al.*, 2008).

En Brasil *H. brasilense* se reporta su uso como sedante, para el tratamiento de migrañas, enfermedades del ovario, como diurético, tónico y afrodisíaco (Kirchner *et al.*, 2010); además con las hojas frescas infusionadas en vino blanco se prepara un tónico con efectos afrodisíacos (Reitz, 1965); la corteza de *H. bonplandianum* se emplea en el tratamiento de fiebres malignas y contra algunos dolores de los miembros (Montserrat, 1883).

En México la infrutescencia madura de *H. mexicanum* es consumida por los pobladores ya que tiene un sabor dulce y es de consistencia suave (Fonseca, 2005); el fruto cuando está seco se pulveriza y se usa en inhalaciones para aliviar episodios de estornudos; la decocción de sus hojas se emplea para tratar desordenes estomacales (IUCN, 2019).

En Perú las hojas de *H. lechleri* y *H. racemosum* se maceran en alcohol y son empleadas como un remedio para el reumatismo (Macbride, 1937); la resina se aplica en la frente para aliviar dolores de la cabeza (Quattrocchi, 2012); *H. luteynii* se usa para tratar dolores abdominales, como diurético, afrodisíaco, antiséptico, para las neuralgias y el reumatismo (Gupta, 2006).

En Colombia *Hedyosmum toxicum*, es la única especie reportada como tóxica, por lo que no se recomienda tomarlo en bebidas ya que puede actuar como un violento emético y las personas pueden sufrir fuertes intoxicaciones; *H. translucidum* está descrito como un importante tónico estimulante, su efecto se nota inmediatamente después de tomar una decocción muy caliente de sus hojas; también preparan una bebida aromática usada como estimulante (Ames, 1949).

#### 1.2.2.4 Farmacología y fitoquímica

De las 45 especies del género *Hedyosmum*, sólo de seis especies se han realizado estudios descriptivos de sus constituyentes químicos y de sus propiedades farmacológicas. Entre los principales constituyentes de las especies de este género, se encuentran sesquiterpenos y sesterterpenos, principales focos de atención para estudios concernientes a probar sus actividades biológicas; también se reportan derivados del ácido hidroxicinámico, flavonoides como kaempferol (más común), neolignanós (los reportes de estos compuestos son muy raros, lo que los convierte en un tema interesante para futuras investigaciones), aldehídos fenólicos, aldehído protocatéquico, cumarinas (escopoletina). Muchos estudios se han enfocado en determinar la composición del aceite esencial extraído de diferentes órganos de la planta de algunas de estas especies; los terpenos incluyendo sesquiterpenos y monoterpenos son los principales constituyentes, siendo  $\beta$ -pineno y sabineno los más comunes, seguido de germacrano, isoprenoid pinocarvane (Radice *et al.*, 2019).

##### *Hedyosmum angustifolium*

Cinco compuestos sesquiterpénicos son extraídos del extracto etanólico de la corteza del tallo de esta especie: oxynoseriolide, hedyosmone, onoseriolide, chloranthalactone A y spathulenol, de cada compuesto evaluaron la actividad leishmanicida con resultados positivos para el compuesto onoseriolide evaluada en amastigotes axénicos, las propiedades citotóxicas también fueron analizadas, resultando una fuerte toxicidad del compuesto oxynoseriolide en células VERO (células renales de mono) (Acebey *et al.*, 2010).

### *Hedyosmum arborescens*

Una nueva lactona sesquiterpénica es extraída de las partes aéreas de la especie 7 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-1 $\alpha$ (H),5 $\alpha$ (H)-guaia-3,11(13)-dien-8 $\alpha$ ,12-olide, además de dos nuevos compuestos identificados: spathulenol y sitosterol (Bercion *et al.*, 2005).

### *Hedyosmum brasiliense*

Estudios farmacológicos han evaluado los efectos sedantes, hipnóticos, ansiolíticos y antidepresivos del extracto etanólico de esta especie, obteniendo efectos significativos a dosis de 20 y 100 mg/kg administrados vía i.p. en ratones analizados mediante pruebas de comportamiento tales como: test de campo abierto, test de laberinto en cruz; los resultados de estos experimentos mostraron efectos similares al diazepam, una benzodiazepina de síntesis, lo que sugiere la participación del sistema gabaérgico en los efectos encontrados (Tolardo *et al.*, 2010). Por otra parte, mostró efecto antidepresivo del extracto etanólico y el compuesto aislado podoandín (lactona sesquiterpénica) a partir de *H. brasiliense*. Además, se comprobó que el sistema dopaminérgico es el que estaría involucrado en esta acción, mediante los receptores D1 y D2. Estudios *in vivo* realizados en ratones mostraron también un efecto similar a la fluoxetina indicando una posible acción de los extractos en los receptores de serotonina (Goncalves *et al.*, 2012).

Amoah y colaboradores (2015<sub>b</sub>), describieron, en ratones, efectos nootrópicos sobre el sistema nervioso causados por compuestos aislados de las partes aéreas de *H. brasiliense*, lactonas sesquiterpénicas y sesquiterpeno alcohol aromadendrane-4 $\beta$ ,10 $\alpha$ -diol. Estos compuestos inhiben los déficits cognitivos inducidos por el péptido A $\beta$ 1-42, pudiendo ser esta sustancia un potencial fármaco para la terapia de la enfermedad del Alzheimer,

pareciendo tener un efecto sobre el estrés oxidativo ayudando a mejorar la memoria (Amoah *et al.*, 2015a).

La composición del aceite esencial de *H. brasiliense* está conformada por 70 compuestos de los cuales el 90% son terpenos: 20 monoterpenos oxigenados, 19 sesquiterpenos oxigenados, 13 sesquiterpenos no oxigenados y 11 monoterpenos no oxigenados. El compuesto más abundante es un monoterpeno de alcohol  $\alpha$ -terpineol, seguido de un sesquiterpeno curzereno, cetonas monoterpénicas pinocarvone y  $\beta$ -thujeno. Se determinaron resultados positivos para la actividad antibacteriana actuando sobre bacterias gram positivas (*S. aureus*, *S. saprophyticus* y *B. subtilis*) y propiedades antifúngicas contra hongos patógenos de humanos (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*) actividades relacionadas con la acción de uno de sus mayores componentes  $\alpha$ -terpineol (Kirchner *et al.*, 2010).

Sagoe en, 2015, aísla del extracto de diclorometano el compuesto aromadendrano-4 $\beta$ ,10 $\alpha$ -diol; de la fracción de acetato de etilo los compuestos: ácido rosmarínico, rosmarinato de etilo, kaempferol, oresbiusina A, ácido vanílico y aldehído protocatéquico; de la fracción acuosa: kaempferol-3 $\beta$ -o-glucuronideo, ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico y escopoletina. Amoah y colaboradores (2015a), encuentran en la infusión de las hojas de *H. brasiliense* un total de nueve compuestos, siendo el ácido rosmarínico el mayor componente. Estos autores consideran que, esta especie podría ser un recurso de este ácido para la aplicación en alimentos y cosmética debido al alto rendimiento de este compuesto; otros compuestos encontrados fueron ácido isorínico, kaempferol, neolignan, lactonas sesquiterpénicas como podoandín y onoseriolidos e identifican un nuevo compuesto derivado del esqueleto eudesmano (1- $\alpha$ -acetoxyeudesma-3,7(11)-dien-8,12-olide); la investigación la realizaron con

la infusión de las hojas de individuos femeninos y masculinos de esta especie, estableciendo que presentan el mismo perfil de metabolitos extraídos. Trentin y colaboradores (1999) estudian las propiedades anticonceptivas del extracto hidroalcohólico de los tallos y hojas, resultando un efecto significativo atribuido a la lactona sesquiterpenica 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide, actuando rápidamente a los 30 minutos de administrado el extracto por vía intraperitoneal.

#### *Hedyosmum bonplandianum*

De las hojas de esta especie se aislaron dos tipos de flavonoides glicosilados: 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1-6)- $\beta$ -D-glucopyranoside] y kaempferol 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranoside]; se probó la actividad analgésica tanto para el extracto de n-butanol como para los flavonoides aislados con resultados significativos sobre la actividad analgésica probada en ratones, a dosis de 100mg/kg para el extracto y 80mg/kg de flavonoides aislados (Cárdenas *et al.*, 1992).

#### *Hedyosmum orientale*

Del extracto etanólico de las partes aéreas de esta especie se describen cinco nuevos sesquiterpenos de tipo guaiane: hedyosumins A, B, C, D, E.; así como cinco compuestos ya conocidos: 10 $\alpha$ -hydroxy-1,5 $\alpha$ H-guaia-3,7(11)-dien-8 $\alpha$ ,12-olide, 9 $\alpha$ -hydroxyasterolide, spathulenol, 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide y aromadendrane-4 $\beta$ ,10 $\beta$ -diol. La actividad citotóxica fue analizada resultando una moderada actividad del compuesto 9 $\alpha$ -hydroxyasterolide contra A-549 (adenocarcinoma de pulmón humano) y HL-60 (leucemia humana) (Su *et al.*, 2008).

### *Hedyosmum racemosum*

Ojeda (2016), identifica como principales compuestos para esta especie: escualeno, escopoletina, una mezcla de cicloartenol con ácido linolénico; del extracto metanólico reporta el compuesto llamado bolivianine, describe un potencial efecto hipoglucemiante del extracto desclorofilado.

### *Hedyosmum sprucei*

Se ha estudiado la actividad antibacterial del aceite esencial, con resultados significativos contra bacterias patógenas de humanos gram positivas y negativas (*L. grayi* y *S. aureus*), así como para bacterias de plantas (*Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis* y *Pseudomonas syringae pv. syringae*). El autor determina también una promisorio actividad citotóxica contra MCF-7 (línea celular aislada de cáncer de mama), que exhibe alta sensibilidad, afectada con una interesante inhibición del crecimiento, lo que sugiere un potencial quimiopreventivo de esta especie (Guerrini *et al.*, 2016).

## **1.2.3 Antecedentes de las especies en estudio**

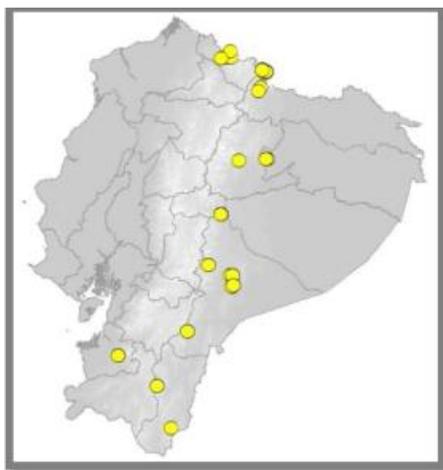
### **1.2.3.1 *Hedyosmum goudotianum* Solms**

#### **1.2.3.1.1 Nombres comunes**

En Costa Rica: «Agüillo». Ecuador: «Guayusa», «Sacha guayusa», «Granicillo», «Granizo de monte», «Tarqui». Colombia: «Granicillo del grande», «Granizo», «Granizo blanco».

### 1.2.3.1.2 Distribución geográfica

Se distribuye por: Costa Rica, Panamá, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú. En Ecuador, crece en bosques nublados desde los 1.500 a 3.500 m s. m. en las provincias del Azuay, Carchi, Imbabura, Loja, Morona Santiago, Napo, Pichincha, Sucumbíos, Zamora Chinchipe (Tropicos, 2020) (Figura 3).



**Figura 3:** Mapa de distribución de *H. goudotianum* en el Ecuador (Coordenadas geográficas obtenidas de GBIF, 2020).

### 1.2.3.1.3 Descripción morfológica

Árboles dioicos de 2 a 10 m de altura, con raíces zancudas en algunos casos (Figura 4a). Corteza externa ligeramente fisurada, de color gris blanquecino; corteza interna color rosa; madera suave de color blanquecino tornándose naranja al oxidarse (Figura 4b). Tallos jóvenes cuadrados volviéndose cilíndricos cuando maduros, color verde o en algunas ocasiones violeta; emiten un exudado de color transparente cuando se cortan (Figura 4g). Hojas simples, opuestas; lámina de 3,5-18,5 x 2-8,4 cm, elíptica a ovada, aguda a acuminada, base cuneada (Figura 4c, d), serrulada con dientes de 1-3 mm de distancia (Figura 4e),

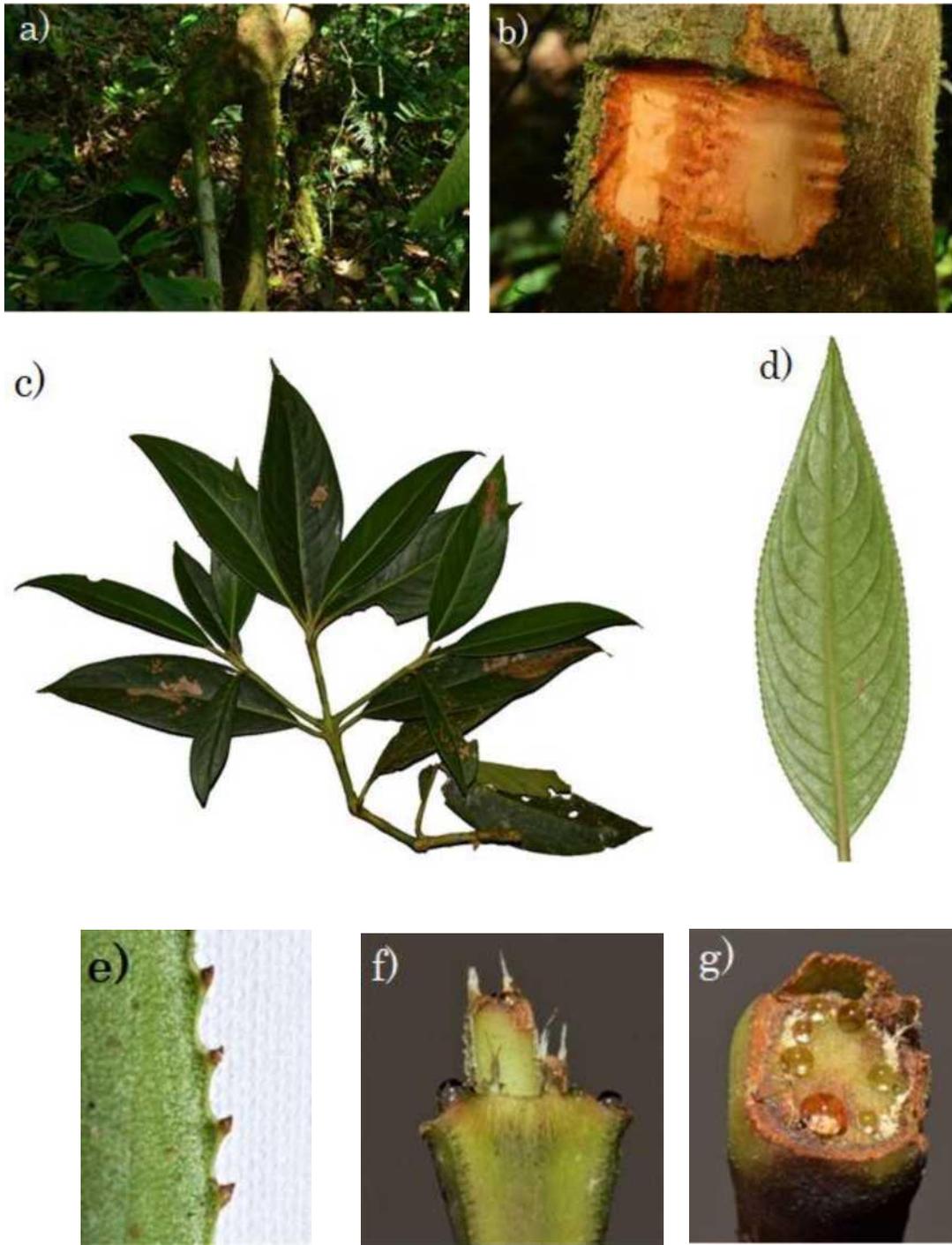
subcoriácea a coriácea. Tricomas cuando presentes, restringidos al envés de las venas primarias, secundarias y a veces las terciarias, el tipo de indumento es constante pero su densidad varía de glabro a densamente pubescente; vainas peciolares lisas a ásperas, ligeramente infladas con dos fimbriados a ligeramente fimbriados apéndices estipulares de 1-3 mm de longitud (Figura 4f). Venación eucamptódroma, con nervaduras secundarias ligeramente sobresalientes en el envés, con 6 a 12 pares de nervios ascendentes (Figura 4d). Inflorescencias estaminadas terminales o axilares, reunidas en espigas de 1-2,5 cm de largo, color verde amarillento. Inflorescencias femeninas terminales o axilares, en racimo o panículas de 2,5-8,5 cm de largo, color blanco. Frutos blancos, irregularmente globosos (Todzia, 1988; 1990; Todzia & Keating, 1991; Minga *et al.*, 2019). En Ecuador, en los boques de estribaciones orientales florece entre los meses de septiembre a enero (Minga *et al.*, 2019).

#### **1.2.3.1.4 Relevancia del uso medicinal**

La infusión de las hojas se bebe como agua aromática, similar al té o café. Las hojas frescas se preparan en un baño que se aplica para tratar los dolores de cabeza; a manera de infusión se utilizan las hojas por sus propiedades antiespasmódicas (De la Torre *et al.*, 2008).

#### **1.2.3.1.5 Farmacología y fitoquímica**

En el presente trabajo no se ha encontrado, en la bibliografía consultada, estudios científicos que avalen los usos etnobotánicos de esta especie ni de sus constituyentes químicos.



**Figura 4:** *H. goudotianum*, características morfológicas: a) raíces zancudas; b) corteza y madera; c) hojas; d) detalle de la hoja y nervadura; e) margen serrulado; f) vainas peciolares y estípulas; g) exudado emitido por las ramas.

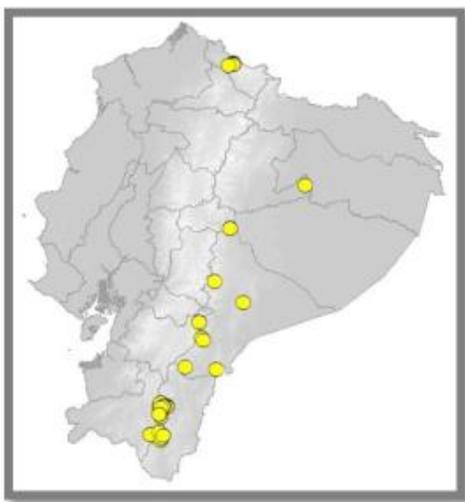
### 1.2.3.2 *Hedyosmum translucidum* Cuatrec.

#### 1.2.3.2.1 Nombres comunes

En Ecuador: «Sachaguayusa», «Guayusa», «Toronjil de cerro». Colombia: «Granizo», «Granicillo», «Granicillo del grande», «Granizo morado», «Aguaquín».

#### 1.2.3.2.2 Distribución geográfica

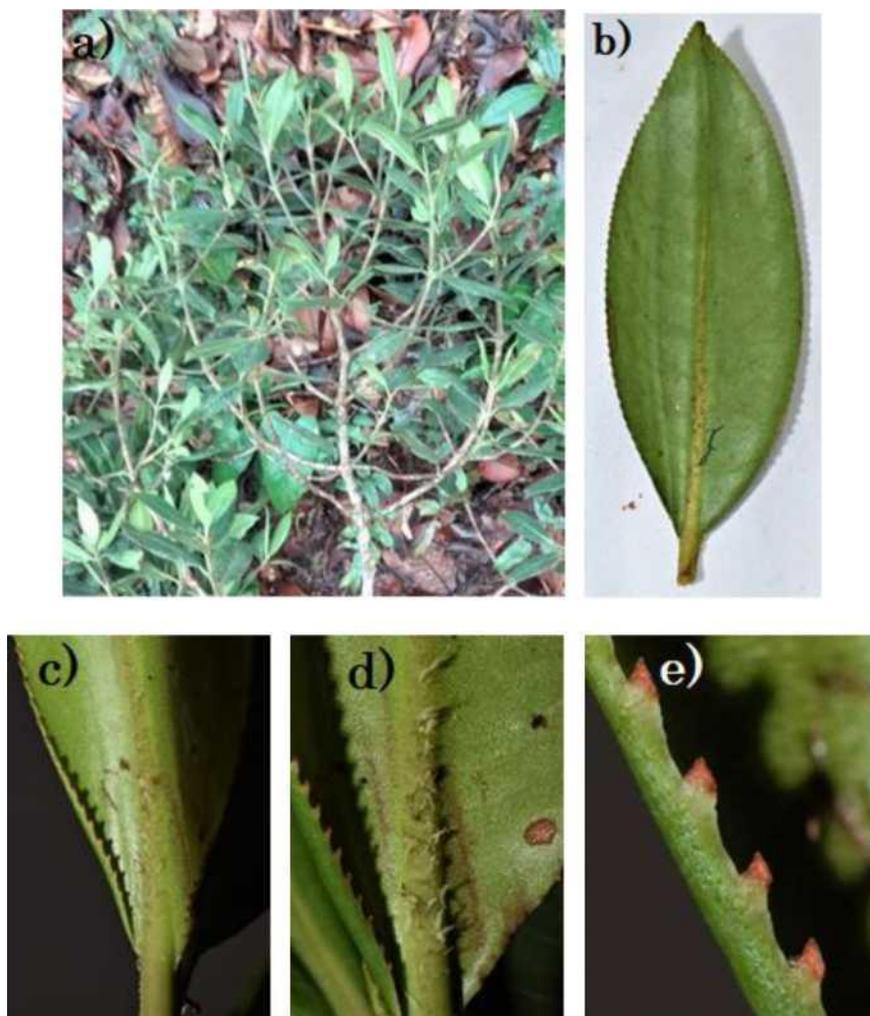
Se distribuye por: Venezuela, Colombia, Ecuador y Norte de Perú. Ocurre en bosques húmedos montanos a lo largo de pendientes pronunciadas. En Ecuador se encuentra registrada en las provincias del Azuay, Carchi, Loja, Morona-Santiago, Zamora-Chinchipe desde los 1.500 a 3.500 m s. m. (Tropicos, 2020) (Figura 5).



**Figura 5:** Mapa de distribución de *H. translucidum* en el Ecuador (Coordenadas geográficas obtenidas de GBIF, 2020).

### 1.2.3.2.3 Descripción morfológica

Árboles dioicos de 1 a 8 m de altura, en algunas ocasiones con raíces zancudas de soporte. Corteza externa de color gris, madera suave de color blanquecino tornándose naranja al oxidarse. Tallos jóvenes cuadrados volviéndose cilíndricos cuando maduros, usualmente de color morado o en algunas ocasiones verde; exudan un mucilago transparente cuando se cortan. Hojas simples, opuestas (Figura 6a); lámina de 5-11 x 2-4,5 cm, estrechamente oblonga a estrechamente elíptica, ápice acuminado, base cuneada ligeramente revoluta (Figura 6c); bruscamente serrulada con dientes de 2,5-4 mm de distancia, en algunos casos el ápice de los dientes es de color rojizo (Figura 6e); textura coriácea, brillante en el haz y pálida en el envés, glabra; vainas peciolares lisas o escamosas, sin apéndices estipulares. Nervadura primaria impresa en el haz y sobresaliendo en el envés, con o sin escamas rametáceas en el extremo proximal (Figura 6d); nervaduras secundarias no visibles. Inflorescencias estaminadas terminales o axilares, con 1 a 3 pares de espigas de 2,2-5,1 cm de longitud, color verde. Inflorescencias femeninas axilares o terminales, en racimos simples o basalmente ramificados 2,5-5 cm de largo, color blanco. Frutos blancos, irregularmente globosos. Especie fácilmente reconocible por sus hojas brillantes en el haz, venas secundarias y terciarias no visibles en el envés (Todzia, 1988; 1990; Todzia & Keating, 1991).



**Figura 6:** *H. translucidum*, características morfológicas: a) hojas; b) detalle de la hoja y nervaduras; c) base ligeramente revoluta; d) escamas rametáceas dispuestas en el envés de la nervadura media; e) dientes con el ápice color rojo.

#### 1.2.3.2.4 Relevancia del uso medicinal

La infusión de las hojas se bebe como agua aromática; junto con otras especies se usa para tratar los nervios (De la Torre *et al.*, 2008); como tónico estimulante y coadyuvante en el trabajo de parto (Ames, 1949); las hojas preparadas en maceración en licores locales se consumen como una bebida tonificante y facilitador del sueño (Zamora & Perdomo, 2016); el extracto alcohólico se usa para el manejo de la agresividad en camadas de cuyes machos (Caycedo *et al.*, 2011).

#### 1.2.3.2.5 Farmacología y fitoquímica

Zamora y Perdomo (2016), realizan un estudio sobre la composición química del aceite esencial de las hojas de *H. translucidum*, obteniendo un rendimiento del aceite de 1.2%, características organolépticas color amarillo claro de olor agradable a eucaliptado. Dentro de la composición química del aceite identifican que un 66% de los compuestos corresponden al grupo de sesquiterpenos oxigenados, seguido de hidrocarburos sesquiterpénicos (26%), hidrocarburos monoterpénicos y monoterpénos oxigenados. El constituyente más abundante es el sesquiterpeno oxigenado  $\beta$ -eudesmol (11.4%), seguido de germacreno D (8.9%), *trans*- $\beta$ -cariofileno (7.8%), elemol (5.8%) y óxido de cariofileno (5.3%), concluyendo que el aceite de esta especie presenta diferencias con respecto a los constituyentes químicos del aceite esencial de otras especies del mismo género (Zamora & Perdomo, 2016).

No existen estudios científicos farmacológicos que avalen sus propiedades medicinales como antiespasmódicas, para tratar los nervios y facilitador el sueño (Ames, 1949; De la Torre *et al.*, 2008; Zamora & Perdomo, 2016).

### 1.3 EL USO DE PLANTAS MEDICINALES: RIESGOS Y BENEFICIOS

La frecuencia de uso de las plantas medicinales como infusión, decocción u otra forma de administración está en aumento, no sólo en toda Latinoamérica sino también en el mundo entero (Capasso *et al.*, 2003). Sin embargo, en bibliografía existen pocos estudios que avalen los usos tradicionales de las plantas medicinales y menos aún reportes de posibles efectos adversos, interacciones o contraindicaciones (Consolini & Ragone, 2010).

