



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

***Viola arguta* (Violaceae), una especie de la medicina tradicional ecuatoriana**

Elementos de diagnóstico, ensayos fitoquímicos y actividades biológicas

**Tesis de Maestría para optar al grado de
Magíster en Plantas Medicinales, UNLP**

**Bioquímico
Juan Marcelo Carpio Arevalo**

**Directora de Tesis
Dra. María Adelaida Rosella**

Lugar de trabajo:
Cátedras de Farmacobotánica y Farmacognosia,
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

2012

Agradecimientos

Muy especial:

A mis padres y hermanos por su inmenso apoyo, amor, por motivarme y hacerme creer que con esfuerzo puedo conseguir lo que me proponga.

Para mi tío Gastón, mi tía Suky y al Ady por su afecto y ayuda en cada uno de mis proyectos y por confiar siempre en mí.

A mi tía Zoily y a mi Abuelito por su increíble cariño y por estar siempre pendientes de todo lo que hago.

A toda mi familia que de una manera u otra me han hecho sentir su afecto a la distancia.

A mis amigos de la infancia en especial a Martín y Carlos.

Con aprecio y un gracias muy grande a mi amiga Paulina por su ayuda incondicional.

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas por permitirme realizar este trabajo.

Mi más profundo agradecimiento a la Dra. María Rosella, por todos los conocimientos que recibí, su amabilidad, por su ayuda, por abrirme las puertas de su hogar y tener la suerte de conocer a su familia, mil gracias.

A la Dra. Raffaella Ansaloni y demás investigadores del Herbario de la Universidad del Azuay (Cuenca – Ecuador) por su gentil ayuda en la Determinación de la planta utilizada en este trabajo.

A la Dra. Alicia Consolini, Directora del Magister, por su amabilidad y constante apoyo.

Mi gratitud con la Dra. Etilde Spegazzini por estar siempre pendiente de mi avance en la Maestría.

A la Magister Marta Colares por su colaboración con la parte de anatomía vegetal y por haber estado siempre dispuesta a brindarme su ayuda y conocimientos.

Al Lcdo. Guillermo Schinella por su colaboración y por facilitar su laboratorio para los ensayos *in-vitro*.

Mi gratitud a la Lcda. Silvia Aquila por su ayuda en los ensayos *in-vitro* y por transmitir siempre su alegría.

Muchas gracias a la Dra. Guillermina Volonté por su apertura y la ayuda en su laboratorio.

A la Lcda. Griselda Haag por su colaboración con los ensayos de actividad antioxidante.

Agradecimientos

A la Magister Mariela del Valle por facilitarme gentilmente reactivos.

Al Lcdo. Carlos Valle por sus conocimientos y amabilidad.

A Agustín Asuaje por su ayuda con el procesamiento de los datos.

A todo el personal de las cátedras de Farmacognosia, Farmacobotánica y Fitopatología por su gran calidad humana.

A todas las persona que tuve la suerte de conocer en La Plata, gracias por hacer que este tiempo lejos de casa haya sido más llevadero y de manera especial muchas gracias Lucho y Catu.

Indice

	Pag.
1.- Introducción	4
Fundamentos de la elección del tema	7
2.- Antecedentes	9
2.1.- Género <i>Viola</i>	10
2.1.1.- Antecedentes botánicos y distribución geográfica	10
2.1.2.- Antecedentes de uso en medicina tradicional	10
2.1.3.- Antecedentes Fitoquímicos	12
2.2.- <i>Viola arguta</i>	20
3.- Objetivos	22
4.- Materiales y Métodos	24
4.1.- Material vegetal	25
4.1.1.- Procedencia	25
4.1.2.- Recolección y acondicionamiento del material vegetal	26
4.1.3.- Determinación taxonómica	26
4.2.- Microscopia analítica	28
4.2.1.- Equipos utilizados	28
4.2.2.- Observación de epidermis foliar con microscopio óptico (MO)	30
4.2.3.- Observación de la epidermis foliar con microscopio electrónico de barrido (MEB)	30
4.3.- Ensayos fitoquímicos	31
4.3.1.- Preparación de los extractos	31
4.3.2.- Pruebas químicas orientativas	33
4.3.3.- Cromatografía en capa delgada (CCD)	36
4.3.4.- Caracterización de ciclótidos por CCD	38
4.3.5.- Detección de ácidos por CCD	39
4.4.- Actividades	39
4.4.1.- Actividad antioxidante por métodos espectrofotométricos	39
4.4.2.- Actividad antiinflamatoria	47
5.- Resultados y Discusión	53
5.1.- Elementos de diagnóstico y determinación de valores numéricos en hojas de <i>V. arguta</i>	54
5.1.1.- Análisis micrográfico de las hojas de <i>V. arguta</i>	56
5.1.2.- Determinación de valores numéricos o magnitudes proporcionales	59
5.1.3.- Observación de la epidermis foliar mediante MEB	60
5.2.- Ensayos fitoquímicos	61
5.2.1.- Rendimientos de los extractos de <i>V. arguta</i>	61
5.2.2.- Pruebas químicas orientativas efectuadas a los extractos acuoso, diclorometánico y metanólico de <i>V. arguta</i>	61
5.2.3.- Análisis de las cromatografías en capa delgada (CCD) efectuadas a	