En el contexto del uso de las plantas medicinales, donde se desconoce no solo su completa composición sino también su posología adecuada, es de gran valor realizar un screening farmacológico en diversos sistemas biológicos dado que la mayoría de las plantas medicinales que se utilizan son para dolencias que pueden no ser menores como: problemas gastrointestinales, trastornos del sueño, estados de ánimo o problemas respiratorios leves (Alonso & Desmarchelier, 2005; Ragone *et al.*, 2007).

Por lo tanto, es de nuevo interés profundizar en el estudio de los efectos farmacológicos de estas dos especies del género *Hedyosmum* presentes en el Ecuador: *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum*, debido a que es escasa o nula la información bibliográfica que avale o desestime los usos etnomedicinales reportados a nivel de la conducta espontánea, antidepresiva y efectos antiespasmódicos.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 Objetivos generales

Efectuar estudios botánicos de dos especies nativas del Ecuador, *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum*, utilizadas en la medicina tradicional.

Evaluar la actividad antiespasmódica intestinal, antidepresiva, sedante, ansiolítica y anorexígena de los extractos de las dos especies del género *Hedyosmum* mediante el estudio farmacológico en diferentes modelos animales.

## 2.2 Objetivos específicos

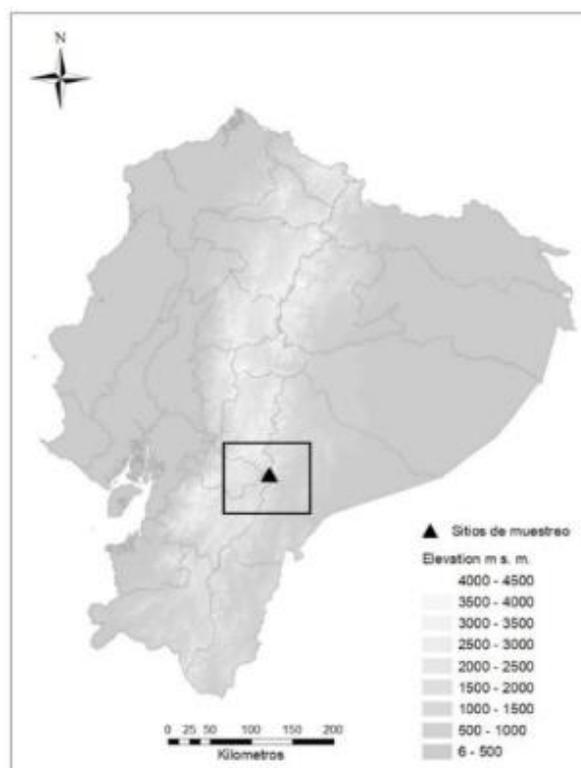
- Realizar estudios anatómicos foliares de las dos especies en estudio, con el fin de caracterizar elementos histológicos de diagnóstico que ayuden a la correcta identificación de las especies y la diferenciación entre las mismas.
- Evaluar los usos en medicina popular como antiespasmódico intestinal de las tinturas de ambas especies de *Hedyosmum*, mediante el uso de curvas concentración-respuesta y estudiar el mecanismo de acción farmacológico.
- Evaluar si la infusión de las hojas de las dos especies en estudio tiene acción a nivel del sistema nervioso central como: sedantes, ansiolíticos y antidepresivos.
- Evaluar el efecto anorexígeno de la infusión de las hojas de ambas especies en estudio.
- Comparar las actividades encontradas de los extractos de ambas especies en los modelos experimentales estudiados.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1 Material vegetal

#### 3.1.1 Sitio de recolección

La recolección del material vegetal se realizó en el mes de febrero del año 2019, en la localidad de San José de Guarumales, perteneciente a la provincia de Morona-Santiago, Ecuador (Figura 7). Aprovechando la orografía del sitio y la continua y marcada variación altitudinal, las especies se colectaron en dos diferentes niveles altitudinales dentro de la misma área y a una distancia relativamente pequeña: *H. translucidum* se colectó a los 2.100 m s. m. y *H. goudotianum* a los 1.500 m s. m. Cada altura se halla dominada por una formación vegetal distinta: bosque de Neblina Montano de los Andes Orientales y bosque Siempre Verde Montano Bajo de los Andes, respectivamente (Sierra, 1999).



**Figura 7:** Mapa del sitio de colección de las dos especies en estudio.

La vegetación nativa representada en estos bosques guarda elementos florísticos muy diversos y estructuralmente complejos, relacionados con las características micro-climáticas de la zona: pendientes pronunciadas, altas precipitaciones (297 mm precipitación promedio anual), temperatura promedio 17°C; suelos ácidos, poco profundos, de textura franco-arcillosa con altos contenidos de N, Al, Cu y Fe (Minga *et al.*, 2019).



**Figura 8:** Sitio de recolección y procesamiento de las especies en estudio. Bosque de Neblina Montano de los Andes Orientales, Morona-Santiago, Ecuador.

### 3.1.2 Recolección, tratamiento y almacenamiento del material vegetal

Para el desarrollo del trabajo realizado en esta tesis se utilizó material fresco, con la ayuda de una podadora aérea se colectaron hojas en completo estado de desarrollo, sobre tres niveles (bajo, medio, alto) del estrato arbóreo de individuos de aprox. 8 m de altura, pertenecientes a las dos especies en estudio: *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum* (Figura 8); los ejemplares fueron herborizados y depositados como material de referencia en el Herbario Azuay (HA) de la ciudad de Cuenca-Ecuador, inscrito en el Index Herbariorum del New York Botanical Garden. El material vegetal fue determinado usando la bibliografía correspondiente por el Curador del Herbario M. Sc. Danilo Minga, (Voucher: Guzmán N° 186 y 187).

Para el estudio anatómico se utilizaron hojas en completo estado de desarrollo, el material fresco se fijó en FAA (solución de formalina: ácido acético glacial: alcohol etílico 50%, 5:5:90) y para los estudios posteriores el material recolectado fue secado en estufa con convección forzada de aire a 40°C y posteriormente molido a polvo grueso, el cual fue almacenado al abrigo de la luz y humedad.

El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Morfología Comparada de Espermatofitas (LAMCE) de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, (UNLP) y en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP).

### **3.2 Estudios Anatómicos**

Para observar y describir las características de las células epidérmicas, estomas, tricomas y ornamentación cuticular de las hojas, se utilizó la técnica de diafanización de Dizeo de Strittmatter (1973), aplicada sobre los segmentos de la parte media y los dos lados de la vena media de la lámina foliar.

Protocolo de diafanización (Dizeo de Strittmatter, 1973):

1. El material previamente fijado en FAA, fue colocado en un vaso de precipitado con alcohol 96° y se llevó a ebullición por 10 minutos.
2. Transcurrido ese tiempo se pasó a una solución preparada en partes iguales, con alcohol 96° y NaOH al 5%. Se llevó a ebullición durante un minuto.
3. Se efectuaron varios lavados hasta que el agua quedó totalmente limpia.
4. El material lavado se pasó a agua destilada y se efectuaron dos cambios.

5. El material se introdujo en una solución de NaClO al 50% y se dejó hasta que se torne transparente.
6. Se pasó a agua destilada y se efectuaron 5 cambios de 3 minutos cada uno.
7. El material se colocó en Hidrato de Cloral (5 g en 100 ml de agua destilada) el tiempo necesario hasta quitarle opacidad.
8. El material transparente fue lavado, coloreado con solución alcohólica de safranina O al 80% y montado con gelatina glicerina.

Para describir las estructuras foliares, se realizaron cortes transversales y longitudinales a mano alzada de la lámina y el peciolo de la hoja, las secciones logradas fueron decoloradas con hipoclorito de sodio al 50% y posteriormente lavadas en agua destilada. Se realizó el montaje de cada corte en gelatina-glicerina o con safranina O en solución alcohólica al 80% con el fin de colorearlas previamente para luego realizar el montaje en gelatina-glicerina.

Los preparados histológicos obtenidos se analizaron utilizando un microscopio óptico Leitz SM Lux equipado con cámara clara y las imágenes se obtuvieron con un microscopio óptico Gemalux equipado con una cámara color PAL CCD.

### **3.3 Extracción del material vegetal**

#### **3.3.1 Preparación de los extractos de *Hedyosmum goudotianum* (Hg) y *Hedyosmum translucidum* (Ht)**

Para la preparación de la tintura madre (Tm) al 20% de *H. goudotianum* (**HgT**) y *H. translucidum* (**HtT**), se pesaron 20 g del material vegetal previamente triturado, se agregó

100 ml de etanol 70° y se dejó en maceración dinámica a temperatura ambiente, en un envase ámbar por un periodo de 48 h. Posteriormente los extractos fueron filtrados. Se obtuvo un rendimiento de 6.4% gr hojas/ml *HgT* y 8% gr hojas/ml tintura *HtT*.

La preparación del extracto acuoso se realizó mediante una infusión (In) al 5% p/v, de las hojas desecadas de *H. goudotianum* (**iHg**) y *H. translucidum* (**iHt**), se pesaron 5 g previamente triturados de la droga vegetal de cada especie. En envase hermético se agregaron 100 ml de agua destilada en ebullición, se dejó en reposo durante 20 minutos, y luego se filtró. Los extractos Tm e Infusión se prepararon según las directrices de la FARMACOPEA Argentina, VII Ed.

### **3.4 Estudio fitoquímico preliminar para la detección de flavonoides de *Hedyosmum translucidum***

#### **3.4.1. Reacciones de caracterización de flavonoides**

Durante el curso de Productos naturales de origen vegetal. II Metabolitos secundarios con acción farmacológica (asignatura obligatoria del plan de estudio de ésta Maestría de Plantas Medicinales), se llevó a cabo el análisis fitoquímico y cromatográfico de flavonoides aplicando la técnica de cromatografía de capa delgada detallada por Wagner & Bladt (1996) en “Plant Drug Analysis”, así como reacciones generales para la detección de estos grupos fitoquímicos (Domínguez, 1973) presentes en los extractos hexánico, acetato de etilo, hidroalcohólico y acuoso.

Los extractos se obtuvieron con extracciones sucesivas líquido-líquido con solventes de polaridad creciente, a partir del concentrado del extracto hidroalcohólico que fue inicialmente preparado con las hojas de *H. translucidum*, utilizando un equipo extractor Soxhlet y la solución solvente Etanol 96° / Agua (80:20).

#### **3.4.1.1. Reacción de Shinoda**

Se colocó en un tubo de ensayo 0.5 ml del extracto hidroalcohólico de *Ht*, se agregaron granallas de Mg y 0.2 ml de HCl, se esperó a que se enfríe y posterior se añadió 0.2 ml de alcohol amílico y 2 ml de agua destilada, se agitó y dejó reposar. Se observó el color de la fase orgánica.

#### **3.4.1.2. Reacciones de caracterización en papel**

Sobre un trozo de papel filtro se marcaron círculos de aproximadamente 0,5 cm de diámetro, en los cuales con ayuda de un capilar se sembraron los extractos, se secó y se agregaron gotas de los siguientes reactivos: solución de hidróxido de sodio al 10% (NaOH), solución de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), solución de cloruro de aluminio ( $AlCl_3$ ) y solución de cloruro férrico ( $FeCl_3$ )

Se secó y se observó el color y fluorescencia, bajo luz UV a 365 nm. Se realizaron un total de cuatro pruebas con los siguientes extractos de *Ht*: hidroalcohólico, hexánico, acetato de etilo y acuoso.

### **3.4.2. Análisis cromatográfico de flavonoides por cromatografía en capa delgada**

Se realizó la cromatografía de los extractos de *Ht*: acetato de etilo y acuoso, en distintas fases móviles. Para ello los análisis se realizaron con las siguientes soluciones testigo: rutina, ácido clorogénico, apigenina y kaempferol.

Como fase estacionaria se usaron cromatofolios de Silica gel 60 F<sub>254</sub> Merck® 0.25 mm de espesor. Como fase móvil se utilizaron dos sistemas: fase móvil 1, acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético glacial/agua destilada (100:11:11:27); y fase móvil 2, tolueno/acetato de etilo (80:20).

Los cromatogramas se inspeccionaron bajo luz UV-254 nm y UV-365 nm; luego cada cromatograma fue analizado por medio de la pulverización con el reactivo de productos naturales (Wagner & Bladt, 1996).

## **3.5. Actividades Farmacológicas**

### **3.5.1. Animales empleados en los estudios de actividad farmacológica**

El manejo de los animales de experimentación se realizó bajo los principios y normas internacionales, publicados en la guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (publicación del NIH #85-23 revisado en 1985).

La eutanasia y los procedimientos realizados en cada uno de los ensayos utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Los protocolos autorizados fueron los

siguientes: N° 001-29-18 (Protocolo para el estudio farmacológico de plantas medicinales en preparados aislados de músculo liso intestinal, vesical y uterino de rata), el cual fue seguido para la realización de las curvas dosis respuestas en duodeno e intestino de rata; y N° 005-29-18 (Protocolo para el estudio farmacológico de extractos de plantas medicinales en el comportamiento de conducta en ratones), el cual fue seguido para la realización de los test para evaluar actividad en el sistema nervioso central.

Los animales utilizados fueron ratas Wistar (para el estudio de la actividad antiespasmódica) y ratones Swiss (para el estudio de los efectos a nivel del sistema nervioso central). Todos ellos fueron mantenidos en el bioterio de la cátedra de Farmacología bajo un ambiente estandarizado acorde a las necesidades de los animales y condiciones controladas de 12 hs luz – 12 hs oscuridad, con alimento y agua ad libitum, a menos que el ensayo a realizar tenga algún requerimiento específico en cuanto a este aspecto.

### **3.5.2. Estudio de la actividad antiespasmódica**

La actividad antiespasmódica se evaluó en estudios *ex vivo* mediante curvas de concentración-respuesta (CCR) del agonista muscarínico carbacol (Cbl), en ausencia y presencia de diversas concentraciones del extracto alcohólico (tintura) de *H. goudotianum* (*HgT*) y *H. translucidum* (*HtT*) (Protocolo CICUAL 001-29-18). Para evaluar los efectos de ambas tinturas a nivel de los canales de calcio del músculo liso intestinal de rata, se efectuaron protocolos de CCR de calcio en medio despolarizante de alta  $[K^+]$  (40 mM), en ausencia y presencia de diversas concentraciones de *HgT* y *HtT*.

### 3.5.2.1. Soluciones y drogas empleadas

- Solución Tyrode (concentraciones en mM): 8.0 NaCl, 2.0 KCl, 2.6 MgCl<sub>2</sub>, 1.0 NaHCO<sub>3</sub>, 1.3 PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, 1.0 C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub> para intestino (Hamada *et al.*, 1997).
- Tyrode sin Calcio (0-Ca<sup>2+</sup>): misma composición de la solución Tyrode sin agregado de CaCl<sub>2</sub>.
- Tyrode 0-Ca<sup>2+</sup> 40mMK<sup>+</sup>: con agregado de 0.6 ml de solución de KCl 10% en la cuba de 20 ml de Tyrode 0-Ca<sup>2+</sup>
- Curvas concentración-respuesta de Carbacol (Sigma®): A partir de una solución madre preparada de 2000 µg/ml de carbacol se realizaron diluciones con el fin de obtener las siguientes concentraciones: 1, 2, 7, 20, 70, 200, 700 y 1000 µg/ml, de las cuales se agregó sucesiva y acumulativamente 0.2 ml de cada concentración en 20 ml de Tyrode (dilución 1/100 en cuba).
- Curvas de concentración-respuesta de Calcio: se preparó una solución madre de 500 µg/ml de CaCl<sub>2</sub> (Anedra®), a partir de la misma se realizaron diluciones con el fin de obtener las siguientes concentraciones: 0.882, 1.75, 5.3, 18.5, 56, 186 µg/ml que se agregaron sucesiva y acumulativamente 0.2 ml de cada concentración en 20 ml de Tyrode 0-Ca<sup>2+</sup> 40m MK (dilución 1/100 en cuba).
- Vehículo etanólico: solución de etanol 70° sin el agregado de la droga vegetal de las especies en estudio *Hg* y *Ht*.
- Tintura Madre *Hg* y *Ht*: se diluyó la TM 20% en agua destilada con concentraciones resultantes de 0.1, 0.96, 3.2, 6.4 mg de droga seca/ml de cuba para *H. goudotianum* y 0.12, 0.4, 1.2, 4, 8 mg de droga seca/ml de cuba para *H. translucidum*, agregadas en 20 ml de Tyrode utilizado para las CCR de Carbacol y Calcio (dilución 1/100 en cuba).

### 3.5.2.2. Preparado biológico de intestino aislado de rata

Se utilizaron ratas Wistar de 200-250 g de peso, los animales previo ayuno fueron sacrificados con sobredosis de tiopental (40 mg/kg vía intraperitoneal) previa analgesia con tramadol (10-20 mg/kg S.C.). Una vez realizado el sacrificio se aislaron los duodenos e íleons, se cortaron trozos de aproximadamente 2 o 3 cm de longitud, se colocaron en cubas de doble camisa termostatzadas a 37°C contenidas con 20 ml solución Tyrode y burbujeo contante de aire y pH 8.2 (Livingstone & Livingstone, 1970; Ragone *et al.*, 2007). Los trozos de intestino se sujetaron longitudinalmente, el extremo inferior fue sujetado en la cuba de doble camisa mientras que el extremo superior se conectó a un transductor de fuerza isométrico (WPI Instruments, USA) con el fin de registrar la tensión desarrollada por los órganos, remitiendo las señales a la computadora a través del programa Eagle (USA), tal como se indica en la figura 9.



**Figura 9:** Foto de una cuba termostatzada de doble camisa en cuyo interior se encuentra montado un duodeno aislado de rata, el que se encuentra sujeto a un transductor de fuerza. El preparado se encuentra sumergido en solución Tyrode y aireado.

### **3.5.2.3. Curvas concentración – respuesta (CCR) acumulativas de carbacol**

Para el estudio de la actividad antiespasmódica de los extractos de las especies en estudio se realizaron curvas concentración-respuesta, metodología que ha sido puesta a punto en el laboratorio (Ragone *et al.*, 2007; Consolini *et al.*, 2011). Luego de un periodo de estabilización se efectuaron dos curvas control (en ausencia de tintura y/o vehículo) con el agregado de 0.2 ml de cada concentración de carbacol en orden creciente, hasta obtener el efecto máximo (Emáx: 100%). Posteriormente se realizaron curvas con concentraciones únicas de la tintura de cada especie *HgT* y *HtT*, agregando 0.2 ml de cada dilución previamente preparada, partiendo de una menor a mayor concentración. La tintura se agregó 5 minutos previos a la realización de la CCR (tiempo en que el extracto estuvo en contacto con el tejido). Se realizó un control con el vehículo etanólico para cada una de las curvas, las CCR fueron analizadas referidas al Emáx. del control inicial/vehículo según corresponda.

### **3.5.2.4. Curvas concentración – respuesta (CCR) acumulativas de calcio**

Previamente se realizó una estabilización de los preparados de órgano aislado en medio de Tyrode con  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual posteriormente se reemplazó con medio Tyrode 0- $\text{Ca}^{2+}$ , para iniciar con las CCR control de calcio. Una vez estabilizado el tejido se agregaron 0.6 ml de solución KCl 10% para llevar la concentración de potasio a 40 mM, y se realizaron las CCR. Se adicionaron sucesivamente 0.2 ml de cada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , en orden creciente, hasta registrar el Emáx. (100%). Se realizaron curvas sucesivas en presencia de concentraciones únicas de la tintura de cada especie *HgT* y *HtT*, en orden creciente de concentración y sus respectivos vehículos. La tintura o su vehículo fueron agregados 5

minutos previos a la realización de las CCR, se realizó un control con el vehículo etanólico. Las CCR se analizaron referidas al Em<sub>áx.</sub> obtenido en las curvas control o vehículo según corresponda (Ragone *et al.*, 2007; Consolini *et al.*, 2011).

### **3.5.3. Estudio de la actividad central**

#### **3.5.3.1. Soluciones y drogas empleadas**

- Solución fisiológica: solución estéril de cloruro de sodio al 0.9% (p/v)
- Diazepam (Roche ®, Argentina): a partir de ampollas de 10 mg/2ml, a dosis de 0.3 mg/kg. Control positivo.
- Clomipramina (Novartis ®, Argentina): a partir de ampollas de 25 mg/2ml a dosis de 1.25 mg/kg.
- Infusión 5% p/v *Hedyosmum goudotianum* (iHg): dosis de 25 mg/kg
- Infusión 5% p/v *Hedyosmum translucidum* (iHt): dosis de 25 mg/kg

#### **3.5.3.2. Mediciones de la movilidad espontánea en ratones**

##### **3.5.3.2.1. Test de campo abierto en ratones**

Mediante este test se evaluó por un lado la locomoción espontánea, a partir del número de líneas cruzadas por ambas patas delanteras del ratón; además y de forma simultánea se evaluaron la actividad exploratoria mediante el conteo del número de veces que el ratón mantuvo su cuerpo erguido apoyado sobre sus patas traseras; y el número de acicalamientos como estimación de la emocionalidad (Choleris *et al.*, 2001).

El test se realizó utilizando una caja de 30 x 50 cm, con paredes de 27 cm de alto, el piso de la caja dividido en 15 cuadrados, marcados con líneas trazadas sobre el mismo, tal como lo indicado en la figura 10, en condiciones de baja luminosidad. Los ratones se dividieron aleatoriamente en grupos, con seis individuos cada uno, a los cuales se les inyectaron vía i.p. los siguientes tratamientos: 1) solución fisiológica (control negativo), 2) diazepam 1 mg/kg (control positivo), 3) Infusión *H. goudotianum* (iHg) 25 mg/kg, 4) Infusión *H. translucidum* (iHt) 25 mg/kg.

El animal se colocó en un extremo de la caja, permitiendo su libre exploración durante 5 minutos, se grabó en videocámara con el fin de analizar los comportamientos anteriormente mencionados. La medición fue repetida durante 30 minutos por cada ratón, siendo la primera medida a los 0 min., con el fin de analizar el comportamiento del animal antes de la inyección del extracto a evaluar, luego de la inyección se realizaron cuatro medidas a los 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente (Choleris *et al.*, 200; Ragone *et al.*, 2010).



**Figura 10:** Foto del campo abierto usado en la medición de la movilidad espontánea en ratones.

### **3.5.3.3. Evaluación de la actividad ansiolítica**

#### **3.5.3.3.1. Test de supresión de alimento**

El test de supresión de alimento permite evaluar el efecto ansiolítico de diversas sustancias, dado que la latencia para comenzar a comer refleja una situación de conflicto entre el impulso de comer y el miedo natural de los ratones para áreas abiertas, comportamiento relacionado con la ansiedad y el estrés (Oliveira *et al.*, 2013). Es por ello que el tiempo hasta el primer momento de alimentación y la comida ingerida después de un lapso de tiempo son los parámetros que se midieron.

El dispositivo consiste en una caja de 40 x 40 cm (Figura 11), con una altura de las paredes de 30 cm, en el centro de la caja se coloca un papel circular color blanco con un trozo de comida de ratón (Mineur *et al.*, 2007). Previo a la realización del test los ratones fueron privados de alimento durante 24 horas, se dividieron aleatoriamente en grupos y posteriormente fueron inyectados vía i.p. con los siguientes tratamientos: 1) solución fisiológica (control negativo), 2) diazepam 0.3 mg/kg (control positivo), 3) Infusión *H. goudotianum* (iHg) 25 mg/kg, 4) Infusión *H. transluidum* (iHt) 25 mg/kg.

Transcurrido una hora post-administración se coloca el ratón en una esquina de la caja y se registra el tiempo de latencia desde que es ubicado en su posición hasta el primer momento de alimentación, inmediatamente después el ratón es removido y colocado en una jaula individual con un trozo de comida previamente pesado. A los 5 minutos posteriores, se retira el alimento no ingerido y se pesa nuevamente, de esta manera, se determinan los gramos de alimento consumido durante 5 minutos.



**Figura 11:** Foto del sistema empleado para la realización del test de supresión de alimento.

#### **3.5.3.3.2. Test de laberinto en cruz elevado**

El laberinto en cruz elevado es uno de los test más ampliamente utilizados para medir ansiedad en ratones. Este test se basa en la aversión natural de los ratones por áreas abiertas, luminosas y elevadas, así como en su comportamiento exploratorio espontáneo natural en entornos nuevos (Komada *et al.*, 2008). El sistema consta de cuatro brazos, dos abiertos y dos cerrados a los cuales los ratones tuvieron acceso, permitiéndoles moverse libremente, el laberinto se colocó a unos 50 cm del suelo, el test se realizó en condiciones controladas de luz y sonido (Figura 12).

Los ratones fueron colocados en la plataforma central del laberinto y se midió el número de entradas en los brazos abiertos y cerrados, así como el tiempo de permanencia en los mismos durante 5 minutos. Se trabajó aleatoriamente con grupos de seis ratones a los cuales se les administró vía i.p. los siguientes tratamientos: 1) solución fisiológica (control negativo), 2) diazepam 0.3 mg/kg (control positivo), 3) Infusión *H. goudotianum* (iHg) 25 mg/kg, 4) Infusión *H. translucidum* (iHt) 25 mg/kg. Las mediciones se realizaron en una

secuencia de 30 minutos, iniciando con un tiempo antes de que los ratones fueran inyectados y siguiendo a los 30, 60, 90 y 120 minutos.



**Figura 12:** Foto del sistema empleado para la realización del test de laberinto en cruz elevado

### **3.5.3.4. Evaluación de la actividad antidepresiva**

#### **3.5.3.4.1. Test de suspensión de cola**

Este test permite evaluar la actividad antidepresiva de la sustancia evaluada. Cuando un ratón es suspendido por su cola, los movimientos iniciales están orientados al escape, pero seguidamente desarrolla una postura inmóvil, lo cual se considera como un estado conductual de resignación, el ratón se coloca en una situación estresante ineludible que implica el estrés de ser colgado de manera incontrolable por la cola. Si se administran tratamientos antidepresivos, los ratones persistirán activamente en un comportamiento dirigido hacia el escape, disminuyendo el tiempo de inmovilidad. Una ventaja de esta prueba es su capacidad para detectar un amplio rango de antidepresivos, independientemente de su mecanismo subyacente (Yacoubi *et al.*, 2003; Cryan *et al.*, 2005; Lad *et al.*, 2007).

Para la aplicación del test se utilizó una estructura de 50 cm de alto por 60 cm de ancho y 12 cm de profundidad, la misma que estuvo dividida en cuatro secciones (Figura 13). Los ratones se suspendieron por la cola colocándoles una cinta adhesiva, a 50 cm sobre el piso. Los registros se realizaron por un periodo de 6 minutos, en donde se analizó el tiempo de inmovilidad. Los ratones aleatoriamente fueron inyectados 60 minutos antes de realizar el test, por vía i.p. con los siguientes tratamientos: 1) solución fisiológica (control negativo), 2) clomipramina 1.25 mg/kg (control positivo), 3) Infusión *H. goudotianum* (iHg) 25 mg/kg, 4) Infusión *H. translucidum* (iHt) 25 mg/kg.



**Figura 13:** Foto del sistema empleado en esta tesis para la realización del test de suspensión de cola.

### **3.5.3.5. Estudio del efecto anorexígeno**

Con el fin de medir los efectos sobre el consumo de alimento en ratones, se llevó a cabo un diseño experimental tal como los descritos anteriormente por otros autores (Flannery *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2014). El experimento se desarrolló en el transcurso de 24 horas, considerando los ciclos de luz y oscuridad. El día del experimento los ratones fueron privados de alimento a partir de las 10:00 horas hasta las 18:00 horas, sólo provistos con agua ad libitum.

Inmediatamente (18:00 horas), los animales fueron aleatoriamente inyectados vía i.p. con los siguientes tratamientos: 1) solución fisiológica, 2) infusión *H. goudotianum* (iHg) 25 mg/kg y 3) infusión *H. translucidum* (iHt) 25 mg/kg, y colocados en jaulas individuales con un trozo de alimento previamente pesado, después de 30 minutos transcurridos (18:30 horas) se midió la ingesta del alimento, se continuaron con las mediciones de la ingesta del alimento consumido durante el ciclo de oscuridad, iniciando a las 18:30 hs, 19:00 hs, 21:00 hs, 24:00 hs y a las 10:00 horas del día siguiente (Figura 14).



**Figura 14:** Esquema del test anorexígeno, empleado en esta tesis (según lo descrito por Wu *et al.*, 2014).

### 3.5.4. Tratamiento estadístico de los datos

Los datos obtenidos de las CCR de carbacol y calcio fueron analizados con el programa Graph Pad Prisma versión 8.01. Para comparar las respectivas CCR se utilizó el método estadístico ANOVA de dos vías considerando como variables el tratamiento y log [agonista], seguido de comparaciones pareadas a posteriori a los respectivos log [agonista] por el test de Turkey. Los datos de CI50 se expresaron como medio  $\pm$  ESM a partir de los  $n$  datos obtenidos. En todas las comparaciones estadísticas se consideró un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

Los datos obtenidos de las pruebas de comportamiento en el test de campo abierto, laberinto en cruz y test anorexígeno se analizaron con el mismo programa Graph Pad Prisma versión 8.01, utilizando el método estadístico ANOVA de dos vías seguido por el test de Turkey, considerando para todos los casos un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

Para los análisis de supresión de alimento y suspensión de cola se aplicó el método ANOVA de una vía seguido por el test a posteriori Turkey con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

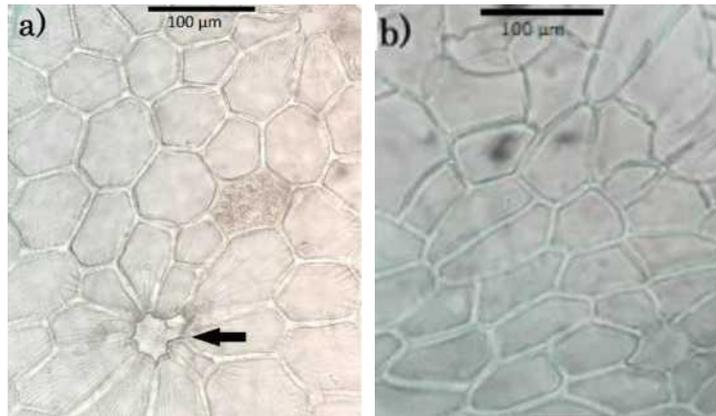
## **4. RESULTADOS**

## 4.1 Estudios botánicos

### 4.1.1 Anatomía foliar de *Hedyosmum goudotianum* Solms

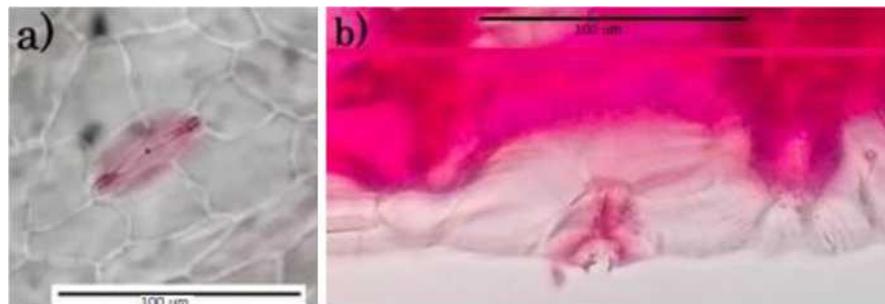
#### Lámina

Células epidérmicas: en vista frontal, en la cara adaxial y abaxial se observan células de forma poligonal con paredes anticlinales rectas y gruesas. Presencia de estrías cuticulares radiadas. Conspicuas células epidérmicas silicificadas distribuidas por toda la superficie de la lámina tanto en el haz como en el envés (Figura 15). No se observó presencia de tricomas.



**Figura 15:** *H. goudotianum*: vista frontal a) células epidérmicas de la cara adaxial, la flecha indica presencia de sílice; b) células epidérmicas de la cara abaxial.

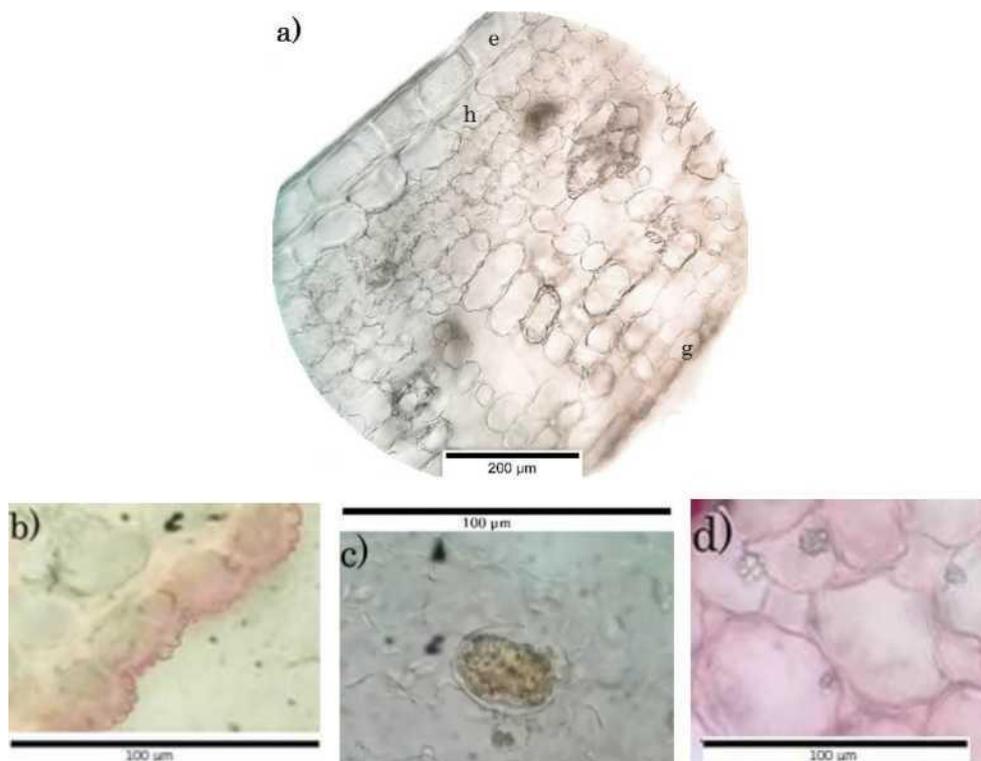
Estomas: hoja hipoestomática, estomas de tipo laterocíticos, con 4 a 6 células subsidiarias que forma una roseta que rodea las células guarda (Baranova, 1983) (Figura 16).



**Figura 16:** *H. goudotianum*: estomas a) vista frontal de la cara abaxial; b) vista en corte transversal.

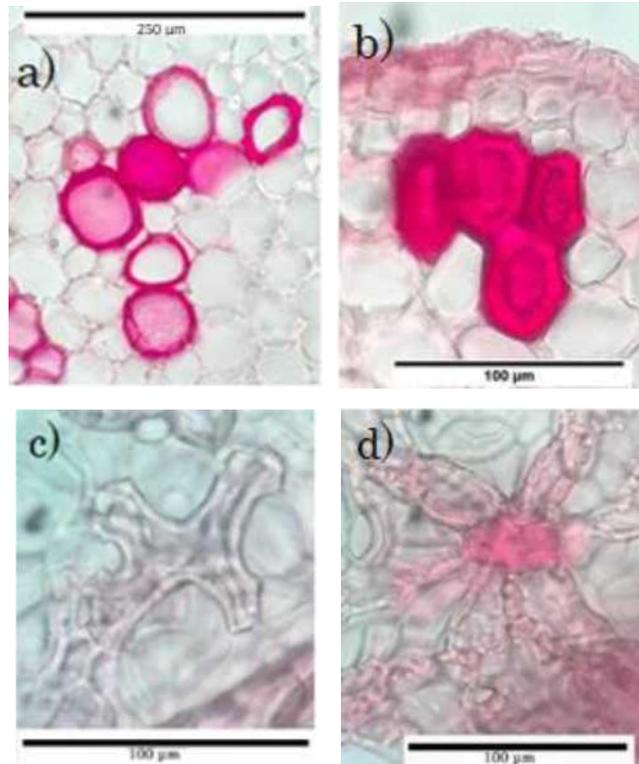
Estructura foliar en corte transversal: Ambas epidermis unistratas, formadas por células rectangulares con la pared periclinal externa engrosada y cubierta por una cutícula gruesa y sinuosa, las células epidérmicas de la cara adaxial están acompañadas de una hipodermis discontinua formada por células de igual tamaño que las de la epidermis; las células de la epidermis abaxial más pequeñas y alargadas que las de la cara adaxial.

Mesófilo dorsiventral con un parénquima en empalizada atípico ya que está formado por 4-6 capas de células cortas de contornos irregulares hacia la cara adaxial y hacia la cara abaxial un parénquima esponjoso formado por una capa de 6-7 células que dejan amplios espacios intercelulares (Figura 17a). Presencia de microcristales dispersos en la epidermis, parénquima y colénquima, además de células esféricas con contenido celular presentes en el mesófilo más cercano a la cara adaxial (Figura 17c, d).



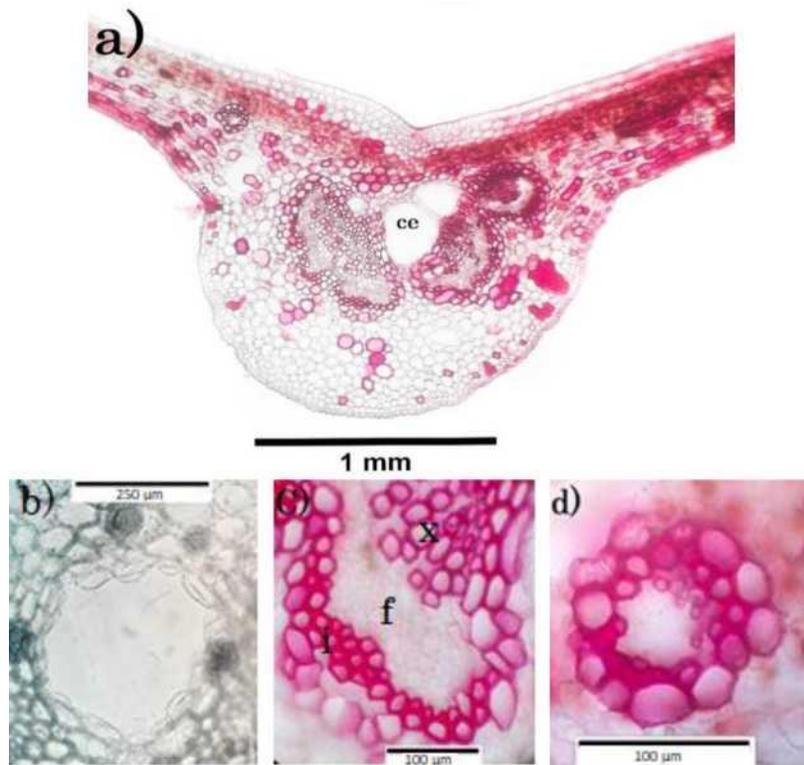
**Figura 17:** *H. goudotianum*: a) vista corte transversal de la hoja, e: epidermis adaxial; h: hipodermis; g: epidermis abaxial; b) cutícula; c) célula esférica con contenido; d) microcristales.

Tejido de sostén: abundantes esclereidas idioblásticas, encontrándose solas o en grupos dispersos en todo el mesófilo, distinguiéndose tres tipos: braquiesclereidas, células parenquimáticas esclerificadas y esclereidas ramificadas (Figura 18). Colénquima angular, dispuesto sobre el haz vascular central, con 3-4 capas de células asociadas a la cara adaxial, seguido por 3-4 capas de parénquima que lo separa del haz vascular.



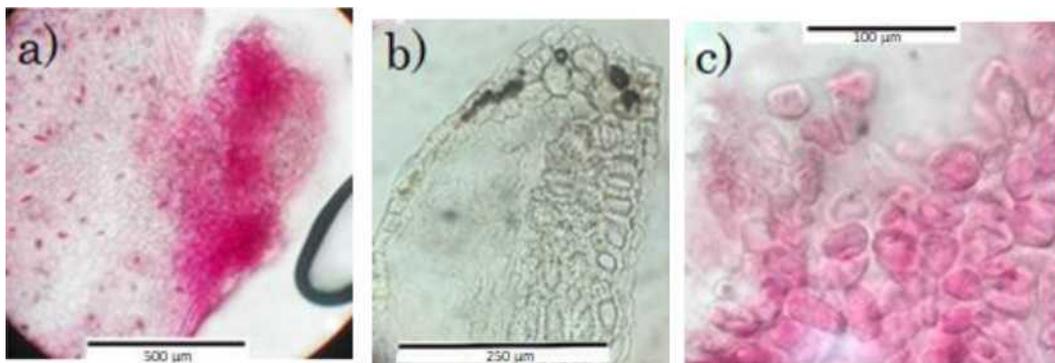
**Figura 18:** *H. goudotianum*: a) células parenquimáticas esclerificadas; b) braquiesclereidas; c) esclereida ramificada; d) conjunto de braquiesclereidas con esclereidas ramificadas.

Tejido vascular: Vena media notablemente convexa hacia la cara abaxial. Haz vascular colateral, rodeado por 2 a 4 capas de fibras floemáticas, 3 a 4 cavidades esquizógenas de tamaño variable asociadas; haces vasculares de las venas inferiores rodeados por una vaina de fibras asociadas a esclereidas (Figura 19).



**Figura 19:** *H. goudotianum*, corte transversal: a) vena media, ce: cavidades esquizógenas; b) detalle de una cavidad esquizógena; c) detalle del haz vascular de la vena media, x: xilema, f: floema, i: fibra floemática; d) haz vascular de las venas inferiores rodeado por fibras asociadas a esclereidas.

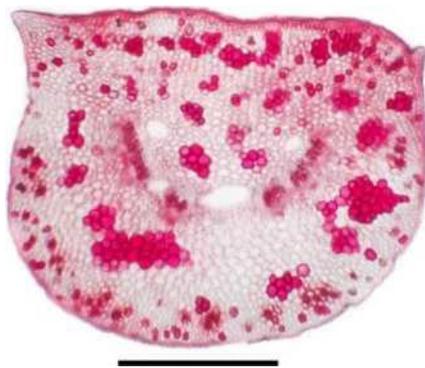
Dientes: Dientes densamente esclerificados, correspondientes al tercer tipo de acuerdo a la clasificación realizada por Todzia (1988) y Todzia & Keating (1991), hidátodos presentes observándose un conjunto de grandes estomas dispersos sobre la base de los dientes tanto en el haz como envés de la lámina (Figura 20).



**Figura 20:** *H. goudotianum*: a) diente densamente esclerificado, hidátodos dispuesto hacia la base del diente, vista frontal del haz de la hoja; b) detalle del ápice del diente, corte transversal; c) detalle de esclereidas.

### Pecíolo

El corte transversal presenta contorno redondeado con dos pequeñas expansiones aladas en la cara adaxial; epidermis unistrata de células rectangulares con cutícula gruesa; zona cortical formada por 5-6 capas de colénquima periférico, seguido de un parénquima reservante; tejido vascular dispuesto en forma de arco, 3-5 cavidades esquizógenas no asociadas dispuestas hacia la cara adaxial. Esclereidas solitarias o en grupos, de tipo braquiesclereidas y células parenquimáticas esclerificadas, dispersas por todo el parénquima y colénquima. Abundantes microcristales en el parénquima y colénquima (Figura 21).

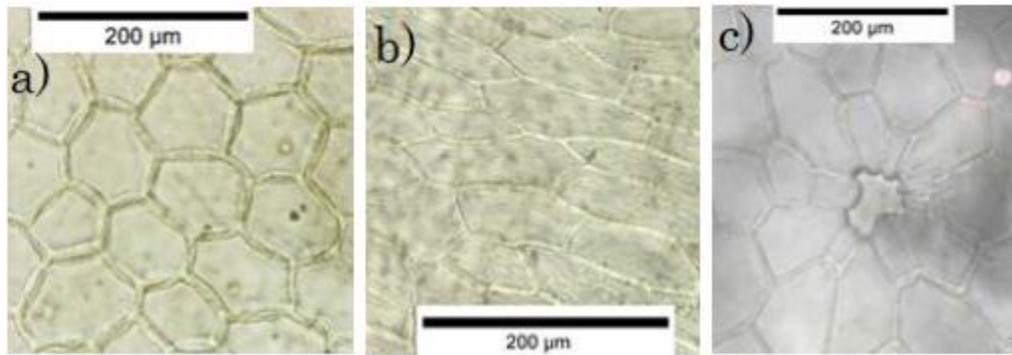


**Figura 21:** *H. goudotianum*: corte transversal del pecíolo.

#### **4.1.2. Anatomía foliar de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec.**

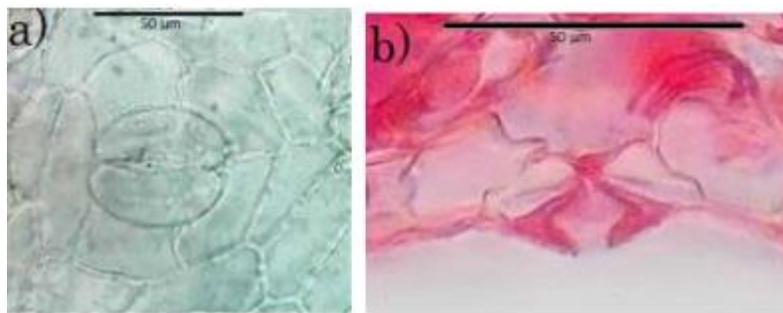
### Lámina

Células epidérmicas: en vista frontal, en la cara adaxial se observan células de forma poligonal con paredes anticlinales rectas y gruesas, las células de la cara abaxial presentan paredes anticlinales ligeramente más delgadas. Presencia de estrías cuticulares radiadas. Células epidérmicas silicificadas distribuidas por toda la superficie de la lámina tanto en el haz como en el envés (Figura 22). No se observó presencia de tricomas.



**Figura 22:** *H. translucidum*: vista frontal a) células epidérmicas de la cara adaxial; b) células epidérmicas de la cara abaxial; c) células silicificadas presentes en la epidermis.

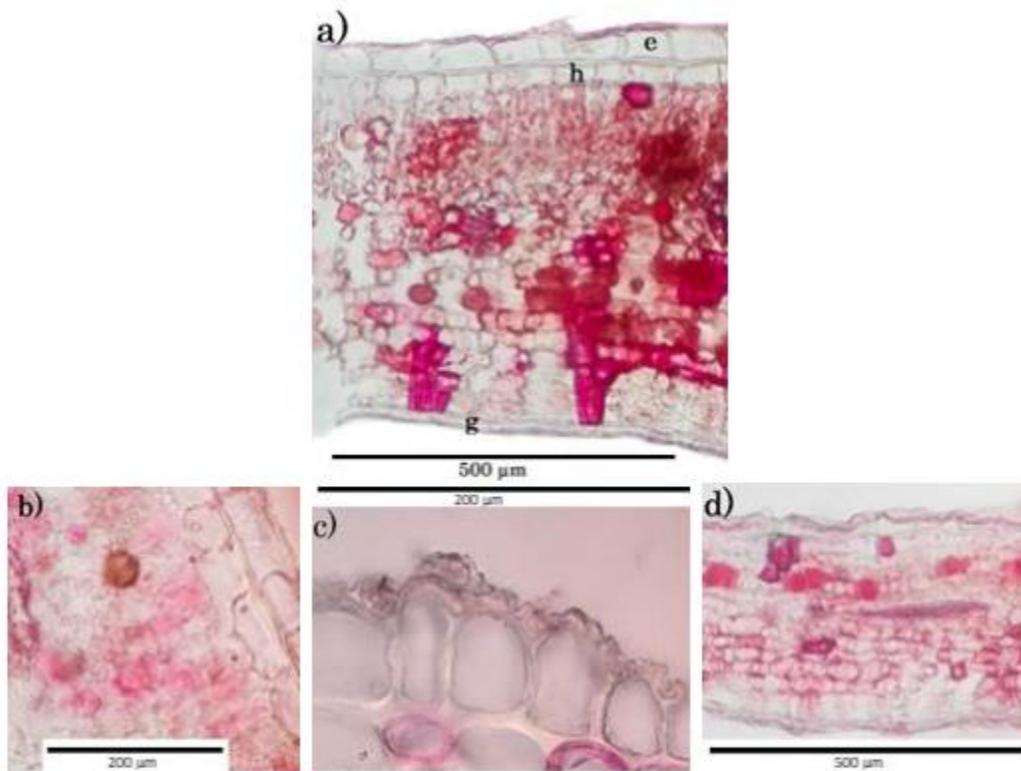
Estomas: hoja hipoestomática, estomas de tipo laterocíticos, con 4 a 6 células subsidiarias formando una roseta que rodea las células guarda (Baranova, 1983) (Figura 23).



**Figura 23:** *H. translucidum*: estomas a) vista frontal de la cara abaxial; b) vista en corte transversal.

Estructura foliar en corte transversal: Ambas epidermis unistratas, formadas por células rectangulares con la pared periclinal externa gruesa, cutícula gruesa y sinuosa, las células epidérmicas de la cara adaxial están acompañadas de una hipodermis discontinua formada por células de igual tamaño que las de la epidermis; las células de la epidermis abaxial evidentemente más pequeñas que las de la cara adaxial y de forma más alargada (Figura 24a, c).

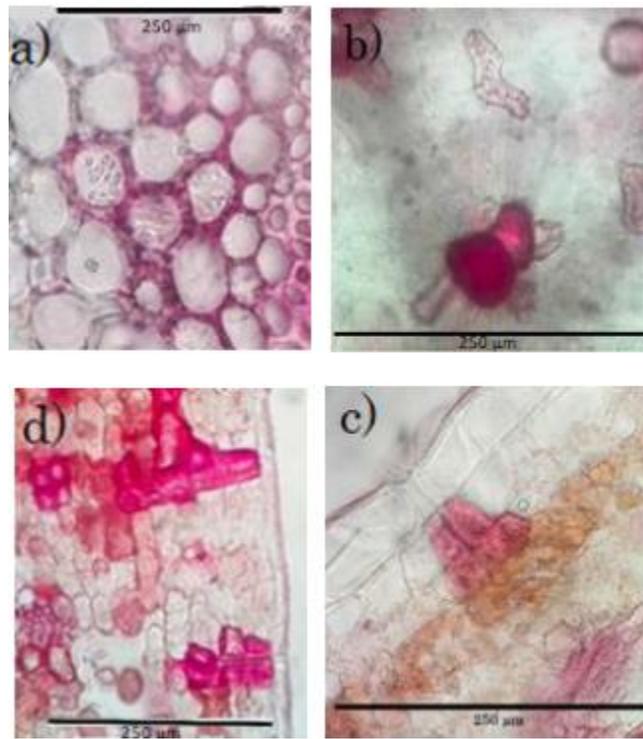
Mesófilo dorsiventral formado por un parénquima en empalizada atípico ya que está formado por 2-3 capas de células cortas de contornos irregulares hacia la cara adaxial y hacia la cara abaxial un parénquima esponjoso formado por una capa de 10-12 células que dejan amplios espacios intercelulares (Figura 24a). Microcristales presentes en el mesófilo, colénquima y epidermis. Células esféricas con contenido celular distribuidas por el mesófilo cercano a la cara adaxial, también se diferencian células de la hipodermis y parénquima teñidas de un contenido oscuro (Figura 24b, d).



**Figura 24:** *H. translucidum*: a) vista corte transversal de la hoja, e: epidermis adaxial; h: hipodermis; g: epidermis abaxial; b) célula esférica con contenido; c) cutícula sinuosa; d) células teñidas del mesófilo.

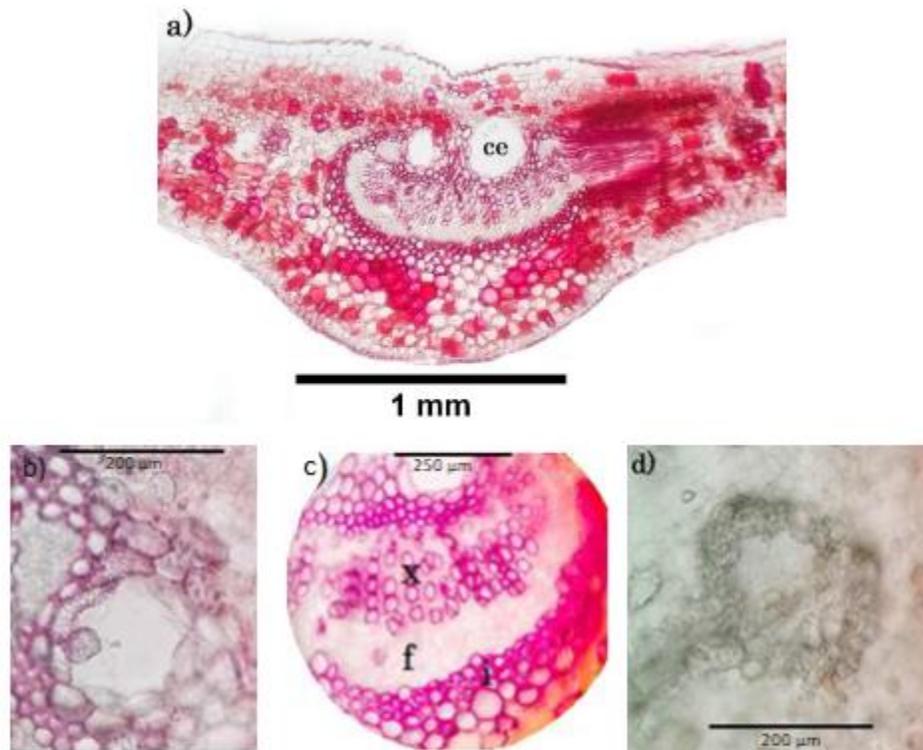
Tejido de sostén: esclereidas idioblásticas dispersas en todo el mesófilo, distinguiéndose cuatro tipos: braquiesclereidas, macrosclereidas, células parenquimáticas esclerificadas y esclereidas ramificadas, las mismas se encuentran solas o en grupos

(Figura 25). Una capa de colénquima abaxial seguido de tejido parenquimático que lo separa del haz vascular. Las células de la epidermis tanto adaxial como abaxial se encuentran asociadas a grupos de esclereidas en general macroesclereidas y braquiesclereidas dispuestas en el mesófilo en forma perpendicular a la epidermis (Figura 25c, d), determinándose como un patrón distinguible de esta especie.



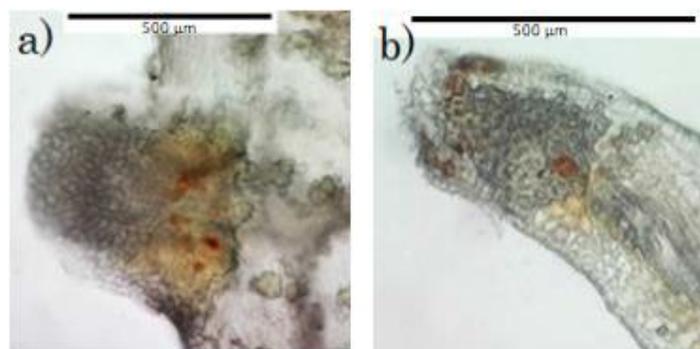
**Figura 25:** *H. translucidum*: a) células parenquimáticas esclerificadas; b) conjunto de braquiesclereidas y esclereida ramificada; c) esclereidas asociadas a la epidermis adaxial; d) esclereidas asociadas a la epidermis abaxial.

Tejido vascular: Vena media notablemente convexa hacia la cara abaxial. Haz vascular colateral, rodeado por 2 a 4 capas de fibras floemáticas, 2 a 4 cavidades esquizógenas de tamaño variable asociadas; haces vasculares de las venas inferiores rodeados por una vaina de fibras (Figura 26).



**Figura 26:** *H. translucidum*, corte transversal: a) vena media, ce: cavidades esquizógenas; b) detalle de una cavidad esquizógena; c) detalle del haz vascular de la vena media, x: xilema, f: floema, i: fibra floemática rodeando el haz vascular; d) haz vascular de las venas inferiores.

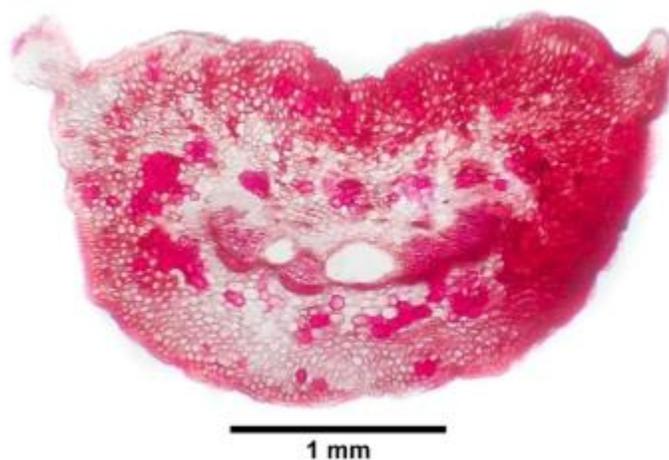
Dientes: dientes compuestos por un conjunto de esclereidas aglomeradas principalmente en la base de los costados de cada diente, correspondientes al tercer tipo de acuerdo a la clasificación realizada por Todzia (1988) y Todzia & Keating (1991). Hidátodos ausentes (Figura 27).



**Figura 27:** *H. translucidum*: a) diente densamente esclerificado, vista frontal; b) detalle ápice del diente, corte transversal.

### Pecíolo

El corte transversal presenta contorno redondeado, dos pequeñas expansiones laterales aladas presentes hacia la cara adaxial; epidermis unistrata, células rectangulares con paredes y cutícula gruesa; zona cortical formada por 4-5 capas de colénquima periférico, seguido de un parénquima reservante; tejido vascular formando un semicírculo, 4 a 5 cavidades esquizógenas dispuestas hacia la cara adaxial, asociadas a los haces vasculares. Esclereidas solitarias o en grupos, de tipo braquiesclereidas y células parenquimáticas esclerificadas dispersas por todo el parénquima. Abundantes microcristales dispuestos en el parénquima y colénquima (Figura 28).



**Figura 28:** *H. translucidum*, corte transversal del pecíolo.

Si bien muchos caracteres anatómicos se comparten entre estas dos especies, se identificaron algunos específicos para *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum*, detallados en la siguiente tabla:

**Tabla 1:** Caracteres histológicos de las hojas de *H. goudotianum* y *H. translucidum*.

<b>Caracteres histológicos</b>	<b><i>Hedyosmum goudotianum</i></b>	<b><i>Hedyosmum translucidum</i></b>
Forma de células epidérmicas	Poligonal	Poligonal
Células silicificadas	Presentes en la epidermis	Presentes en la epidermis
Estomas	Hoja hipoestomática Tipo Laterocíticos	Hoja hipoestomática Tipo Laterocíticos
Número de capas de parénquima en empalizada atípico	<b>4 – 6</b>	<b>2 – 3</b>
Número de capas de parénquima esponjoso	<b>6 – 7</b>	<b>10 – 12</b>
Posición microcristales	Epidermis, mesófilo, colénquima	Epidermis, mesófilo, colénquima
Células esféricas con contenido celular	Presentes en mesófilo	Presentes en mesófilo
Tipo de esclereidas	Braquiesclereidas. Esclereidas ramificadas. Células parenquimáticas esclerificadas. Conjunto de células parenquimáticas esclerificadas con braquiesclereidas. Conjunto de células ramificadas con braquiesclereidas.	Braquiesclereidas. Esclereidas ramificadas. Células parenquimáticas esclerificadas. Conjunto de células parenquimáticas esclerificadas con braquiesclereidas. Conjunto de células ramificadas con braquiesclereidas. <b><i>Macroesclereidas adjuntas de manera paralela a la epidermis adaxial y abaxial.</i></b>
Sistema vascular	Haz colateral rodeado por fibras floemáticas. Venas de menor orden rodeadas por fibras asociadas a esclereidas	Haz colateral rodeado por fibras floemáticas. Venas de menor orden rodeadas por fibras asociadas a esclereidas.
Cavidades esquizógenas	Presentes en vena media	Presentes en vena media
Tipo de dientes	Dientes densamente esclerotizados. <b><i>Hidátodos presentes.</i></b>	Dientes densamente esclerotizados. <b><i>Hidátodos ausentes.</i></b>

## 4.2 Estudios fitoquímicos

### 4.2.1 Reacciones de caracterización de flavonoides de *H. translucidum*

#### 4.2.1.1 Reacción de Shinoda

El magnesio metálico es oxidado por el HCl, dando como producto hidrógeno nascente, el cual es capaz de reducir el flavonoide resultando una coloración roja en fase amílica (Roger, 2013). El extracto hidroalcohólico de *Ht* dio positivo en la prueba con una coloración roja parda (Figura 29), indicando la presencia de flavonoides.



**Figura 29:** Reacción de Shinoda: extracto hidroalcohólico de *H. translucidum*.

#### 4.2.1.2. Reacciones de toque sobre papel

Se analizaron los extractos: hidroalcohólico, hexánico, acetato de etilo y acuoso de *Ht*, obteniéndose los resultados indicados en la tabla 2.

Teniendo en cuenta que los flavonoides en su mayoría están constituidos por un núcleo bencénico (A) unido por tres átomos de carbono a un anillo pirano (C), incluyendo además en distintas posiciones un segundo anillo bencénico (B), dando lugar a distintas

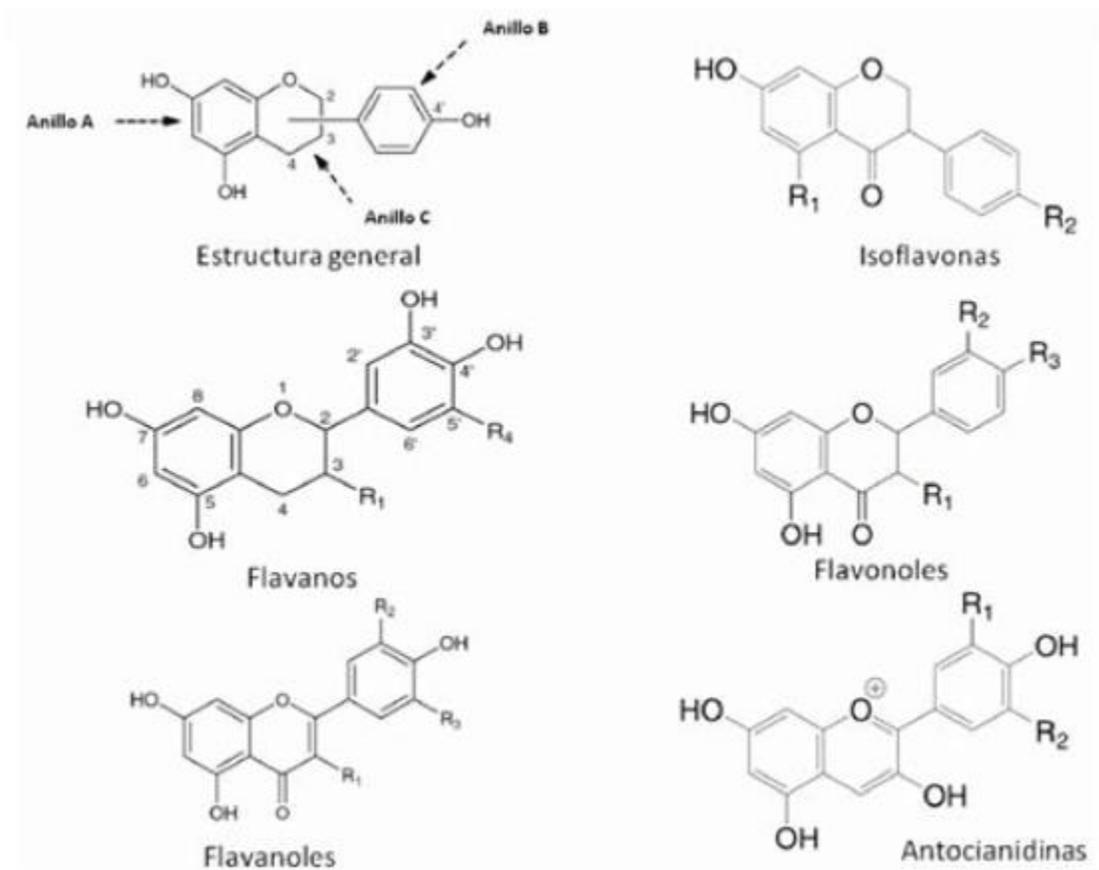
clases de flavonoides, que se diferencian también en el grupo -OH y en el grado de saturación que presenta el anillo C (Figura 30); la interpretación de los resultados obtenidos en las pruebas de toque de papel es la siguiente:

**Tabla 2:** Reacciones de toque sobre papel para detección de flavonoides de *H. translucidum*.

Soluciones	NaOH	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	AlCl <sub>3</sub>	FeCl <sub>3</sub>	Control
Extracto hidroalcohólico	+ Naranja pardo	+ Amarillo-verde fluor.	+ Amarillo fluor.	+ Negro	Pardo rojizo con bordes celestes
Extracto hexánico	+ Amarillo	-	-	+ Negro	Rosado
Extracto de acetato de etilo	+ Naranja	+ Amarillo-verde fluor.	+ Amarillo fluor.	+ Negro	Incoloro
Extracto acuoso	+ Amarillo	-	+ Amarillo fluor.	+ Negro	Incoloro

- En la reacción con NaOH se produce la ruptura del anillo C de un flavonoide, el cual puede ser de flavonas y flavonoles, lo que se evidencia con un color amarillo que puede variar de intensidad al naranja rojizo. *Todos los extractos de Ht estudiados fueron positivos a esta prueba.*
- Adicionalmente, se realizó la prueba con ácido bórico. Los flavonoides que poseen un grupo carbonilo y un grupo hidroxilo en posición 5, dan con H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> complejos amarillos con fluorescencia. *Los extractos hidroalcohólico y de acetato de etilo de Ht fueron positivos mostrando la presencia de flavonoides en los mismos.*
- En los compuestos que posean grupos OH en posición 5 o en posición 3 y/o un ortodihidroxilo en posición 3'-4' se presencia con la formación de lacas color amarillo de intensa fluorescencia, al realizar la prueba con Cloruro de Aluminio. *Los extractos hidroalcohólico, de acetato de etilo y acuoso de Ht resultaron positivos a esta prueba.*

- El tricoloruro de hierro al reaccionar con grupos fenólicos puede presentarse la formación de compuestos coloreados, dado que los OH actúan como activadores del anillo bencénico, dando respuestas positivas en la presencia de coloraciones: verde, pardo oscuro al azul (Roger, 2013). *Los resultados fueron positivos para todos los extractos probados, indicando la presencia de polifenoles con tres oxidrilos adyacentes al presentar coloración negruzca.*



**Figura 30:** Estructura química general del grupo fitoquímico flavonoides y de los principales grupos de flavonoides (obtenida de Limón *et al.*, 2010).

#### 4.2.2. Análisis cromatográfico de flavonoides por CCD de *H. translucidum*

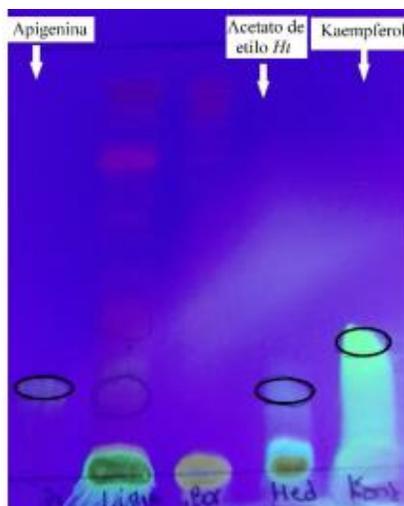
Se realizó una CCD para identificación de flavonoides del **extracto acuoso de *Ht***, utilizando la fase móvil 1: acetato de etilo/ácido fórmico/ácido acético glacial/agua destilada (100:11:11:27), en presencia de las soluciones de referencia de rutina y ácido clorogénico. Se evidenciaron un total de 6 bandas luego del revelado con el reactivo de productos naturales (RPN) y exposición a luz UV 365 nm (Tabla 3). *Ninguna presenta coincidencia con las sustancias de referencia utilizadas (rutina y ácido clorogénico).*

**Tabla 3:** Cromatografía en capa delgada de flavonoides del extracto acuoso de *Ht*. Fase móvil: Acetato de etilo / ácido fórmico / ácido acético glacial / agua destilada (100:11:11:27), después del revelado con RPN.

<b>Sustancias de referencia</b>	<b>Rf</b>	<b>Color</b>
Rutina	4.3	Anaranjado
Ac. clorogénico	3.6	Celeste fluorescente
<b>Extracto acuoso</b>	<b>Rf</b>	<b>Color</b>
6	0.8	Celeste fluorescente
5	2.3	Celeste
4	2.7	Anaranjado
3	3.3	Celeste
2	3.7	Amarillo fluorescente
1	4.6	Celeste fluorescente

Además, se realizó una CCD para identificación de flavonoides del **extracto acetato de etilo de *Ht***, utilizando la fase móvil 2: tolueno/acetato de etilo (80:20), en presencia de las sustancias de referencia de apigenina y kaempferol. Luego del revelado con el reactivo de productos naturales (RPN) y exposición a luz UV 365 nm.

Se evidenció una sola banda color celeste fluorescente con Rf ~ 4.4. Dado que la muestra presenta una banda con un Rf muy cercano a la sustancia de referencia apigenina (Rf ~ 4.3, celeste fluorescente) (Figura 31). Estos resultados sugieren que apigenina podría estar presente en el extracto de acetato de etilo de *Ht*.



**Figura 31:** Perfil cromatográfico del extracto de acetato de etilo de *Ht*. Fase móvil: tolueno/acetato de etilo (80:20), después del revelado con RPN.

En resumen, los ensayos fitoquímicos realizados con los extractos de *Hedyosmum translucidum* nos permiten confirmar la presencia de flavonoides en los mismos, sin embargo, es necesario realizar un mayor número de determinaciones y el uso de otras técnicas más específicas que las usadas para identificar los mismos.

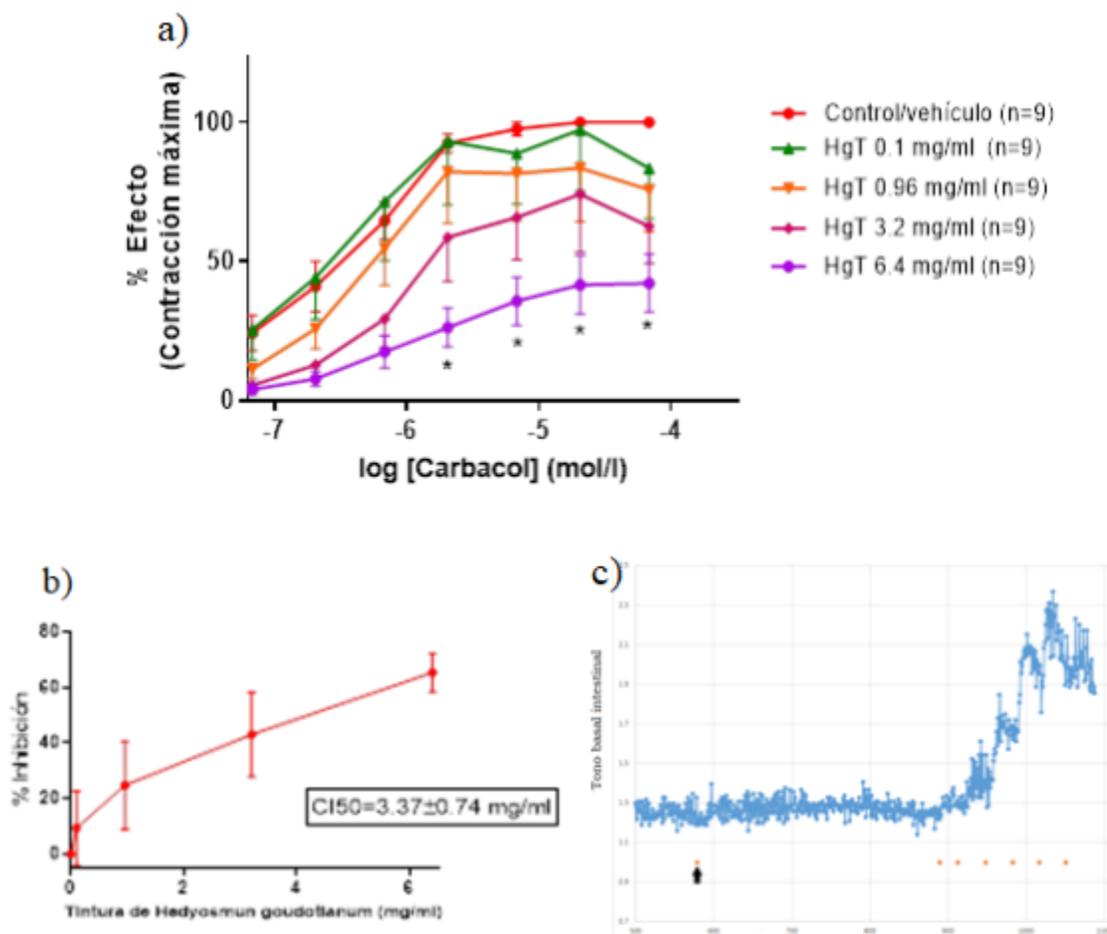
### 4.3 Estudios farmacológicos

#### 4.3.1 Efectos antiespasmódicos sobre músculo liso intestinal de los extractos hidroalcohólicos (tintura 20%) de *H. goudotianum* y *H. translucidum*.

##### 4.3.1.1 Efectos de *H. goudotianum* sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de Carbacol.

La adición directa a la cuba de las distintas concentraciones empleadas de tintura de *Hg* no produjo modificaciones en el tono basal intestinal (Figura 32c).

La tintura de *Hg* produjo una caída en el efecto máximo en la curva concentración respuesta de carbacol, de forma tal que mostró una inhibición en forma no competitiva del receptor muscarínico (mayoritariamente M3) en el músculo liso del duodeno e íleon aislado de rata ( $pD_2 = 6.47 \pm 0.14$ ;  $n = 9$ ). Este efecto fue dependiente de la concentración en un rango de 0.1 a 6.4 mg droga seca/ml de tintura. Se observó además que la caída del efecto máximo fue estadísticamente significativa sólo cuando la CCR de carbacol fue realizada en presencia de la mayor dosis de tintura ensayada (6.4 mg/ml) (Figura 32a).



**Figura 32:** a) curva concentración respuesta carbacol en ausencia y presencia de la tintura de *H. goudotianum* ( $n = 6$ ). ANOVA de dos vías: Por tratamiento:  $F(4,280) = 180.8$ ,  $p < 0.001$ ; por tiempo:  $F(6,280) = 20.55$ ,  $p < 0.001$ . Post-test Tukey:  $*p < 0.001$ ; b) cálculo de la concentración inhibitoria 50% (CI50) de la tintura de *H. goudotianum*; c) registro original de CCR de carbacol, la flecha indica la adición directa de 6.4 mg droga seca/ ml de cuba de *HgT*.

La concentración inhibitoria al 50% del efecto máximo (CI50) producida por *HgT* en el intestino aislado de rata fue de  $3.37 \pm 0.74$  mg de droga seca /ml (Figura 32b).

Los agregados de las diferentes concentraciones de *HgT* no modificaron el tono basal intestinal, mostrando que no posee un efecto relajante directo del músculo liso intestinal.

En todos los casos se realizó una CCR de carbacol en presencia del vehículo etanólico (n= 9), no se encontraron diferencias significativas entre el efecto máximo de contracción en presencia o ausencia del vehículo.

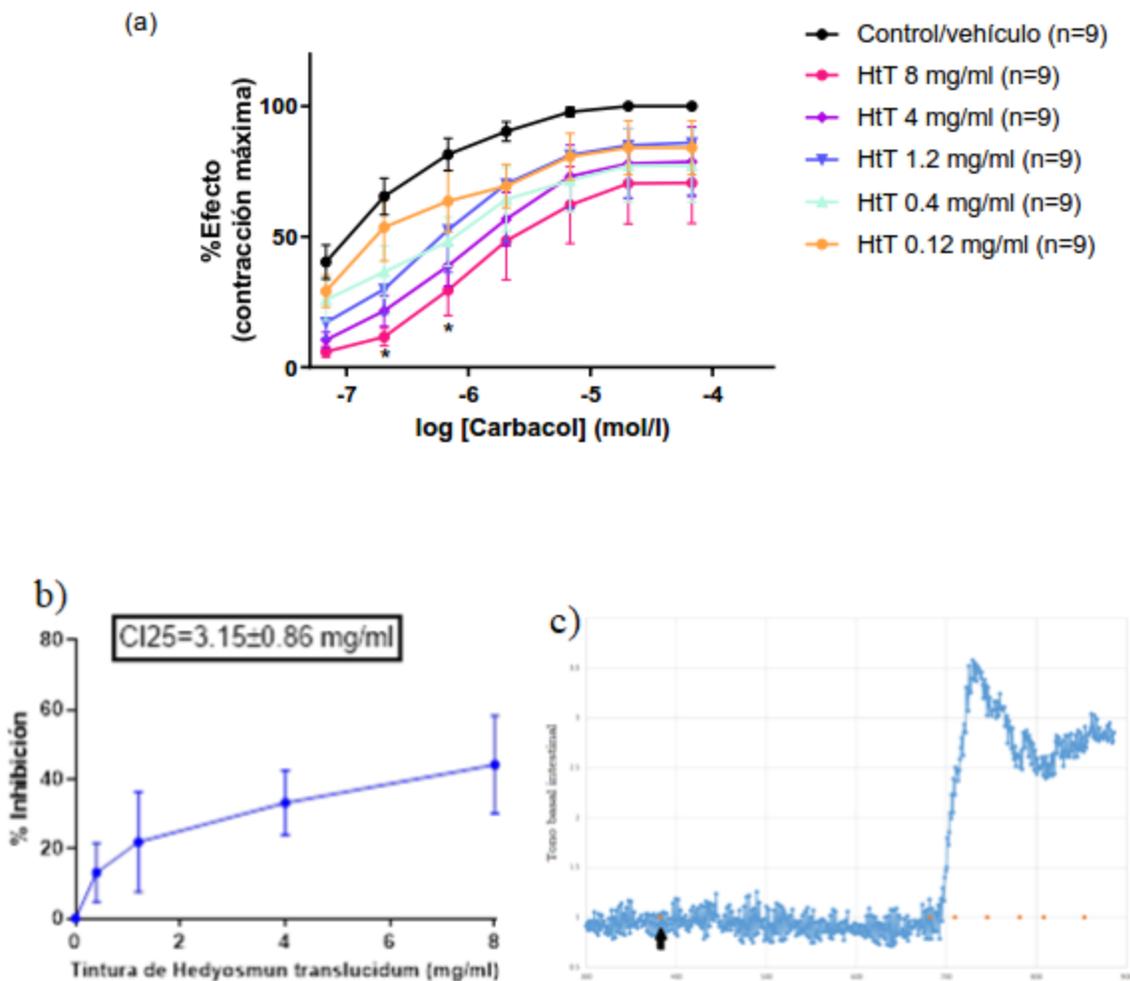
#### **4.3.1.2 Efectos de *H. translucidum* sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de Carbacol**

La adición directa a la cuba de las distintas concentraciones empleadas de tintura de *Ht* no produjeron modificaciones en el tono basal intestinal (Figura 33c).

La tintura de *Ht* indujo una disminución leve del efecto máximo sobre la curva concentración respuesta de carbacol en intestino aislado de rata. Esta caída en el efecto máximo fue sólo estadísticamente significativa durante las primeras concentraciones del agonista adicionado a la cuba y en presencia de la mayor concentración de *HtT* utilizada (8 mg de droga seca/ml) (pD2=  $6.67 \pm 0.17$ ; n= 9) (Figura 33a).

Dado que el efecto inhibitorio de *HtT* fue escaso, no es posible calcular la CI50 de este extracto. Sin embargo, calculamos la concentración inhibitoria al 25% (CI25) del efecto máximo producido en el intestino aislado, cuyo valor es de  $3.15 \pm 0.86$  mg/ml (Figura 33b).

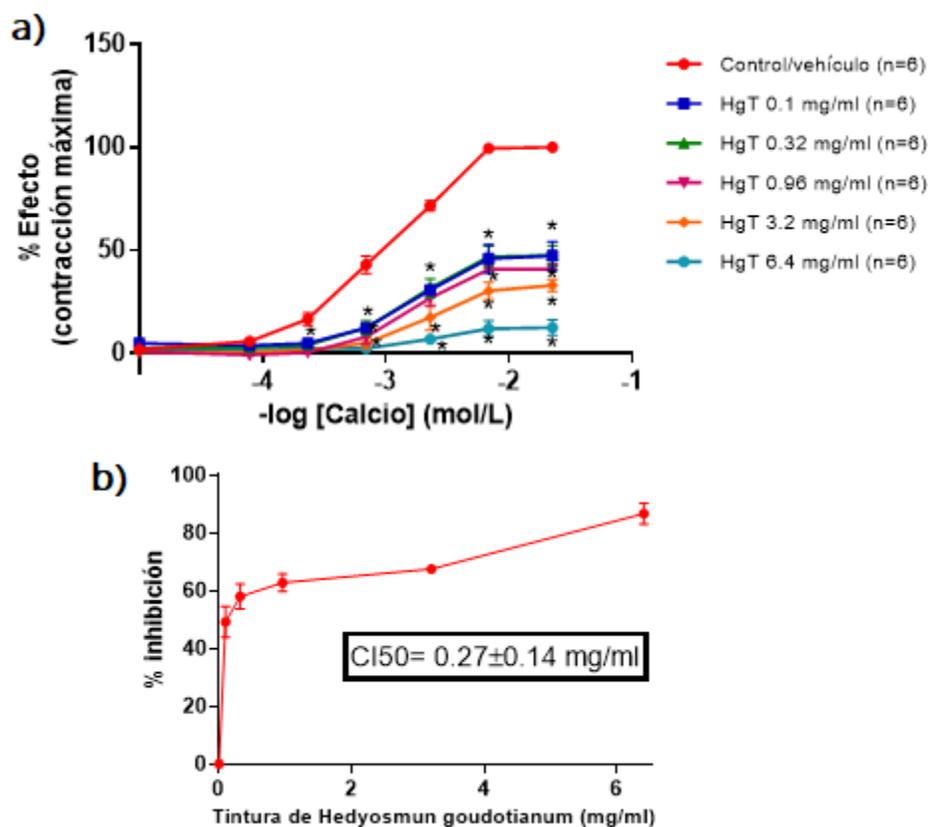
Se realizó una CCR de carbacol en presencia del vehículo etanólico (n= 9) y no se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje del efecto máximo de contracción en presencia o ausencia del vehículo.



**Figura 33:** a) curva concentración respuesta de carbacol en ausencia y presencia de la tintura de *H. translucidum* (n= 6). ANOVA de dos vías: Por tratamiento:  $F(5,329)= 9.593$ ,  $p<0.0001$ ; Por tiempo:  $F(6,329)= 25.5$ ,  $p<0.001$ . Pos-test Tukey: \* $p<0.05$ ; b) cálculo de la concentración inhibitoria 25% (CI25) de la tintura de *H. translucidum*; c) registro original de CCR carbacol, la flecha indica la adición directa de 4.8 mg droga seca/ ml de cuba de *H.T.*

### 4.3.1.3 Efectos de *H. goudotianum* sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de Calcio

Con el objetivo de analizar si el extracto hidroalcohólico podría ejercer efecto antiespasmódico por actuar como inhibidor del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  en músculo liso gastrointestinal, se realizaron CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  en medio despolarizante de alto  $\text{K}^+$  con distintas concentraciones (0.1, 0.32, 0.96, 3.2, 6.4 mg hoja seca/ml de tintura). Todas las concentraciones de tintura empleadas inhibieron estadísticamente significativa las CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{pD}_2 = 3.06 \pm 0.04$ ), en forma no competitiva, dado que disminuyen el efecto máximo alcanzado por calcio (Figura 34a).



**Figura 34:** a) curva concentración respuesta de calcio en ausencia y presencia de la tintura de *H. goudotianum* (n= 6). ANOVA de dos vías: Por tratamiento:  $F(5,154) = 180.8$ ,  $p < 0.0001$ ; Por tiempo:  $F(6,154) = 270.3$ ;  $p < 0.0001$ . Pos-test Tukey: \* $p < 0.001$ ; b) cálculo de la concentración inhibitoria 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) de la tintura de *H. goudotianum*.

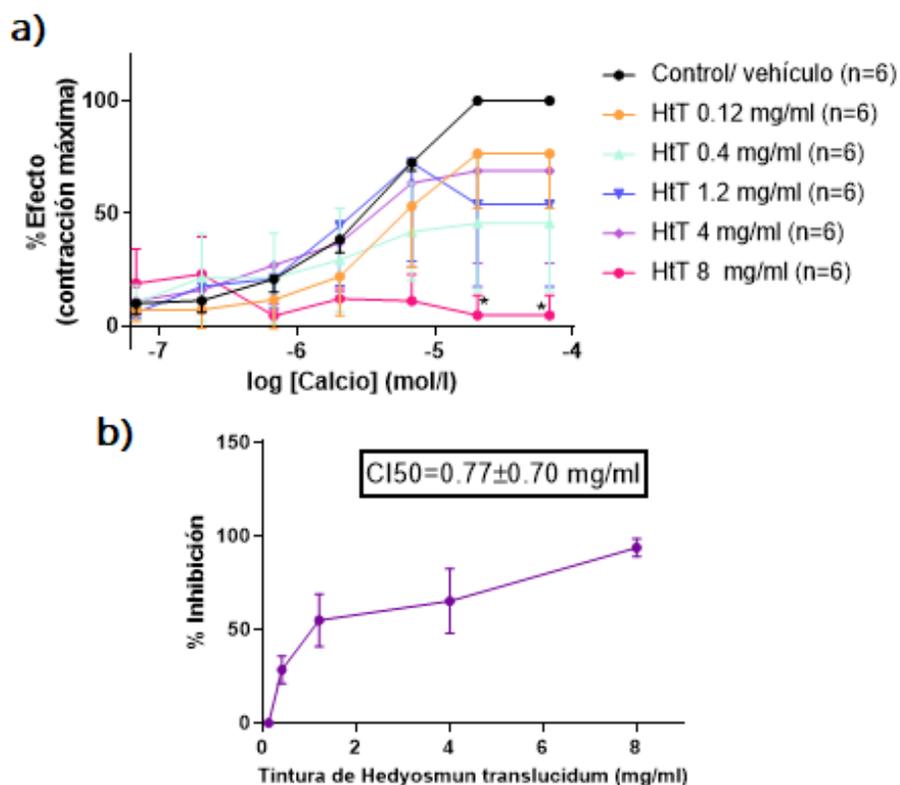
En todos los casos se realizó una CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia del vehículo etanólico. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de efecto máximo de contracción en presencia o ausencia del vehículo.

La tintura de *H. goudotianum* logró una inhibición de la curva de calcio con una CI50 de  $0.27 \pm 0.14$  mg/ml (Figura 34b).

#### **4.3.1.4 Efectos de *H. translucidum* sobre las curvas concentración respuesta (CCR) de Calcio**

Por su parte, la tintura de *Ht* también disminuyó el efecto máximo de la curva concentración respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$ , de manera concentración dependiente, con un efecto máximo a la concentración 8 mg/ml (pD2 de calcio=  $5.54 \pm 0.07$ , n= 6). En todos los casos se realizó una CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de vehículo etanólico (Figura 35a). No se evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de efecto máximo de contracción en presencia o ausencia del vehículo.

La tintura de *H. translucidum* indujo la inhibición de la curva de calcio con una concentración inhibitoria al 50% (CI50) del efecto máximo de  $0.77 \pm 0.70$  mg/ml (n= 6) (Figura 35b).



**Figura 35:** a) curva concentración respuesta de calcio en ausencia y presencia de la tintura de *H. translucidum* (n= 6). ANOVA de dos vías: Por tratamiento:  $F(5,168)= 2.820$ ,  $p<0.0179$ . Por tiempo:  $F(6,158)= 6.125$ ;  $p<0.0001$ . Pos-test Tukey  $*p<0.05$ ; b) cálculo de la concentración inhibitoria 50% (CI50) de la tintura de *H. translucidum*.

#### 4.3.2 Efectos sobre la actividad central en ratones de los extractos acuosos (infusión 5%) de *H. goudotianum* y *H. translucidum*.

##### 4.3.2.1 Efectos sobre la movilidad espontánea y enderezamientos

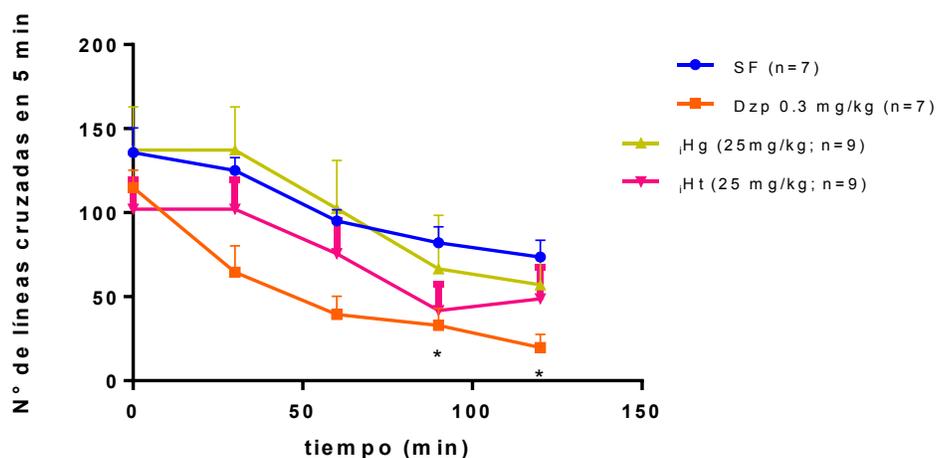
###### 4.3.2.1.1 Test de campo abierto

Para estudiar los efectos centrales de ambas especies de *Hedyosmun* se utilizaron los extractos acuosos (infusión de las hojas al 5% p/v) con el fin de evitar un sesgo debido a los efectos propios del etanol sobre el comportamiento de los ratones (Persyn *et al.*, 2018).

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros evaluados en este test durante los cinco minutos de control previo a la administración de las drogas, por lo cual los ratones fueron divididos al azar para la aplicación de los grupos a ensayar.

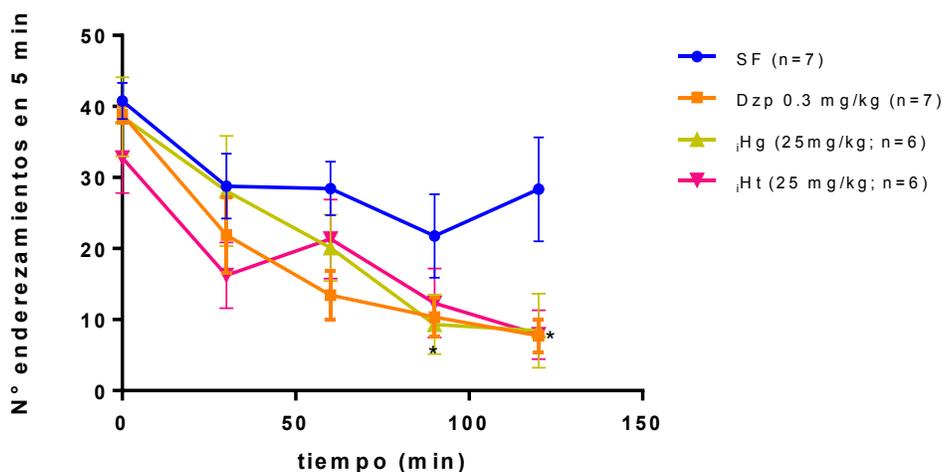
Las infusiones de *Hg* y *Ht* no modificaron significativamente el número de líneas cruzadas con respecto al control negativo (solución fisiológica) durante el tiempo total de duración del experimento, a diferencia de los ratones tratados con diazepam (control positivo) en donde disminuyó el número de líneas cruzadas a los 90 y 120 minutos del ensayo (Figura 36).

La disminución significativa del número de líneas cruzadas ocasionada por diazepam (benzodiacepina de síntesis) a dosis de 1 mg/kg, nos permite validar este test dado que muestra el efecto sedante de esta droga (Figura 36).



**Figura 36:** Efecto de las infusiones de *H. goudotianum* y *H. translucidum* sobre la movilidad espontánea de ratones en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vías. Por tratamiento:  $F(3,140)= 6.682$ ;  $P= 0.0003$ . Por tiempo:  $F(3,140)= 10.78$ ;  $p<0.0001$ . Test a posteriori: Tukey  $*p<0.05$  vs SF.

Los extractos *iHg* e *iHt* a dosis de 25 mg/kg disminuyeron significativamente el número de enderezamientos con respecto a la solución fisiológica, a los 90 minutos para *H. goudotianum* y 120 minutos para *H. translucidum*, de forma similar a diazepam (Figura 37).



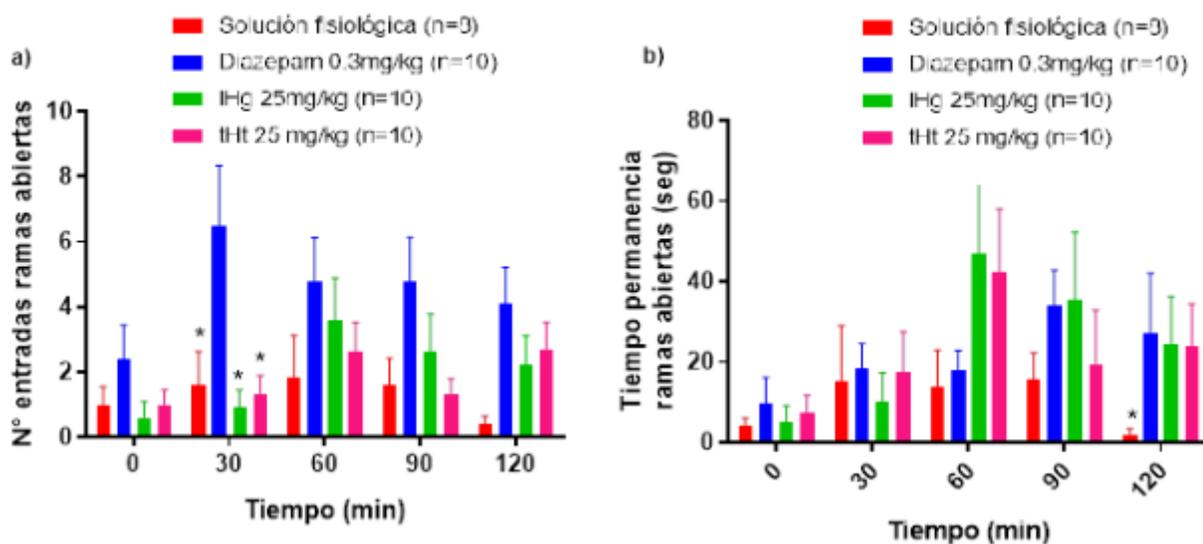
**Figura 37:** Efecto de las infusiones de *H. goudotianum* y *H. translucidum* sobre el número de enderezamientos en el test de campo abierto. Test ANOVA de dos vías. Por tratamiento:  $F(3,170)= 6.521$ ;  $P=0.0003$ . Por tiempo:  $F(4, 170)= 18.62$ ;  $P<0.0001$ . Test a posteriori: Tukey \* $p<0.05$  vs SF.

#### 4.3.2.2 Efectos de las infusiones al 5% p/v de *H. goudotianum* y *H. translucidum* sobre la ansiolisis en ratones

##### 4.3.2.2.1 Test de laberinto en cruz elevado

Con el objetivo de evaluar la actividad ansiolítica de las infusiones de *H. goudotianum* y *H. translucidum* se utilizó el test de laberinto en cruz elevado. Para ello se administraron en forma intraperitoneal *iHg* e *iHt* a dosis de 25 mg/kg, y se realizaron las mediciones correspondientes cada 30 min. Como se describió en el inciso 3.5.3.3.2 de la sección Materiales y métodos de esta tesis.

Previo a la realización de la experiencia, los ratones fueron sometidos al test durante 5 minutos donde se evaluaron todos los parámetros a medir. Encontramos que los ratones no mostraron comportamiento diferente entre ellos, con lo cual fueron sometidos al test en grupos formados aleatoriamente. Los resultados obtenidos en se muestran en las siguientes figuras:

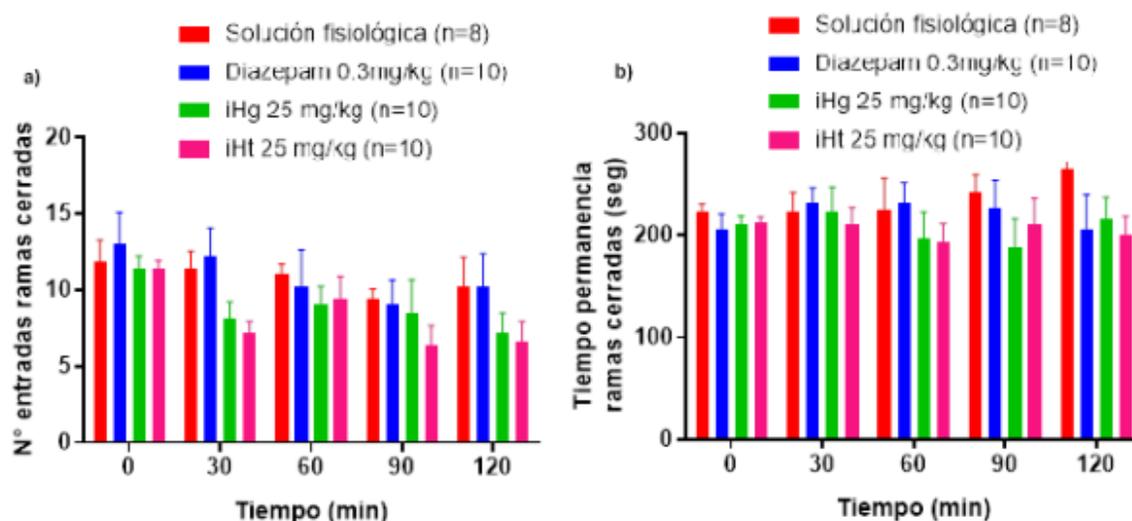


**Figura 38:** a) número de entradas y b) tiempo de permanencia en las ramas abiertas durante 5 minutos. ANOVA de dos vías: (a) Por tratamiento:  $F(4,155) = 1.655$ ,  $p < 0.0001$ . Por tiempo:  $F(3,155) = 9.540$ ,  $P = 0.1633$ . Test a posteriori t-test:  $*p < 0.05$  vs Dzp; (b) Por tratamiento:  $F(4,127) = 1.891$ ,  $P = 0.1161$ . Por tiempo:  $F(3,127) = 0.9627$ ,  $P = 0.4126$ , Test a posteriori t-test:  $*p < 0.05$  vs Dzp.

En este test se evidenció una caída significativa en el número de entradas en las ramas abiertas tanto para el grupo con solución fisiológica como para los grupos de ratones tratados con iHg e iHt a dosis de 25 mg/kg en comparación con Dzp a los 30 minutos del experimento (Figura 38a).

Sin embargo, a los 120 minutos, los ratones tratados con las infusiones de *Hg*, *Ht* y *Dzp* permanecen en las ramas abiertas un tiempo significativamente mayor que en los tratados con solución fisiológica, mostrando un efecto ansiolítico de ambas infusiones a este tiempo (Figura 38b).

Las infusiones de *Hg* y *Ht* no mostraron diferencias ni en el número de entradas ni en el tiempo de permanencia en las ramas cerradas (Figura 39 a y b).

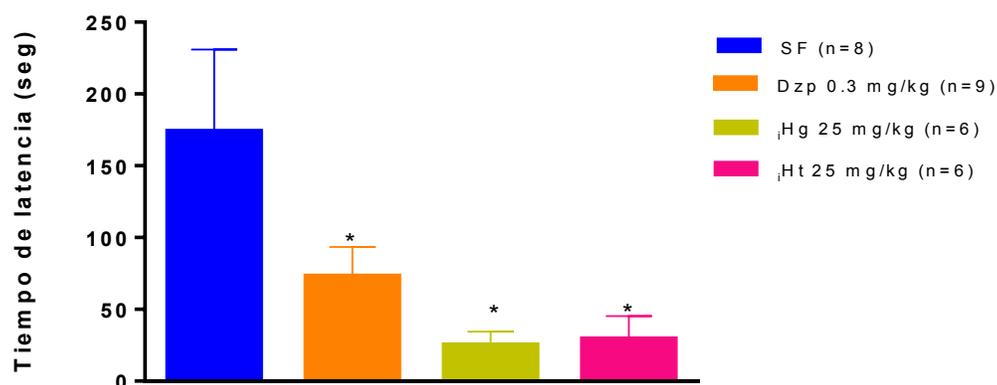


**Figura 39:** a) número de entradas y b) tiempo de permanencia en las ramas cerradas durante 5 minutos. ANOVA de dos vías: (a) Por tratamiento:  $F(3,130)= 4.089$ ,  $P= 0.0089$ . Por tiempo:  $F(4,130)= 3.521$ ,  $P=0.0092$ . Test a posteriori t-test: NS vs *Dzp*; (b) Por tratamiento:  $F(3,130)= 1.729$ ,  $P= 0.1643$ . Por tiempo:  $F(4,130)= 0.1964$ ,  $P= 0.9399$ . Test a posteriori t-test: NS vs *Dzp*.

#### 4.3.2.2.2 Test de supresión de alimento

Los ratones tratados con inyección intraperitoneal de *iHg* e *iHt* a dosis de 25 mg/kg disminuyeron significativamente el tiempo de latencia para comer (Figura 40). Además, este efecto fue más marcado que el control positivo utilizado como ansiolítico: diazepam. La dosis

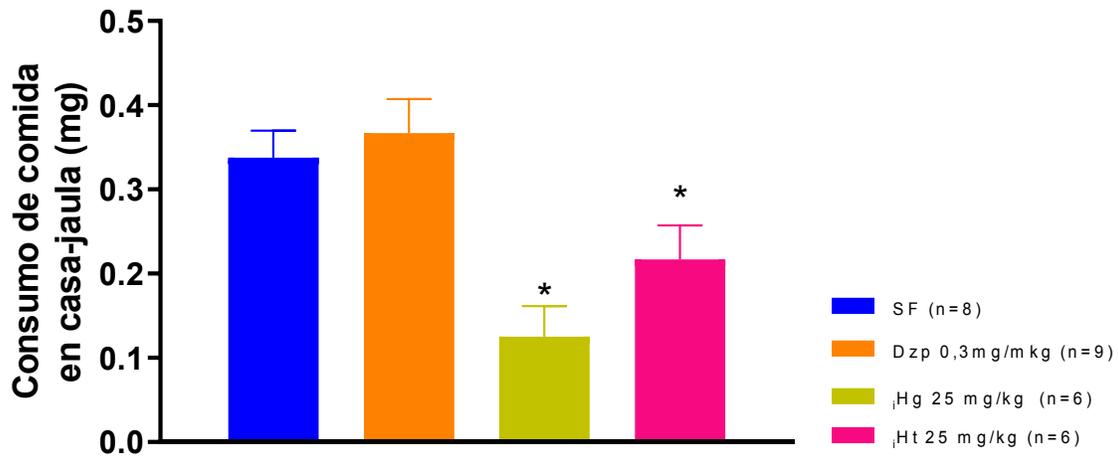
ansiolítica de diazepam 0.3 mg/kg disminuyó significativamente el tiempo de latencia para iniciar a comer del ratón tratado con respecto a la solución fisiológica, dando validez al test empleado para medir actividad ansiolítica.



**Figura 40:** Efecto en el tiempo de latencia para comer (seg.) de las infusiones de *Hg* y *Ht*. Test ANOVA de una vía.  $F(1,255,12.55)=42.79$ ;  $p < 0.00013$ . Test a posteriori: Tukey  $*p < 0.05$  vs SF.

Teniendo en cuenta que la menor latencia para comer muestra un menor estado de ansiedad en el ratón, estos resultados sugieren que las infusiones de las hojas de *Hg* y *Ht* muestran un efecto ansiolítico en el test de supresión de alimento.

Por otra parte, el uso de diazepam no mostró diferencias significativas en cuanto a la cantidad de alimento ingerido por los ratones, a diferencia de las *iHg* e *iHt* que disminuyeron significativamente este parámetro comparado con el grupo control (SF) (Figura 41). Estos datos sugieren que ambas infusiones modifican los estados de apetito de los ratones tratados. En base a esto, nuestro próximo objetivo fue evaluar la capacidad de disminuir el apetito (capacidad anorexígena) de ambas especies a las dosis 25 mg/kg.

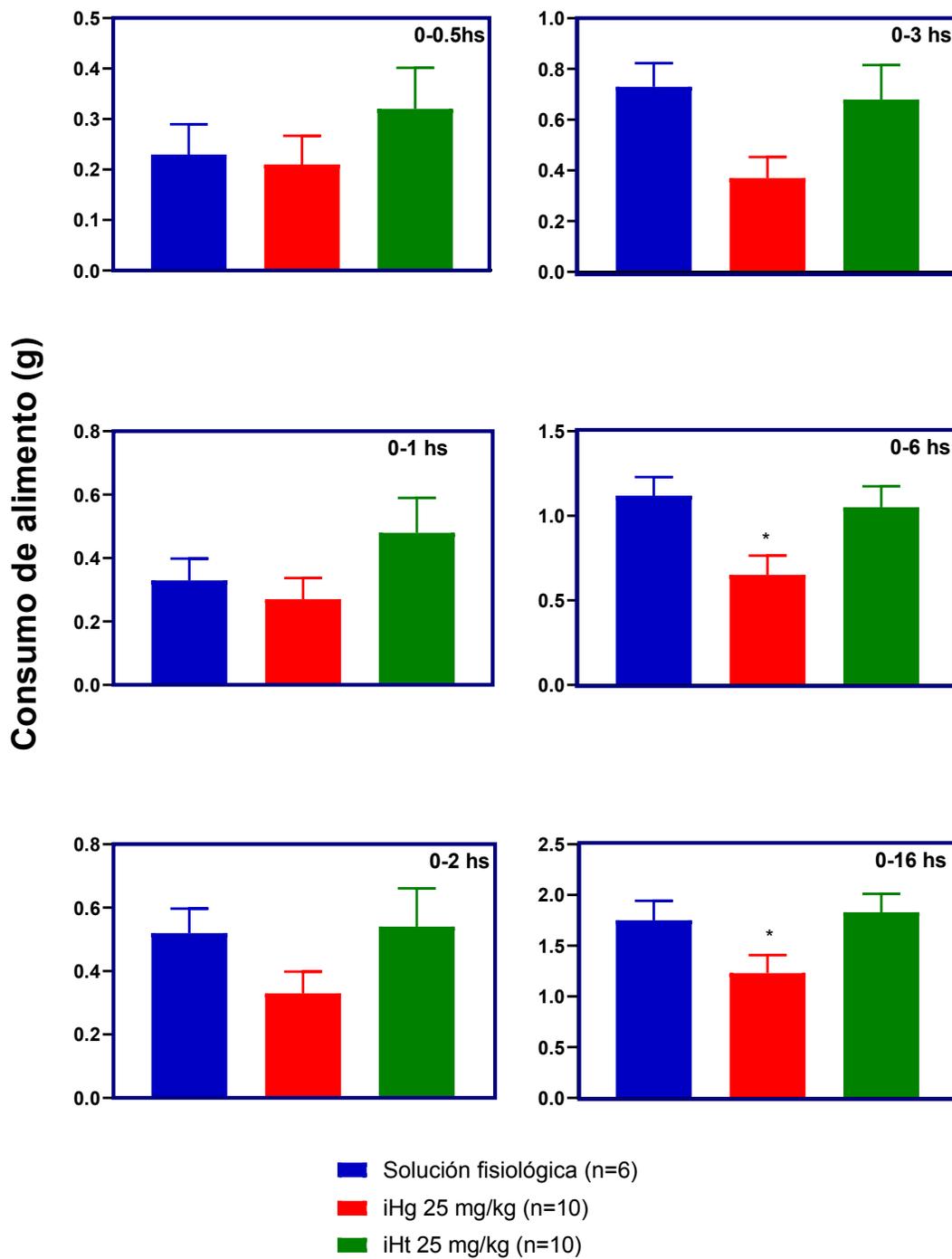


**Figura 41:** Efecto de las infusiones de *Hg* y *Ht* en la cantidad de comida en casa-jaula (mg) durante 5 minutos. Test ANOVA de una vía.  $F(2,428,26.71)=7.454$ ;  $p<0.05$ . Test a posteriori: Tukey  $*p<0.05$  vs SF.

#### 4.3.2.3 Efectos de las infusiones al 5% p/v de *H. goudotianum* y *H. translucidum* sobre la actividad anorexígena en ratones

Previo al ensayo, los ratones fueron cuidadosamente sometidos a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. El consumo de alimento de los ratones tratados con las *iHg* e *iHt* durante el ciclo de alimentación nocturna fueron comparados con ratones tratados con solución fisiológica.

Nuestros resultados muestran una clara diferencia entre ambas especies de *Hedyosmum*. Mientras que a dosis de 25mg/kg de *iHg* disminuyó significativamente el consumo de alimento a las 6 y 16 horas desde el inicio del test en comparación al control (SF), *iHt* a igual dosis no modificó (Figura 42).



**Figura 42:** Cantidad de comida ingerida (g) en forma acumulativa durante 16 horas. ANOVA de dos vías: Por tratamiento:  $F(2,162)= 12.83$ ,  $p<0.0001$ . Por tiempo:  $F(5,162)= 57.44$ ,  $p<0.0001$ . Test a posteriori Tukey \*  $p<0.05$

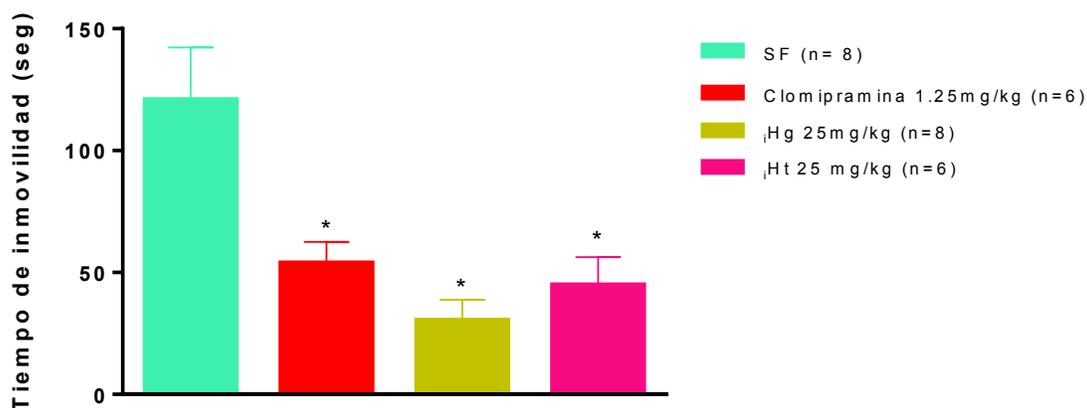
#### 4.3.2.4 Efectos antidepresivos de las infusiones al 5% p/v de *H. goudotianum* y *H. translucidum*

##### 4.3.2.4.1 Test suspensión de cola

El tiempo de inmovilidad fue significativamente reducido por clomipramina (antidepresivo tricíclico) con respecto a la solución fisiológica (SF) (Figura 43), lo que valida este test. El mismo que es ampliamente citado en bibliografía científica (Cryan *et al.*, 2005; Lad *et al.*, 2007).

Por su parte, las *iHg* e *iHt* a dosis de 25mg/kg disminuyeron significativamente el tiempo de inmovilidad de forma similar a clomipramina, mostrando un efecto antidepresivo de ambas infusiones a las dosis ensayadas (Figura 43).

La caída en el tiempo de inmovilidad fue levemente más marcada en los ratones tratados con infusión de *Hg*, sin embargo, a 25 mg/kg de infusión no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambas especies de *Hedyosmum*.



**Figura 43:** Efecto de las infusiones de *Hg* y *Ht* en el tiempo de inmovilidad en segundos. Test ANOVA de una vía.  $F(3,25) = 8.4989$ ;  $P = 0.0005$ . Test a posteriori: Tukey  $*p < 0.05$  vs SF.

## **5. DISCUSIÓN**

La gran variedad de usos ancestrales reportados para las especies del género *Hedyosmum* y la falta de información científica complementaria, resalta la importancia de su estudio. Dentro de los principales usos citados es coincidente la preparación de aguas aromáticas a partir de la infusión de las hojas de casi todas las especies de este género, consumidas frecuentemente en muchas localidades, sustituyendo bebidas como el té o el café. Las propiedades medicinales se encuentran ligadas principalmente a aliviar problemas estomacales, del sistema nervioso central y para tratar afecciones de los huesos (Macbride, 1937; Ames, 1949; Gupta, 2006; De la Torre *et al.*, 2008; Kirchner *et al.*, 2010; IUCN, 2019).

En el presente trabajo se estudiaron *Hedyosmum goudotianum* (Hg) y *Hedyosmum translucidum* (Ht) contribuyendo a ampliar el conocimiento de las mismas, desde el punto de vista botánico, al estudiar la anatomía foliar y farmacológico, comprobando sus propiedades medicinales antiespasmódicas y a nivel del sistema nervioso central.

Cabe recalcar que tanto estudios anatómicos como farmacológicos de estas dos especies son escasos. En las monografías publicadas por Todzia (1988), Todzia & Keating (1991) sobre la revisión morfo-anatómica del género constan algunas características anatómicas de *H. goudotianum* y *H. translucidum*, no existiendo más documentos actuales hasta la fecha para las dos especies; sobre una revisión bibliográfica de estudios farmacológicos que avalen las propiedades medicinales ancestrales registradas (Ames, 1949; De la Torre *et al.*, 2008; Caycedo *et al.*, 2011; Zamora & Perdomo, 2016), para las dos especies no se encontró ningún estudio.

## 5.1 Estudios anatómicos

El valor de los caracteres anatómicos refuerza la diferenciación taxonómica entre las especies de la familia Chloranthaceae (Metcalfé & Chalk, 1950). Existe una dificultad al establecer diferencias morfológicas claras que permitan la distinción entre los taxa del género *Hedyosmum*, en especial si se encuentran en su estado infértil (Todzia, 1988). La estructura anatómica permite establecer caracteres más específicos de las especies, pudiendo servir como guía en la identificación de vegetales o incluso como marcadores de la especie en materia de control de calidad de productos de origen vegetal, en donde es indispensable formar una base formal que permita identificar el material que, en la mayoría de los casos, se encuentra como materia fragmentada o pulverizada (González & Casares, 1996; Spegazzini, 2007).

Muchas características anatómicas se comparten entre las especies *H. goudotianum* y *H. translucidum*. Kong (2001) detalla, en vista frontal, que las células epidérmicas de la familia Chloranthaceae son usualmente poligonales o irregulares; las células de la epidermis de *Hg* y *Ht* son de forma poligonal con paredes anticlinales rectas, esta última característica coincide con la última de las tres clasificaciones que establece el autor sobre el patrón anticlinal encontrado para la familia: ondulado, sinuoso o recto-arqueado.

Metcalfé & Chalk (1950), Eklund *et al.* (2004) y Machado (2004) indican que una ornamentación cuticular puede ser utilizada como carácter de valor diagnóstico para separar especies, en este caso en *Hg* y *Ht* se observó la misma característica, una cutícula evidentemente gruesa con la presencia de estrías cuticulares radiadas. Conspicuas células silicificadas dispersas por toda la epidermis tanto del haz como del envés también son

observadas en el género *Hedyosmum* por Metcalfe & Chalk (1950); es frecuente encontrar en ambas caras de la epidermis la presencia de sílice restringido a los ángulos Occhioni (1954) o incrustada en toda la pared de las células epidérmicas adyacentes de *Hedyosmum brasiliense* (Machado, 2004). Estas células silicificadas se encontraron frecuentemente dispersas en la epidermis adaxial y abaxial de *H. goudotianum* y *H. translucidum*.

Para los géneros *Hedyosmum* y *Ascarina* de la familia Chloranthaceae, Swamy (1953) y Todzia (1993) describen en sección transversal una epidermis adaxial unistrata con células cuadradas a rectangulares y por debajo de ésta una capa de hipodermis, que para ciertas especies se encuentra restringida sólo a las venas. Las dos especies estudiadas *H. goudotianum* y *H. translucidum* presentan una hipodermis situada debajo de la epidermis superior, esta capa de hipodermis es discontinua, sin embargo, no es posible afirmar que la disposición se encuentra restringida sólo a las venas superiores e inferiores, ya que sería indispensable analizar un mayor número de individuos. Todzia (1988), detalla que para *Hedyosmum translucidum* existe una segunda capa de hipodermis ligada sólo debajo de las nervaduras, en este estudio no se observó una segunda capa de hipodermis en *Ht*.

Los estomas son evidencia de valores taxonómicos y sistemáticos tanto en plantas vivas como en fósiles (Upchurch, 1984<sub>a, b</sub>; Kong, 2001) y también pueden jugar un rol significativo en enmarcar hipótesis acerca de la evolución de las angiospermas (Upchurch, 1984<sub>a, b</sub>). *H. goudotianum* y *H. translucidum* presentan hojas hipoestomáticas con estomas confinados sólo a la epidermis abaxial, lo que concuerda con Metcalfe & Chalk (1950), Todzia (1988), Todzia & Keating (1991) y Kong (2001).

De acuerdo al tipo de estomas Metcalfe & Chalk (1950) clasificaron a Chloranthaceae dentro de las familias con estomas de “tipo especial”, estomas rodeados por varias células

epidérmicas organizadas; décadas después, Swamy (1953) describe la misma característica para los géneros *Ascarina* y *Hedyosmum*; Baranova en el año 1983, establece la posibilidad de formalizar esta clasificación, ya que este tipo de estomas también están presentes en otras familias, y no han sido referidos aún a ningún tipo descrito, nombrándolos como estomas de tipo laterocíticos, definidos como “estomas flanqueados por 3 o más células subsidiarias, todas bordeando los lados laterales del par de células guarda; paredes anticlinales que separan las células subsidiarias adyacentes que irradian el par de células guarda” (Baranova, 1983).

El tipo de estomas de *H. goudotianum* y *H. translucidum* de acuerdo a la clasificación de Baranova (1983), responden al tipo laterocíticos, con 4 a 6 células subsidiarias que rodean al estoma formando una roseta, los mismos encontrados también en la especie *H. brasiliense* (Zaniolo *et al.*, 2001). En los cuatro géneros de la familia Chloranthaceae la cutícula es excesivamente gruesa alrededor de la apertura estomática hasta desarrollar un vestíbulo con bordes sobresalientes (Swamy, 1953; Todzia, 1993; Kong, 2001), lo cual fue observado en los estomas de las dos especies analizadas.

Mesófilo dorsiventral, con un parénquima de empalizada que no está representado por un tejido típico de células alargadas, sino por células cortas poco diferenciadas, es la característica descrita para la familia Chloranthaceae (Metcalf & Chalk, 1950; Swamy, 1953; Todzia, 1993; Zaniolo *et al.*, 2001; Zaniolo, 2002). En concordancia con los autores *H. goudotianum* y *H. translucidum* se describen con un parénquima en empalizada atípico hacia la cara adaxial, seguido de un parénquima esponjoso (Metcalf & Chalk, 1950).

El resultado de las descripciones anatómicas del género *Hedyosmum* (Metcalf & Chalk, 1950; Todzia, 1988; Todzia & Keating, 1991; Zaniolo *et al.*, 2001; Machado, 2004) detallan la importancia del tejido de sostén, referido a las esclereidas como posible carácter

diferencial entre especies. Todzia (1988), basándose en el estudio de un total de 40 especies del género *Hedyosmum* explica que los varios tipos de esclereidas son útiles taxonómicamente, reporta la presencia de esclereidas aisladas o agrupadas dispersas por el mesófilo y la epidermis y establece tres tipos: a) braquiesclereidas dispersas por el mesófilo sin ningún patrón en particular, solas o formando grupos de hasta seis; b) esclereidas irregularmente ramificadas; y c) una combinación entre braquiesclereidas y esclereidas ramificadas. Todos estos tipos de esclereidas fueron encontradas en las especies *H. goudotianum* y *H. translucidum*; sin embargo, para esta última especie se observó una característica evidente que permite la diferenciación entre los dos taxa analizados, que es la disposición de macroesclereidas que se encuentran dispuestas paralelamente a ambas caras de la epidermis y dispersas por todo el mesófilo, marcando un patrón claro, característica no encontrada en *H. goudotianum*. Metcalfe & Chalk (1950) describen también la presencia de células parenquimáticas esclerificadas presentes en la familia Chloranthaceae, células también encontradas en las dos especies estudiadas, solas o formando grupos.

La presencia de células secretoras esféricas con contenido oleoso dispersas en el mesófilo se cita para la familia Chloranthaceae (Metcalf & Chalk, 1950; Swamy, 1953; Zaniolo *et al.*, 2001; Machado, 2004), que también pueden ocurrir en la corteza joven y apéndices florales. La distribución de estas células secretoras sirve como valor diagnóstico para el género *Hedyosmum* (Todzia, 1993). En *H. goudotianum* y *H. translucidum* se observaron células de forma esférica y con contenido de color amarillo-marrón dispersas por el mesófilo.

Las cavidades presentes en la vena media de las hojas de *H. goudotianum* y *H. translucidum*, coinciden con el reporte de los autores, Metcalfe & Chalk (1950), Swamy

(1953), Todzia (1993), Zaniolo y colaboradores (2001) y Machado (2004), quienes hablan de canales esquizógenos localizados en la mitad de la nervadura media tanto para el género como para la familia; en las dos especies estudiadas el número de estos canales fue variable al igual que el tamaño de los mismos. La presencia de microcristales en la epidermis, mesófilo, colénquima también son descritos para la familia Chloranthaceae (Metcalfé & Chalk, 1950; Zaniolo *et al.*, 2001).

Según Todzia & Keating (1991) y Todzia (1993), los dientes son uno de los principales elementos de diferenciación de las especies de *Hedyosmum*. En 1975, Hickey & Wolfe, clasifican los dientes de la familia Chloranthaceae como de “tipo chlorantoide”: diente con ápice glandular, vascularizado por una vena media y laterales accesorias (Hickey & Wolf, 1975), en la actualidad se describen como más variables; Todzia (1988) y Todzia & Keating (1991) describen tres distintos tipos de dientes, que a su vez se subdividen, considerando pequeñas variaciones dentro de cada tipo: 1) diente simétrico ancho con la vena media usualmente surgiendo de una vena secundaria y situada entre dos pequeñas venas colaterales que convergen y terminan en una punta glandular hidatoda; 2) diente fuertemente curvado entre el extremo distal de la hoja, con el ápice orientado muy cerradamente al margen distal del sinus; 3) diente de tipo esclerótico con una prominente punta densamente esclerotizada, vascularizado por una prominente vena media con 0 a 2 venas laterales convergiendo bien adentro del margen de la hoja.

Todzia & Keating (1991) citan las especies *H. goudotianum* y *H. translucidum* con el tercer tipo de diente; en el presente trabajo en concordancia con los autores, se describen las dos especies con dientes densamente esclerotizados. Zaniolo *et al.* (2001) y Zaniolo (2002) en la descripción de *Hedyosmum brasiliense* reporta la presencia de hidátodos, de

acuerdo a nuestras observaciones los hidátodos sólo se pudieron encontrar en la especie *H. goudotianum*, observándose un conjunto de grandes estomas dispersos sobre la base de los dientes tanto en el haz como envés de la lámina, presentando una característica diferenciable entre las dos especies en estudio.

Pecíolo caracterizado por dos expansiones laterales en la cara adaxial, con presencia de ductos secretores de mucílagos, se describe para las especies *H. brasiliense* y *H. arborescens* (Swamy, 1953; Occhioni, 1954; Zaniolo *et al.*, 2001; Machado, 2004), en el pecíolo de las especies en estudio se observan evidentes cavidades secretoras esquizógenas de diferente tamaño, sin embargo, es necesario realizar estudios para determinar las sustancias de secreción. Metcalfe & Chalk (1950) describen en la familia Chloranthaceae que los haces vasculares se disponen formando una curvatura contraria a la cara adaxial, células pétreas solitarias y en pequeños grupos dispersas por todo el tejido parenquimatoso del pecíolo. Todas estas características coincidentes con las observadas en el pecíolo de *H. goudotianum* y *H. translucidum*, además de la presencia de células parenquimáticas esclerificadas en grupos o aisladas, microcristales dispersos por todo el tejido.

## **5.2 Estudios fitoquímicos de *Hedyosmum translucidum***

Si bien, en bibliografía, existen diversos estudios fitoquímicos sobre la caracterización química del aceite esencial de muchas especies de *Hedyosmum*, son escasos los estudios similares de otros extractos como etanólico, acuoso (Cong-Mei *et al.*, 2008; Radice *et al.*, 2019). Dado que en la medicina popular la forma de preparación de casi todas las especies

del género es como tintura o infusión de sus hojas, resulta interesante y necesario contar con un perfil fitoquímico de este tipo de extractos en las especies de *Hedyosmum* estudiadas en esta tesis.

Por otra parte, es importante destacar que los flavonoides, son el grupo fitoquímico al cual le atribuyen la gran mayoría de las actividades biológicas de las especies de la familia Chloranthaceae (Cong-Mei *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2016), por lo que su caracterización es de sumo interés.

Dentro del género *Hedyosmum* se ha reportado la presencia de flavonoides (Kaempferol como uno de los más comunes), aldehídos fenólicos (vanilina), aldehído protocatéquico, cumarinas (escopoletina) (Radice *et al.*, 2019). En particular, en el extracto de acetato de etilo de *H. brasiliense* se describen la presencia de compuestos como ácido rosmarínico (considerado el principal componente), rosmarinato de etilo, kaempferol, oresbiusina A, ácido vanílico y aldehído protocatéquico; de la fracción acuosa: kaempferol-3 $\beta$ -o-glucuronideo, ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico y escopoletina (Sagoe, 2015).

Mediante las pruebas realizadas en esta tesis mostramos la presencia de flavonoides en los extractos ensayados: hidroalcohólico, hexánico, de acetado de etilo y acuoso de *H. translucidum*; evidenciando la presencia de apigenina en el extracto de acetato de etilo de *Ht*. Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de determinaciones utilizando técnicas más específicas (HPLC) para comprobar la presencia de apigenina en otros extractos, y además el perfil de flavonoides presentes en las hojas de *Ht*.

Por otra parte, es de nuestro interés realizar estudios similares en los extractos de *Hg* que nos permitan comparar la composición fitoquímica de ambas especies, y estudiar así la posibilidad de atribuir las propiedades farmacológicas estudiadas a alguno de los componentes presentes.

### **5.3 Estudios farmacológicos**

Los estudios farmacológicos efectuados en esta tesis tienen como objetivo fundamental realizar un screening de actividades en distintos sistemas biológicos, con el fin de ser utilizados como punto de partida en el estudio más profundo de las propiedades farmacológicas y los posibles efectos adversos de ambas especies de *Hedyosmum*. Además, los resultados obtenidos nos permiten evidenciar posibles diferencias o similitudes en las actividades evaluadas entre *H. goudotianum* y *H. translucidum*. Esta información en conjunto con la correcta identificación botánica servirá no sólo para futuras investigaciones, sino también contribuirán al uso adecuado de las mismas en las comunidades en las cuales son utilizadas.

Es de radical importancia probar, en los test en donde los resultados son promisorios, otras preparaciones y otras dosis de *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum*. Si bien, sólo es el principio de este estudio, los resultados son muy valiosos y prometedores y aportarán al conocimiento de actividades que no han sido estudiadas hasta la actualidad.

### **5.3.1 Estudio del efecto de la tintura de *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum* sobre el músculo liso gastrointestinal.**

Toda aquella sustancia pura o en preparación que produzca la relajación del músculo liso gastrointestinal posee propiedades antiespasmódicas (Goodman & Gillman, 2016) incluyendo en este grupo de sustancias a las hierbas medicinales. Las plantas medicinales han sido ampliamente utilizadas por nuestros ancestros para disminuir el dolor producido por los calambres o espasmos abdominales (Alonso & Desmarchelier, 2005), de hecho, muchas plantas medicinales de Latinoamérica son citadas en bibliografía donde se utilizan folclóricamente con este fin (Gattuso, 2013).

Si bien, la mayoría de estas plantas no poseen estudios científicos que avalen su uso como antiespasmódico, diversos autores coinciden que el tratamiento para estas dolencias menores del tracto digestivo con preparaciones que contengan plantas medicinales, es de gran importancia debido al bajo costo y al relativo bajo riesgo para la salud, en parte debido a las formas de preparación, en donde los principios activos están en baja concentración (Gattuso, 2013).

Teniendo en cuenta los estudios realizados en el laboratorio de Farmacología (Farmacia - UNLP), la mayoría de las plantas medicinales con actividad antiespasmódica ejercen su efecto relajante del músculo liso intestinal no sólo por la acción de un principio activo aislado, sino por la actividad conjunta de sus compuestos (Ragone *et al.*, 2007; Vanegas, 2019).

En cuanto a los fármacos antiespasmódicos de síntesis, hoy en día se encuentran en el mercado aquellos que tienen como mecanismos de acción principal antagonizar de forma competitiva los receptores muscarínicos o los canales de calcio en el músculo liso intestinal, tales como el bromuro de hioscina (derivado de un alcaloide de origen vegetal) o el bromuro de otilonio, respectivamente (Goodman & Gillman, 2016). También, existe otro grupo de antiespasmódicos, agentes relajantes directos del músculo liso, como la mebeverina, un agente derivado de la papaverina, alcaloide derivado del *Papaver somniferum* (Hani, 2014).

Las plantas medicinales han sido el origen de la mayoría de estos fármacos que en la actualidad se dispensan en forma de medicamento, regulado por tales leyes, con una posología y forma farmacéutica determinada. Si bien la industria farmacéutica tiene un desarrollo constante y eficaz de productos medicinales sintéticos y biológicos, éste hecho no ha disminuido la importancia de las plantas medicinales en muchas sociedades. En contrapartida a esta situación, las naciones industrializadas han ampliado enormemente la demanda de las plantas medicinales y sus productos derivados (Gattuso, 2013). Además, muchos países hacen un gran esfuerzo para lograr la reglamentación de la evaluación de la calidad, la inocuidad y la eficacia de las plantas medicinales, apoyando de esta manera a la medicina popular. Estrategias que en su conjunto implican un gran reconocimiento de la importancia del uso de plantas medicinales en la atención de la salud (Valtueña, 2001).

Como propone la botánica Martha Gattuso en su trabajo “Plantas medicinales en Latinoamérica”, para la sistematización de una puesta en valor de los productos naturales se necesita una posición multidisciplinaria compuesta por un mínimo de cinco eslabones entrelazados entre sí: a) correcta detección e identificación, b) agrotecnología, c) validación

de las propiedades medicinales, d) tecnología fitofarmacéutica y e) uso racional de las plantas medicinales y fitoterapia.

Es importante destacar que cuando se hace referencia a las plantas medicinales como materia prima se hace real hincapié en la calidad de la materia prima, siendo el motivo principal de discusión, la necesidad y dificultad de contar con principios activos identificados o marcadores definidos que permitan autenticar y separar las plantas deseadas de las contaminantes o adulterantes, para lo cual es primordial conocer profundamente su anatomía botánica y su composición (Ocampo & Mora, 2010).

También, ante la necesidad de la industria de contar con un principio activo posible de ser comercializado, una preocupación no menor son las dificultades del abastecimiento. En este punto, las variabilidades geográficas, climatológicas, edáficas y biológicas, y su posible control son fundamentales siendo menos abundante la información en este campo a la actualidad (Ocampo & Mora, 2010). Esta preocupación ha sido el origen de la comparación en cuanto a las propiedades anatómicas y farmacológicas de dos especies del mismo género (*Hedyosmum*) colectadas a distintas alturas (1.500 y 2.100 m s. m.) en un bosque nativo en la localidad de San José de Guarumales, en Ecuador.

Dentro del género *Hedyosmum*, para especies como *H. anisodorum*, *H. arborescens*, *H. scaberrimum* y *H. scabrum* se han reportado propiedades digestivas, antiespasmódicas y para calmar dolores estomacales simples (Radice *et al.*, 2019). Es posible entonces, que las especies *H. goudotianum* y *H. translucidum* también posean estas propiedades, que no han sido comprobadas hasta el momento de forma científica, pero los pobladores del lugar la utilizan con ese fin (De la Torre *et al.*, 2008). Sin embargo, tal como lo expusimos con anterioridad, no hay estudios preclínicos ni clínicos que aborden los efectos de los extractos

de dichas especies sobre el músculo liso gastrointestinal y menos aún la comparación de los posibles efectos entre ellas.

En esta tesis, estudiamos este efecto mediante el uso de curvas concentración respuesta en duodeno e íleon aislado de rata, como se describió previamente en la sección de materiales y métodos 3.5.2 y cuyos resultados fueron mostrados en la correspondiente sección 4.3.1.

En nuestros experimentos mostramos que cuando se añade directamente la tintura al íleon o duodeno aislado de rata, ninguna de las dos tinturas *HgT* y *HtT* disminuye la línea de base del registro de fuerza de contracción, mostrando la ausencia del efecto relajante directo del músculo liso gastrointestinal. Esto nos permite evidenciar la ausencia de una acción agonista  $\beta$ 2- adrenérgico o inhibidor de la fosfodiesterasa (conocidos mecanismos relajantes directos del músculo liso intestinal) (Goodman & Gillman, 2016).

Por su parte, a través de las curvas concentración respuesta, encontramos que ambas tinturas *HgT* y *HtT* disminuyen el efecto máximo de la curva de carbacol, lo que demuestra un efecto antagonista muscarínico no competitivo, es decir, *no bloquean directamente al receptor M3* presentes mayoritariamente en el íleon y duodeno de rata. En ambas especies vegetales este efecto es dependiente de la concentración utilizada.

Si bien, el efecto general es similar, claramente existe una diferencia importante en el porcentaje de inhibición de las CCR de carbacol inducida por cada una de estas especies. Nuestros resultados muestran una inhibición mayor con la tintura de *Hedyosmum goudotianum*. Para *HgT* la caída en el efecto máximo es estadísticamente significativo para todas las concentraciones utilizadas de carbacol en presencia de 6.4 mg de hoja seca/ml de

tintura, mientras que para *HtT* la caída en el efecto máximo es sólo estadísticamente significativa a las tres primeras concentraciones de carbacol cuando la tintura se encuentra en una concentración de 8 mg de hoja seca/ml de tintura.

Esto queda demostrado a partir del cálculo de las concentraciones inhibitorias de ambos extractos, donde para la tintura de *Hedyosmum goudotianum* obtuvimos una CI50 (concentración inhibitoria 50%) =  $3.37 \pm 0.74$  mg/ml, mientras que para la tintura de *Hedyosmum translucidum* no logramos una inhibición de la CCR de carbacol que nos permita el cálculo de la CI50. Para este último caso obtuvimos una CI25 (concentración inhibitoria 25%) =  $3.15 \pm 0.86$  mg/ml.

*Estos resultados sugieren que la tintura de Hedyosmum goudotianum (HgT) posee un efecto más potente que la tintura de Hedyosmum translucidum (HtT) frente a la contractura ocasionada por activación de los receptores muscarínicos, demostrando una clara diferencia entre las especies en la acción antiespasmódica.*

Dado que mediante el uso de curvas concentración respuesta mostramos que la *HgT* y *HtT* actúan como antagonistas no competitivos frente a carbacol, hipotetizamos una posible acción antiespasmódica por bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L del músculo liso. Para probar esta hipótesis realizamos CCR de  $Ca^{2+}$  en ausencia y presencia de distintas concentraciones de tintura, tanto para *H. goudotianum* como para *H. translucidum*. Los resultados obtenidos mostraron un antagonismo no competitivo en las CCR de  $Ca^{2+}$ , sugiriendo la ausencia de un efecto directo a nivel del influjo de calcio. En este caso, *HgT* disminuyó significativamente y en forma concentración dependiente el efecto máximo de la

CCR de  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que *HtT* sólo produjo este efecto a la mayor concentración ensayada (8 mg de hoja seca / ml de tintura).

Este resultado muestra que la tintura de *Hedyosmum translucidum* posee un efecto antiespasmódico poco significativo a las dosis de 0.12, 0.4, 1.2 y 4 mg de hoja seca / ml de tintura, bloqueando casi completamente la contracción inducida por calcio cuando la concentración de tintura es la máxima utilizada (8 mg de hoja seca / ml de tintura).

Por otra parte, la tintura de *Hedyosmum goudotianum* produce una marcada disminución de la contracción del músculo liso gastrointestinal actuando como antagonista no competitivo del carbacol y del calcio. La  $\text{CI}_{50}$  de *HgT* frente a la contracción inducida por carbacol ( $3.37 \pm 0.14$ ,  $n=8$ ) resultó significativamente mayor que la  $\text{CI}_{50}$  de *HgT* sobre la CCR de calcio ( $0.27 \pm 0.14$ ,  $n=6$ ,  $*p<0.05$  Test t:  $t=3.353$ ,  $df=13$ ). Este resultado sugiere que el efecto antiespasmódico de *HgT* involucra una vía más sensible al influjo de calcio, y no tan dependiente de una vía exclusiva de la activación de los receptores muscarínicos.

Existen abundantes reportes en bibliografía que comprueban el efecto relajante de distintos extractos vegetales por un mecanismo bloqueante de los canales de calcio (Ventura-Martínez *et al.*, 2011) e inclusive por mecanismos duales (bloqueo de los receptores muscarínicos y bloqueantes de los canales de calcio) (Mehmood *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2020). Además, se ha demostrado en muchos casos que el efecto relajante del músculo liso en general, ya sea gastrointestinal, traqueal o vesical es debido a la acción de los flavonoides presentes en las preparaciones de distintas plantas medicinales y la capacidad de estos componentes de bloquear los canales de calcio (Nigusse *et al.*, 2019; Zoofisahn *et al.*, 2019).

En trabajos anteriores, en nuestro laboratorio hemos mostrado la actividad antiespasmódica de varias plantas medicinales tales como: *Aloysia citriodora*, *Gomphrena perennis*, *Schinus lentiscifolius*, entre otras; mostrando también un efecto relajante del músculo liso intestinal con similar comportamiento al encontrado para ambas especies de *Hedyosmum* ensayadas en esta tesis (Ragone *et al.*, 2007; Bonilla, 2017; Vanegas, 2019). Blanco y colaboradores (2013), también en nuestro laboratorio mostraron que verapamil, un conocido bloqueante de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  disminuye el efecto máximo en las CCR de  $\text{Ca}^{2+}$  en intestino aislado de rata, los autores sugirieron que el modo de unión del verapamil desde el interior del canal de calcio podría ser la causante de que no se comporte como un típico antagonista competitivo (con corrimiento de la CCR hacia la derecha sin modificar el efecto máximo de respuesta a la contracción) (Blanco *et al.*, 2013). *Tanto las CCR de HgT como las de HtT presentan un comportamiento comparable al encontrado por Blanco y col (2013).*

Existen, además, algunos reportes que muestran la presencia de flavonoides en diferentes especies de *Hedyosmum* y correlacionan las actividades expuestas en la medicina popular de estas plantas medicinales con la presencia de los mismos (Radice *et al.*, 2019). Por otra parte, existe un gran número de trabajos experimentales que prueban que los flavonoides pueden suprimir la contractilidad del músculo liso debido a su habilidad para inhibir el influjo de calcio (Yang *et al.*, 2014; Lanuzza *et al.*, 2017).

Por lo tanto, es posible hipotetizar que *HgT* y *HtT* actúen a nivel del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de manera similar a verapamil. Siendo *HgT* levemente más potente que *HtT* aunque esta tendencia no es estadísticamente significativa ( $\text{CI}_{50} = 0.27 \pm 0.17$  para *HgT* vs  $0.27 \pm 0.17$  para *HtT*,  $n = 6$ , Test t:  $P = 0.5791$ ,  $t = 0.5689$ ,  $\text{df} = 13$ ).

En las pruebas de identificación de flavonoides realizadas en la Cátedra de Farmacognosia hemos mostrado la presencia de este grupo fitoquímico en nuestros extractos y la posible existencia de apigenina en el extracto de acetato de etilo, preparado a partir de las hojas de *Hedyosmum translucidum*, mediante un análisis cromatográfico de flavonoides por cromatografía en capa delgada.

Por lo tanto, podría ser posible que la presencia de flavonoides en la tintura de *Ht* sea responsable en parte de la acción antiespasmódica gastrointestinal de *HtT*. En este aspecto, otros autores mostraron el efecto relajante de apigenina aislada de extractos de *Apium graveolens* sobre la contracción de aorta de rata, concluyendo que el efecto relajante de este flavonoide es debido principalmente a la supresión del influjo de  $Ca^{2+}$  a través de canales de calcio, operados tanto por voltaje como por receptor y no por inhibición de las fosfodiesterasas (PDE) dependientes de cAMP o cGMP (Ko *et al.*, 1991). Por otro lado, en traquea aislada de cobayo el efecto relajante de apigenina podría ser debido a la inhibición de la actividad de ambas PDEs además de la reducción de las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelulares por inhibición del influjo del mismo (Chen & Ko, 2017).

*Es posible entonces que la presencia de flavonoides en la tintura de Ht, dentro de los cuáles podría encontrarse la apigenina sea en parte la responsable del efecto observado en los preparados de duodeno e íleon aislado de rata.*

Por otro lado, nuestros resultados nos permiten desestimar la posibilidad de que el efecto antiespasmódico encontrado sea por inhibición de la PDE dado que no hay relajación directa del tono basal cuando se pone en contacto la tintura y el tejido en la cuba, como se describió anteriormente. Además, estos reportes están de acuerdo con la respuesta frente a

las CCR de calcio obtenida en nuestros experimentos y la similitud con las CCR de verapamil realizada por Blanco y colaboradores (2013).

Frente a estos resultados reafirmamos el interés de confirmar en estudios posteriores no sólo la presencia de apigenina en la muestra de *Hedyosmum translucidum*, sino también realizar estudios fitoquímicos similares con la muestra de *Hedyosmum goudotianum*.

### **5.3.2 Estudio de los efectos de la infusión sobre la conducta de ratones *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum***

Dado que los usos tradicionales más reportados para el género *Hedyosmum* son los asociados a sus propiedades sedativas y antidepresivas (Radice *et al.*, 2019) evaluamos preclínicamente las propiedades sobre la conducta de la infusión al 5% de *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum* a dosis de 25 mg/kg.

Para evaluar la actividad espontánea de los ratones se realizó el test del campo abierto, el cual ha sido utilizado y validado en nuestro laboratorio previamente (Ragone *et al.*, 2007). A través de la evaluación de la locomoción, acicalamientos y enderezamientos de los animales tratados, es posible evaluar los efectos de la sustancia en estudio (Cárdenas & Navarro, 2002).

Debido a que el etanol produce acción depresora del sistema nervioso central (Blednoy *et al.*, 2017; Johnson *et al.*, 2017) y podría distorsionar los posibles efectos producidos por los extractos vegetales en estudio, elegimos realizar el extracto acuoso de *Hg*

y de *Ht* para el estudio de los efectos centrales de ambas plantas medicinales. Por lo tanto, en esta tesis se evaluaron las infusiones de *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum*.

Diazepam (1 mg/kg) disminuyó la movilidad espontánea de manera estadísticamente significativa con respecto a la solución fisiológica. Este resultado valida el test dado que el diazepam es una benzodiazepina con efecto sedante conocido (Goodman & Gillman, 2016). La infusión de ambas especies de *H. goudotianum* y *H. translucidum*, mantuvieron el número de líneas cruzadas similar al grupo control negativo (NS vs SF), a diferencia del diazepam que las redujo como se describió anteriormente (Figura 36). Sin embargo, tanto la infusión de *Hg* como de *Ht* disminuyeron el número de enderezamientos durante 5 minutos de forma similar que diazepam (Figura 37). A pesar de esto, ninguna de las infusiones modificó el número de acicalamiento (no se muestran). *Las infusiones de Hg y Ht no mostraron efectos sedantes dado que no modificaron la movilidad espontánea de ratones, pero disminuyeron su capacidad exploratoria, sin diferencias entre ambas especies a la dosis empleada de 25 mg/kg.*

Por lo tanto, a la dosis estudiada ninguna de las dos especies ensayadas de *Hedyosmum* mostró efecto sedante en el *test de campo abierto* a diferencia de otras especies de *Hedyosmum* como *H. brasiliensis*, Tolardo y col (2010) mostraron que el extracto etanólico obtenido a partir de las hojas de esta especie mostró efecto sedante.

Según datos bibliográficos, sustancias con acción ansiolítica tienden a reducir el número de exploraciones y aumentar el número de líneas cruzadas (Willner, 1991). En nuestro trabajo encontramos, que si bien, no hay diferencia en la movilidad espontánea, existe

una tendencia a aumentar el número de líneas cruzadas sobre todo al inicio del test con la infusión de *Hg* y existe una disminución estadísticamente significativa del número de exploraciones, por lo que es posible que las infusiones de *Hg* y *Ht* tengan un efecto ansiolítico que no ha podido ser evidenciado en el test de campo abierto mediante la evaluación del número de líneas cruzadas.

En primera instancia evaluamos el posible efecto ansiolítico de ambas infusiones mediante el test de supresión del alimento. Este test es un modelo experimental de respuesta incondicionada donde se mide el consumo de alimento en un nuevo ambiente bajo privación previa del mismo, por lo que la reducción del tiempo en que el animal tratado toma contacto con el alimento por primera vez (tiempo de latencia para comer) se interpreta como un comportamiento relacionado con la ansiedad (Bodnoff *et al*, 1988). Tanto *iHg* como *iHt* a dosis de 25 mg/kg disminuyeron significativamente el tiempo de latencia para comer, al igual que Dzp (control positivo, figura 40). *Estos resultados sugieren que las infusiones ensayadas poseen un marcado efecto ansiolítico similar a diazepam.*

Sin embargo, ambas infusiones también disminuyeron drásticamente la cantidad de alimento ingerido en la casa jaula durante 5 minutos pos-test, mientras que diazepam no lo modificó en comparación con la solución fisiológica. La caída en el consumo de alimento inmediatamente posterior al experimento sugiere un posible efecto anorexígeno de los extractos ensayados (Figura 41). Este test de supresión del alimento posee ciertas ventajas dado que es una prueba rápida, sencilla y económica, sin embargo, tiene cierta sensibilidad bidireccional, en cuanto a las manipulaciones de ansiedad y al requerimiento de la privación de alimento (Pellow *et al.*, 1985<sub>a</sub>).

Dado que algunos autores interpretan la reducción del tiempo de latencia para comer en el test de supresión de alimento no sólo como un comportamiento similar a la ansiedad, sino también como un comportamiento relacionado con la depresión (Bodnoff *et al.*, 1988) y puesto que hay antecedentes de actividad ansiolítica y antidepresiva de otra especie de *Hedyosmum*, particularmente el *Hedyosmum brasiliensis* (Goncalves *et al.*, 2012), testeamos las infusiones de *Hg* y *Ht* en el test de suspensión de la cola para evaluar su efecto antidepresivo, y en el test de laberinto en cruz elevado para evaluar su efecto ansiolítico por un método adicional al ya realizado.

El test de laberinto en cruz elevado, es uno de los modelos de respuesta incondicionada más usados en los estudios preclínicos para evaluar la capacidad ansiolítica ya sea de plantas medicinales o de drogas de síntesis, dado que es fácil de realizar, puede automatizarse fácilmente y los resultados son válidos y reproducibles (Walf & Cherly, 2007). En este test se muestra como determinadores de ansiedad la menor entrada en los brazos abiertos, de manera opuesta existe mayor grado de ansiedad cuando la exploración en los brazos cerrados es menor que en los brazos abiertos dado que es el espacio desprotegido por el animal testado y por ende una potencial amenaza (Pellow *et al.*, 1985<sub>b</sub>).

En nuestros experimentos no encontramos diferencias significativas ni en el número de entradas ni en el tiempo de permanencia en las ramas cerradas entre los tratamientos. En cambio, se evidenció un menor número de entradas en las ramas abiertas tanto para el grupo con solución fisiológica como para los grupos de ratones tratados con las infusiones de *Hg* y *Ht* a dosis de 25 mg/kg. Esta caída en el número de entradas y el tiempo de permanencia en ramas abiertas para SF, *Hg* y *Ht* fue estadísticamente significativa en comparación con nuestro control positivo (diazepam). Estos resultados evidencian la ausencia de un efecto

ansiolítico de las infusiones de ambas plantas medicinales a los 30 minutos del experimento. Sin embargo, a partir de la medición a los 60 minutos, las infusiones de *Hg* y *Ht* revierten este efecto, aunque no es significativo el aumento.

En concordancia, a los 120 minutos, los ratones tratados con las infusiones de *Hg* y *Ht* permanecen en las ramas abiertas un tiempo semejante a los ratones tratados con diazepam, el cual es significativamente mayor que en los ratones tratados con solución fisiológica, evidenciando *un efecto ansiolítico similar a diazepam para las especies de Hedyosmum estudiadas.*

Estos resultados son acordes a los efectos encontrados en el test de supresión de alimento, donde los ratones son evaluados a la hora de ser tratados con la inyección peritoneal correspondiente. Es posible entonces que los efectos ansiolíticos no puedan observarse a un tiempo anterior a los 60 minutos desde la administración en ratones.

Por otra parte, trabajos realizados por otros autores donde se evaluó el efecto ansiolítico de diferentes extractos de plantas medicinales y apigenina como uno de sus principales constituyentes mediante el test del laberinto en cruz elevado, han mostrado que es justamente apigenina el compuesto responsable de la acción ansiolítica evidenciada (Kumar & Sharma, 2006). Nuevamente, teniendo en cuenta la posible presencia de apigenina en nuestras muestras de *Hedyosmum translucidum* podríamos postular a dicho flavonoide como responsable al menos en parte de esta acción, sin embargo, es necesario confirmar la presencia de este flavonoide en particular en nuestro extracto y hacer lo propio con el extracto de *Hedyosmum goudotianum*.

Si bien el objetivo del ensayo del test de supresión del alimento fue evaluar un posible efecto ansiolítico de las infusiones, el resultado obtenido con el consumo de alimento es de suma importancia. Un aumento en la cantidad de comida ingerida en la casa-jaula podría ser indicativo de un ratón con mayor apetito, lo que determina un importante sesgo en la determinación del tiempo de latencia del ratón a comer (Jung *et al.*, 2014). Cuando el test es puesto a prueba con un control positivo como es diazepam, la cantidad de comida ingerida en la casa-jaula no varía comparado a la cantidad ingerida por el grupo de ratones tratados con solución fisiológica, mostrando que el menor tiempo de latencia inducido por diazepam está asociado a menor aversión por lo desconocido y no por una acción en el centro del apetito.

En nuestros ensayos, por el contrario, los ratones tratados con *iHg* e *iHt* disminuyeron significativamente la cantidad de comida ingerida en la casa-jaula, siendo este efecto más marcado para la infusión de *Hg* que para *Ht*, este hallazgo podría estar asociado a una reducción del apetito inducido por dichas infusiones. Para comprobar, entonces, la existencia de un posible efecto inhibidor del hambre de las especies de *Hedyosmum* estudiadas en esta tesis, se realizó el test anorexígeno para ambas infusiones en la misma dosis utilizada según lo descrito en Materiales y Métodos de esta tesis (sección 3.5.3.5).

En este test, encontramos una importante diferencia entre ambas especies de *Hedyosmum*, mientras que *iHg* disminuyó el consumo de alimento a todos los tiempos medidos siendo estadísticamente significativa esta diferencia a las 6 y 16 horas, *iHt* no lo modificó, en concordancia con la tendencia observada en el test de supresión de alimento. Estos resultados muestran un *efecto anorexígeno de la infusión de Hg*, efecto que la diferencia de *iHt*.

Para evaluar los efectos antidepresivos de las infusiones de *Hg* y *Ht* utilizamos el test de suspensión de la cola (TST), donde los ratones son suspendidos por sus colas durante 6 minutos y se registra la cantidad de tiempo que pasan inmóviles como medida de la actividad antidepresiva de la sustancia en estudio (Cryan *et al.*, 2005). En este test se espera que las sustancias con actividad antidepresiva disminuyan la inmovilidad en el ratón suspendido. Esta prueba tiene como ventaja la capacidad para detectar un amplio espectro de antidepresivos, es económica, metodológicamente poco sofisticada y puede ser fácilmente automatizada (Cryan & Mombereau, 2004).

Además, si comparamos el TST con el test de natación forzada (FST) también utilizado para evaluar la actividad antidepresiva de una sustancia, el TST evita cualquier posible confusión inducida por la exposición hipotérmica que pueda ser problemática en el FST y evita la necesidad de que el ratón nade, lo que puede ser relevante para examinar los efectos de ciertos animales donde la coordinación motora puede verse comprometida (Cryan & Mombereau, 2004).

En nuestros experimentos la sujeción del ratón de su cola fue realizada a través de una cinta como se muestra en la Figura 13 (Sección Materiales y Métodos), los mismos fueron filmados y los animales que treparon por la cola fueron eliminados de un análisis posterior, ya que se consideró un aprendizaje de escape en los mismos.

En el TST, encontramos que tanto la infusión de *Hg* como la de *Ht* a dosis de 25 mg/kg mostraron una disminución del tiempo de inmovilidad similar a clomipramina, sugiriendo un *efecto antidepresivo* de ambas especies de *Hedyosmum*.

Existen reportes bibliográficos que comprueban el efecto antidepresivo de *H. brasiliensis*. En los estudios realizados por Goncalves y col (2012), los autores evidenciaron el efecto antidepresivo de un extracto etanólico de *H. brasiliensis* dado que disminuyó el tiempo de inmovilidad en el FST. Además, mostraron que el mismo extracto no modificó la locomoción en el test de campo abierto, demostrando así que los efectos de inmovilidad observados en el FST no son debidos a una actividad psicoestimulante (Goncalves *et al.*, 2012).

Nuestros resultados con las infusiones de *Hg* y *Ht* concuerdan con los obtenidos por Goncalves y col (2012) con el extracto etanólico de *H. brasiliensis*, dado que *muestran un efecto antidepresivo evaluado por el TST y no hay cambios en la movilidad espontánea evaluada en el test campo abierto.*

Aunque ambos test mencionados para evaluar la actividad antidepresiva de una sustancia son considerados modelos de depresión con buena validez predictiva (Goncalves *et al.*, 2012) es conocido que el espectro de compuestos activos en el FST y TST se superpone, pero no es idéntico (Bai *et al.*, 2001). Existe evidencia farmacológica que avala la idea de que las vías neuroquímicas que median el comportamiento en la FST y la TST no son idénticas, y que tales diferencias farmacológicas también podrían involucrar factores farmacocinéticos que pueden confundir la interpretación de estos datos (Bai *et al.*, 2001). Es por ello que es de nuestro interés evaluar las infusiones de *Hg* y *Ht* en el FST en una etapa próxima.

## **6. CONCLUSIONES**

Nuestros resultados contribuyen al conocimiento de las plantas nativas del Ecuador utilizadas con fines medicinales, abarcando el estudio desde un punto de vista morfo-anatómico y farmacológico de las especies *Hedyosmum goudotianum* y *Hedyosmum translucidum* pertenecientes a la familia Chloranthaceae.

### **6.1. Estudios anatómicos**

*Hedyosmum* es un género que incluye varias especies de valor medicinal, los caracteres empleados en su determinación se basan principalmente en la flor e inflorescencia, además de sus caracteres foliares, por lo que el valor de los caracteres anatómicos en la diferenciación de las especies de este género es ineludible.

En este estudio anatómico se revela la importancia de ciertos caracteres histológicos para la determinación en un principio del género y también de las dos especies en estudio, en donde características como: *células poligonales de la epidermis con paredes anticlinales rectas y gruesas, tipo de estomas laterocíticos, presencia de células secretoras, mesófilo conformado por un parénquima en empalizada atípico seguido de un parénquima esponjoso, abundancia y el tipo de esclereidas presentes en el mesófilo, tipo de dientes y la presencia de canales esquizógenos*; son constantes y entonces podrían ser usadas para clarificar ciertos procesos de clasificación morfológica, además de ser una herramienta marcador para estas especies.

Existen ciertas características puntuales que permiten distinguir la identidad entre las dos especies:

**Estructura del mesófilo:** para *Hedyosmum goudotianum* la presencia de 4-6 capas de parénquima en empalizada atípico seguido de 6-7 capas de parénquima esponjoso, diferente al mesófilo de *H. translucidum* con 2-3 capas de parénquima en empalizada atípico y 10-12 capas de parénquima esponjoso.

**Hidátodos:** La presencia de hidátodos dispuestos sobre la base del diente de *H. goudotianum* que no están presentes en *H. translucidum*.

**Esclereidas:** La presencia de macroesclereidas y braquiesclereidas dispuestas perpendicularmente a la epidermis del haz y envés de las hojas de *H. translucidum*, patrón no diferenciado para *H. goudotianum*.

## 6.2. Estudios farmacológicos

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

Las tinturas de *Hedyosmum goudotianum* (HgT) y *Hedyosmum translucidum* (HtT) **poseen actividad antiespasmódica** mediante un antagonismo no competitivo de los receptores muscarínicos y del influjo de calcio.

**La tintura de *H. goudotianum* posee un efecto antiespasmódico más potente que la tintura de *H. translucidum*, frente a la contractura ocasionada por activación de los**

*receptores muscarínicos*. Ambas tinturas presentan un patrón similar al de verapamil en las CCR de calcio, el cual ha sido reportado ser típico de flavonoides.

*Las infusiones de H. goudotianum y H. translucidum no mostraron efectos sedantes sobre la movilidad espontánea de los ratones en el test de campo abierto a dosis de 25 mg/kg, mientras que ambas poseen un marcado efecto ansiolítico similar a diazepam, resultado validado en el test de supresión de alimento y laberinto en cruz.*

*La infusión de H. goudotianum a dosis de 25 mg/kg muestra un efecto anorexígeno, al disminuir significativamente el consumo de alimento por los ratones, testeados en primera instancia en el test de supresión de alimento y corroborados en el test anorexígeno. Este efecto no fue evidenciado con la infusión de H. translucidum.*

*Tanto la infusión de H. goudotianum como de H. translucidum muestran un efecto antidepressivo en el test de suspensión de cola en ratones, presenciado por una disminución del tiempo de inmovilidad similar a clomipramina.*

A partir de estos resultados surge la necesidad de probar otras dosis de infusiones de ambas especies de *Hedyosmum* y realizar un análisis fitoquímico de las mismas.

Desde la ciencia, el estudio de los organismos implica un trabajo multidisciplinario, las plantas, animales y demás seres que cohabitan con nosotros poseen una historia evolutiva que trae consigo un acervo genético silencioso, esto ha permitido que hasta la actualidad se desarrolle la vida sobre el planeta. Este complejo dinámico, sin lugar a duda ha sido el impulso para que los organismos colonicen todos los ambientes, con adaptaciones y propiedades extraordinarias, de las cuales hasta la actualidad los humanos hemos hecho uso.

Es por ello que, se reconoce de primera instancia el valor histórico de los saberes de nuestros pueblos en cuanto al uso de las especies vegetales, pero se remarca la importancia de validarlos científicamente, sin el hecho de desvalorizar los mismos, sino de complementar e identificar otros posibles efectos, así como las dosis y la manera de preparación, teniendo en cuenta que los compuestos que contienen las plantas no son inocuos y que en muchos casos podrían resultar hasta tóxicos.

El valor del uso de las especies nativas de cada región, también es tema de énfasis en esta tesis. Comprender que el aprovechamiento de los recursos que nos brinda el bosque están relacionados con la comunidad que los sabe utilizar, y por lo tanto, los saberes son enormes en cada región. Así como la distribución de las especies, que, el enfrentarse tanto a cambios bióticos como abióticos, ha repercutido en los metabolitos que éstas producen, entonces su función no podría esperarse igual en los diferentes ecosistemas en los que se desarrollan.

La síntesis de todas estas características evidencia un ciclo complejo, además, de todo lo que conlleva la existencia de las especies y su relación con el ser humano; el largo camino que han tenido que pasar, ha llevado a las plantas a que sean organismos únicos, autosuficientes y generadores de vida. Por lo tanto, nuestra relación con ellas no sólo implica su aprovechamiento sino su conservación y respeto.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

Acebey, L., Jullian, V., Sereno, D., Chevalley, S., Estevez, Y., Moulis, C., Beck, S., Valentin, A., Giménez, A. & M. Sauvain. 2010. Anti-Leishmanial lindenane sesquiterpenes from *Hedyosmum angustifolium*. *Planta Med.* Vol. 76; pp. 365-368.

Ali, M., Mehmood, M., Saleem, M. & A. Gilani. 2020. The use of *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae) in diarrhea and constipation involves calcium antagonism and cholinergic mechanism. *BMC Complement Med Ther.* Vol. 20(1).

Alonso, J. & C. Desmarchelier. 2005. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Editorial L.O.L.A. Literature of Latin America, Buenos Aires.

Ames, O. 1949. Botanical Museum leaflets. *Plantae austro-americanae vi: plantarum principaliter vallis amazoniae novarum vel minus cognitarum no.* Harvard University. Vol. XIV.

Amoah, S., Kouloura, E., Macedo, L., Barison, A., Wildner, L., Bazzo, M., Halabalaki, M., Skaltsounis, L. & M. Biavatti. 2015(a). Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*. *Phytochemistry letters.* Vol. 13; pp. 267-274.

Amoah, S., Dalla, M., Pedrini, B., Lazzarotto, G., Goncalves, A., dos Santos, D., Biavatti, M. & M. de Souza. 2015(b). Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and the sesquiterpene alcohol aromadendrane-4 $\beta$ ,10 $\alpha$ -diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. *European Journal of Pharmacology.*

APG IV. The Angiosperm phylogeny group. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV *Botanical Journal of the Linnean Society.* Vol. 181; pp. 1-20.

Bai, F., Li, X., Clay, M., Lindstrom, T. & P. Skolnick. 2001. Intra- and interstrain differences in models of “behavioral despair”. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* Vol. 70; pp. 187–192.

Baranova, M. 1983. On the laterocytic stomato type in angiosperms. The New York Botanical Garden. *Brittonia.* Vol. 35(1); pp. 93-102.

Bercion, S., Coupe, M., Baltaze, J. & P. Bourgeois. 2005. A new  $\alpha$ -methylene  $\gamma$ -lactone sesquiterpene from *Hedyosmum arborescens*. *Fitoterapia.* Vol. 76; pp. 620-624.

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

Blednoy, Y., Black, M., Benavidez, J., Da Costa, A., Mayfield, J. & R. Harris. 2017. Sedative and Motor Incoordination Effects of Ethanol in Mice Lacking CD14, TLR2, TLR4, or MyD88. *Alcohol Clin Exp Res*. Vol. 41(3); pp. 531-540.

Bodnoff, S., Suranyi, B., Aitken, D., Quirion, R. & M. Meaney. 1988. The effects of chronic antidepressant treatment in an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. Vol. 95(3); pp. 298-302.

Bonilla, A. 2017. Estudio de las propiedades farmacológicas y análisis fitoquímico de los extractos de *Gomphrena perennis* L. (Amaranthaceae). Trabajo de Tesis de Maestría en Plantas Medicinales. UNLP, La Plata, Argentina.

Capasso, F., Gaginella, T., Grandolini, G. & A. Izzo. 2003. *Phytotherapy. A quick reference to herbal medicine*. Springer-Verlag Berlín Heidelberg.

Cárdenas, L., Rodríguez, J., Villaverde, M., Riguera, R., Cadena, R. & J. Otero. 1992. The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: Flavonoid glycosides. *Planta Med*. Vol. 59.

Cárdenas, J. & J. Navarro. 2002. Modelos animales de ansiedad incondicionada. *Psiquitría Biológica*. Vol. 9(1); pp. 18-32.

Caycedo, A., Zamora-Burbano, A., Echeverry, S., Enríquez, R., Ortega, D., Burgos, M. & M. Caycedo. 2011. Producción sostenible de cuyes: alternativa económica para la conservación de cuencas hidrográficas en Nariño, Centro de publicaciones Universidad de Nariño, Colombia.

Chen, J. & W. Ko. 2017. Relaxation of isolated guinea-pig trachea by apigenin, a constituent of celery, via inhibition of phosphodiesterase. *Eur J Pharmacol*. Vol. 15, 811; pp. 129-133.

Choleris, E., Thomas, A., Kavaliers, M. & F. Prato. 2001. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely

low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Vol. 25; pp: 235-260.

Cong-Mei, C., Yong, P., Quing-Wen, S. & X. Pei-Gen. 2008. Chemical Constituents and Bioactives of plants of Chloranthaceae. *Chemistry & Biodiversity*. Vol. 5.

Consolini, A. & I. Ragone. 2010. Patterns of Self-Medication with Medicinal Plants and Related Adverse Events - A South American Survey. *Current drug safety*; Lugar: United Arab Emirates. Vol. 5; pp. 333 – 341.

Consolini, A., Berardi, M. R. & M. Volonté. 2011. Antiespasmotic effects of *Aloysia polystachya* and *A. gratissima* tinctures and extracts are due non-competitive inhibition of intestinal contractility induced by acetilcholine and calcium. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 215; pp. 889-900.

Cryan, J. & C. Mombereau. 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Molecular Psychiatry* Vol. 9; pp. 326–357.

Cryan, J., Mombereau, C. & A. Vassout. 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurociencia and Biobehavioral Reviews*. Vol. 29; pp. 571-625.

De la Torre, H., Navarrete, P., Muriel, M., Macías, M. & H. Balslev (eds.). 2008. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus.

Dizeo de Strittmatter, C. 1973. Nueva técnica de diafanización. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. Vol. 15; pp. 126-129.

Domínguez, X. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa S.A. México D.F.

Eklund, E., Doyle, J. & P. Herendeen. 2004. Morphological phylogenetic analysis of living and fossil Chloranthaceae. *International journal of plant science*. Vol. 165; pp. 107-151.

Flannery, B., Wu, W. & J. Pestka. 2011. Characterization of deoxynivalenol-induced anorexia using mouse bioassay. *Food Chem. Toxicol.* Vol. 49; pp. 1863–1869.

Fletcher, R. 2016. Pseudocereals: Overview. Elsevier. *Encyclopedia of food grains.* Vol. 2; pp 448-493.

Fonseca, M. 2005. Cornaceae y Chloranthaceae. *Flora de Guerrero N° 27.* Facultad de Ciencias, UNAM.

Gattuso, M. 2013. *Las plantas medicinales en Latinoamérica Martha. Dominguezia.* Vol. 29.

Global Biodiversity Information (GBIF). 2020. Taxonomy. Checklist dataset. (Consultado en abril del 2020). En línea: <https://www.gbif.org/species/search>.

Goncalves, A., Burguer, C., Amoah, S., Tolardo, R., Biavatti, M. & M. de Souza. 2012. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *European Journal of pharmacology.* Vol. 674; pp. 307-314.

González, M. & M. Casares. 1996. La anatomía vegetal como método de identificación en etnobotánica. *Monograf. Jard. Bot. Córdoba.* Vol. 3; pp. 33-37.

Goodman & Gillman. 2016. *Las Bases Farmacológica de la Terapéutica,* XIII Edición.

Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Spagnoletti, A., Asanza, M. & L. Scalvenzi. 2016. Cytotoxic effect and TLC bioautography-Guided approach to detect health properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* Essential oil. *Hindawi.*

Gupta, M. 2006. Medicinal plants originating in the Andean high plateau and central valley region of Bolivia, Ecuador and Peru. Report. Centro de investigaciones farmacognósticas de la Flora Panameña. Universidad de Panamá.

Hamada, K., Sasaki, Y., Taniguchi, N., Fukui, H., Ukai, Y., Yashikuni, Y. & K. Kimura. 1997. Anticholinergic and calcium Antagonistic Activities of NS-21 contribute to

the inhibition of rat urinary bladder contractions. *General Pharmacology*. 29 (5); pp. 771-778.

Hani, A. 2014. Guía latinoamericana de dispepsia funcional. Antiespasmódicos. *Acta Gastroenterol Latinoam*. Vol. 44.

Hickey, L. 1974. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. Vol. 16.

Hickey, L. & J. Wolfe. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: Vegetative morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol. 62; pp. 538-589.

Johnson, J., Edwards, M., Davies, H., Newman, D., Holden, W. & R. Jenkins. 2017. Ethanol Stimulates Locomotion via a Gas-Signaling Pathway in IL2 Neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. Vol. 207(3); pp. 1023-1039.

Jorensen, P., Neill, D. & León-Yáñez, S. 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden.

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

Kawabata, J. & J. Mizutani. 1988. Distribution of Lindenanolides in the Chloranthaceae. *Agric. Biol. Chem*, Vol. 52; pp. 2965-2966.

Kirchner, K., Wisniewski, J., Bella Cruz, A., Biavatti, M. & D. Netz. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense*, Chloranthaceae, essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Vol. 20; pp. 692-699.

Ko, F., Huang, T. & C. Teng. 1991. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 14, 1115(1); pp. 69-74.

Komada, M., Takao, K. & T. Miyakawa. 2008. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp*. Vol. 22; pp 1-4.

Kong, H. 2001. Comparative morphology of leaf epidermis in the Chloranthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Vol. 36; pp. 279-294.

Kubitzki, K., Rhower, J. & V. Bittrich. 1993. Chloranthaceae: The families and genera of vascular plants. Vol II. Flowering Plants. Dicotyledons. Springer-Verlag.

Kumar, S. & A. Sharma. 2006. *Apigenin: The Anxiolytic Constituent of Turnera aphrodisiaca*. *Pharmaceutical biology*.

Lad, H., Liu, L., Payá, J., Fernandez, C. & L. Schalkwyk. 2007. Quantitative traits for the tail suspension test: automation, optimization, and BDX RI mapping. *Mamm Genome*. Vol. 18; pp. 482-491.

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

Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E. & J. Guevara. 2010. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXIV; pp. 143 – 154.

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

Macbride, F. 1937. Flora of Peru, Chloranthaceae. Field Museum of Natural History. Chicago, U.S.A. Biodiversity Heritage Library.

Machado, A. 2004. Efeitos do estresse hídrico em plantas jovens de *Hedyosmum brasiliense* MART. (Chloranthaceae). Tesis de posgrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.

Mamedov, N. 2012. Medicinal plants studies: History, challenges and prospective. *Medicinal & Aromatic Plants*. Vol. 1.

Martínez, J., Muñoz-Acevedo, A. & M. Rai. 2019. *Ethnobotany. Application of Medicinal Plants*. Taylor & Francis Group.

Mehmood, M., Siddiqi, H. & A. Gilani. 2010. The antidiarrheal and spasmolytic activities of *Phyllanthus emblica* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca<sup>2+</sup> channels. J Ethnopharmacol. Vol. 133(2); pp. 856-65.

Metcalf, C. & L. Chalk. 1950. Anatomy of the Dicotyledons. Leaves, stem and wood, in relation to taxonomy with notes on economic uses. Volume II. Oxford at the clarendon press; pp. 1128-1132.

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

Minga, D., Guzmán, N. & M. Jiménez. 2019. Árboles de los bosques de las estribaciones orientales de la cuenca del río Paute. Universidad del Azuay. Imprenta Digital Universidad del Azuay.

Monserrat, J. 1883. La creación, Historia Natural. Tomo VIII Botánica. Universidad autónoma de Nuevo León. Barcelona; pp. 551.

Nigusse, T., Zhang, L., Wang, R., Wang, X., Li, J. & C. Liu. 2019. Flavonoids in a crude extract of *Catha edulis* inhibit rat intestinal contraction via blocking Ca<sup>2+</sup> channels. Neurogastroenterol Motil. Vol. 31(7).

Ocampo, R. & G. Mora. 2010. Las Plantas Medicinales de América Latina como Materia Prima ¿Cuál es, o debería ser su papel? Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Vol. 9; pp. 323 – 325.

Ochioni, P. 1954. Contribuição ao estudo da família Chloranthaceae com especial referência ao gênero *Hedyosmum* Sw. Tesis posgrado Botánica aplicada y farmacia, Facultad Nacional de Farmacia. Universidad de Brasil.

Ojeda, R. 2016. Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios a partir de las hojas con flores femeninas de *Hedyosmum racemosum* (Ruiz & Pav.) en la provincia de Zamora Chinchipe. Trabajo de titulación de bioquímico farmacéutico. Universidad Técnica Particular de Loja.

Oliveira, F., Ponte, B., Barbosa, A., Moreno, A., Veríssimo, L., Gomes, M., Pelosi, G., Britto, L., García, G. & E. Moreira. 2013. Fluoxetine exposure during pregnancy and lactation: Effects on acute stress response behavior in the novelty-suppressed feeding are age and gender-dependent in rats. *Behavioural Brain Research*. Vol. 252; pp. 195-203.

Padua, L., Bunyaphatsara, N. & Lemmens. 1999. *Plant Resources of South-East Asia. Medicinal and poisonous plants 1*. Vol.1. pp. 21-70.

Padulosi, S., Leaman, D. & P. Quek. 2002. Challenges and opportunities in enhancing the conservation and use of medicinal and aromatic plants. *Journal of herbs, spices & Medicinal plants*. Vol. 9; pp. 243-267.

Pellow, S. & S. File. 1985a. Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety in the rat. *Pharmac. Biochem. Behav.*

Pellow, S., Chopin, P., File, S. & M. Briley. 1985 b. Validation of open: closed arm entries in an elevated plusmaze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*.

Persyn, W., Houchi, H., Papillon, C., Martinetti, M., Antol, M., Guillaumont, C., Dervaux, A. & M. Naassila. 2018. Ethanol-related behaviors in alpha-synuclein mutant mice and association of SNCA SNPs with anxiety in ethanol-dependent patients. *Alcoholism Clinical & experimental research*.

Quattrocchi, U. 2012. *CRC World Dictionary of Medicinal and poisonous plants. Common names, scientific Names, Eponyms, Synonyms and Etymology*. Taylor & Francis group.

Radice, M., Tasambay, A., Pérez, A., Diéguez, K., Sacchetti, P., Buzzi, R., Vertuani, S., Manfredini, S. & A. Baldisserotto. 2019. Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of the genus *Hedyosmum* (Chloranthaceae): A review. *Journal of Ethnopharmacology*.

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

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

Raven, P. & D. Axelrod. 1974. Angiosperm Biogeography and past continental movements. Annals of the Missouri Botanical Garden. Vol. 61; pp. 539-673.

Reitz R., 1965. Clorantaceas - Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário “Barbosa Rodrigues”, p. 4-10. Citada en Radice, *et al.*, 2019.

Ríos, M., Koziol, M., Borgtoft, H. & G. Granda (Eds.). 2007. Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas. Sociedad para la Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad Ecuatoriana (SIMBIOE). Quito, Ecuador. 652 pp.

Roger, R. 2013. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. Revista Farmacencia. Vol. 2. Trujillo-Perú.

Sagoe, S. 2015. Estudio químico de *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae. Programa de posgrado en farmacia. Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Sierra, R. 1999. Propuesta preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia, Quito, Ecuador.

Soltis, P., Folk, R.A. & D. E., Soltis. 2019. Darwin review: angiosperm phylogeny and evolutionary radiations. Proc. R. Soc. B 286: 20190099. En línea: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.0099>

Spegazzini, E. 2007. La micrografía en la identidad de los vegetales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Vol. 6; pp. 165. Santiago, Chile.

Su, Z., Yin, S., Zhou, Z., Wu, Y., Ding, J. & J. Yue. 2008. Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. J. Nat. Prod. Vol. 71; pp. 1410-1413.

Swamy, B. 1953. The morphology and relationships of the Chloranthaceae. Journal of the arnold arboretum. Vol. 14.

The plant list. 2013. Version 1.1. (Consultado en enero del 2020). En línea: <http://www.theplantlist.org/>

Todzia, C. 1988. Chloranthaceae: *Hedyosmum*. Flora Neotropica. Vol. 48; pp. 1-138.

Todzia, C. 1990. Chloranthaceae. *Hedyosmum* SWARTZ. Flora of Ecuador. Vol. 40.

Todzia, C. & R. Keating. 1991. Leaf Architecture of Chloranthaceae. Annals of the Missouri Botanical Garden. Vol. 78; pp. 476-496.

Todzia, C. 1993. Chloranthaceae. Flowering Plants – Dicotyledons. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; pp. 281-287.

Tolardo, R., Zetterman, L., Bitencourt, D., Mora, C., Lazzarotto, F., Weber, M., Sagoe, S., Burger, C. & M. de Souza. 2010. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 128; pp. 63-70.

Trentin, S., Santos, A., Guedes, A., Pizzolatti, M., Yunes, R. & J. Calixto. 1999. Anticonception caused by the extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-9,9-dehydroshizukanolide. Planta Medica. Vol. 65; pp. 517-521.

Tropicos. Missouri Botanical Garden. 2020. (Consultado en enero del 2020). En línea: <http://www.tropicos.org/Name/7300013>

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). 2019. Especies para la restauración. *Hedyosmum mexicanum*. (Consultado en noviembre del 2019). En línea: [https://www.especiesrestauracion-iucn.org/data\\_especie.php?sp\\_name=Hedyosmum%20mexicanum](https://www.especiesrestauracion-iucn.org/data_especie.php?sp_name=Hedyosmum%20mexicanum)

Upchurch, G. 1984 (a). Cuticular anatomy of angiosperm leaves from the lower cretaceous Potomac group I. Zone I Leaves. Amer. J. Bot. Vol. 71; pp. 192-202.

Upchurch, G. 1984 (b). Cuticle evolution in early cretaceous angiosperms from the Potomac group of Virginia and Maryland. Ann. Missouri Bot. Gard. Vol. 71; pp. 522-550.

Valtueña, J. 2001. Reglamentación de las plantas medicinales. Presidente del Centro Internacional de Educación para la Salud. Ginebra (Suiza).

Vanegas, C. 2019. Estudio anatómico y farmacológico de la especie *Schinus molle* March. (Anacardiaceae)". Tesis de maestría en Plantas medicinales. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

Ventura-Martínez, R., Rivero-Osorno, O., Gómez, C. & M. González. 2011. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *J Ethnopharmacol.* Vol. 137(3).

Walf, A. & F. Cherly. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* Vol. 2(2); pp. 322–328.

Wagner, H. & S. Bladt, 1996. *Plant Drug Analysis*. 2nd Ed. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.

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

World Health Organization & Convention on Biological Diversity. 2015. Connecting global priorities: biodiversity and human health: a state of knowledge review. World Health Organization. En línea: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/174012>

Wu, W., Flannery, B. M., Sugita-Konishi, Y., Watanabe, M., Zhang, H. & J. Pestka. 2012. Comparison of murine anorectic responses to the 8-ketotrichothecenes 3-acetyldeoxynivalenol, 15-acetyldeoxynivalenol, fusarenon X and nivalenol. *Food Chem. Toxicol.* Vol. 50; pp. 2056–2061.

Wu, W., Zhou, H., Bursian, S., Pan, X., Link, J., Berthiller, F., Adam, G., Krantis, A., Durst, T. & J. Pestka. 2014. Comparison of Anorectic and Emetic Potencies of Deoxynivalenol (Vomitoxin) to the Plant Metabolite Deoxynivalenol-3-Glucoside and Synthetic Deoxynivalenol Derivatives EN139528 and EN139544. *Society of Toxicology.* pp. 167-181.

Yacoubi, M., Bouali, S., Popa, D., Naudon, L., Leroux-Nicollet, L., Hamon, M., Costentin, J., Adrien, J. & J. Vaugeois. 2003. Behavioral, neurochemical, and

electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression. PNAS. Vol. 100; pp. 6227-6232.

Yang, Z., Pan, A., Zuo, W., Guo, J. & W. Zhou. 2014. Relaxant effect of flavonoid naringenin on contractile activity of rat colonic smooth muscle. J Ethnopharmacol. Vol. 155(2); pp. 1177-83.

Yuan, L., Dong-Ming, A., Jian-Bei, L., Shi-Shan, Y., Yan, L. & L. Yong-Ming. 2006. Hepatoprotective Sesquiterpene glycosides from *Sarcandra glabra*. J. Nat. Prod. Vol. 69; pp. 616-620.

Zamora-Burbano, A. & D. Arturo-Perdomo. 2016. Composición química del aceite esencial de hojas de *Hedyosmum translucidum* Cuatrec., Chloranthaceae (Granizo). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromática. Vol. 15; pp. 192-198.

Zaniolo, S., Boeger, M. & R. Negrelle. 2001. Estrutura da folha de *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex Miq. (Chloranthaceae) como subsídio para o controle de qualidade. Rev. Bras. Pl. Med, Botucatu, Vol. 4; pp. 29-34.

Zaniolo, S. 2002. Ecologia de *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex Miq. (Chloranthaceae): subsídio para cultivo e manejo sustentável. Tesis posgrado. Universidade federal do Parana setor de Ciencias Agrarias. Brasil

Zhang, M., Dan, L., Guiqiang, F., Ruxing, W., Xinghua, L., Yucheng, G. & S. Ging-Wen. 2016. Constituents from Chloranthaceae plants and their biological activities. Review. Heterocycl. Commun. Vol. 22; pp. 175-220.

Zoofishan, Z., Kúsz, N., Csorba, A., Tóth, G., Haiagos, J., Kothencs, A., Gáspár, R. & A. Hunyadi. 2019. Antispasmodic Activity of Prenylated Phenolic Compounds from the Root Bark of *Morus nigra*. Molecules. Vol. 24.