los extractos acuoso, diclorometánico y metanólicos de <i>V. arguta</i>	63
5.2.4.- Caracterización de ciclótidos por TLC	67
5.2.5.- Detección de ácidos por CCD	75
5.3.- Actividades	76
5.3.1.- Actividad antioxidante por métodos espectrofotométricos	76
5.3.2.- Actividad antiinflamatoria: Estudio de la inhibición de la producción de oxido nítrico <i>in vitro</i>	80
6.- Conclusiones	87
7.- Resumen	91
9.- Bibliografía	105

1.- Introducción.

1. - Introducción

Desde tiempos remotos, las sociedades humanas han recurrido a la naturaleza, principalmente a las plantas, como fuente medicinal. En la actualidad, un gran porcentaje de la población mundial, en particular en los países en desarrollo, utiliza las plantas para hacer frente a necesidades primarias de asistencia médica. (Paladini, 1996).

Según la OMS el 80% de la población mundial hace uso de los remedios naturales y las medicinas tradicionales y el Ecuador no es una excepción.

Ecuador se reconoce desde la Constitución del año 1998 como un País pluricultural y multiétnico y que además está ubicado en uno de los sitios de mayor megabiodiversidad del Planeta, todas estas características confluyen en una pequeña extensión de territorio que tiene el potencial de ofrecer a la humanidad mucho de sus recursos naturales, sus secretos y los conocimientos ancestrales de sus pueblos.

Numerosas especies de la familia *Violaceae* han sido reconocidas desde la antigüedad como un grupo de plantas con importantes propiedades medicinales, algunos de los ejemplos más importantes incluye a *Viola tricolor* L. conocida popularmente como “pensamientos” entre cuyos usos en medicina tradicional se incluyen: tratamiento de las vías respiratorias superiores, diurético, antitumoral (Vukics *et al*, 2008), sudorífico, para el reumatismo (Al-Qura, 2008), y externamente en casos de impétigo, eczemas, acné, (Ewa Witkowska-Banaszczak *et al.*, 2005) entre otras.

Una de las especies ampliamente distribuida en el mundo es *Viola odorata* Thunb., comúnmente llamada “violeta dulce”. Las partes aéreas de esta planta han sido utilizadas por vía oral para tratamiento de bronquitis, tos, asma, desórdenes del sueño, agitación nerviosa. Externamente las decocciones de la planta son utilizadas para tratar infecciones de boca y garganta al igual que afecciones cutáneas. (Anastasia Karioti *et al.* 2010)

En el Ecuador los usos de esta planta incluyen el tratamiento de diversas afecciones tales como tos, resfrío, catarro, tisis, laringitis, viruela, sarampión, escarlatina de la piel, úlceras cancerosas, abscesos del estómago e intestino, empachos e intoxicaciones. (Rios Moserrat *et al.*, 2007)

1. - Introducción

Una de las especies utilizadas en la medicina natural Oriental es *Viola yedoensis* Makino distribuida en Corea, Japón y China. (Chen Xie *et al.* 2003)

Otro ejemplo es *Viola ibukiana* Makino, especie que se encuentra en el sur de Corea y que en medicina tradicional ha sido utilizada como expectorante, diurético, para tratamientos de bronquitis, reumatismo, eczemas y erupciones de la piel.

Se ha reportado que uno de los componentes de naturaleza flavonoide (2',4',5,7-tetrahydroxyisoflavona) encontrado en esta planta tiene la capacidad de inhibir la expresión de la metaloproteinasa I de la matriz extracelular en cultivos de fibroblastos de piel humana sometidos a irradiación con luz UV, lo cual demuestra que este compuesto puede ser útil en el tratamiento y prevención de la expresión de esta endoproteasa dependiente de Zinc, cuyo aumento en condiciones fisiológicas permite la normal remodelación del tejido dañado, pero que está vinculada también con el proceso de envejecimiento foto-inducido. (Hyung-In Moon *et al.*, 2005)

Viola websteri Hemsley, es una especie que contiene entre sus principios activos al ácido 6-(8'Z-pentadecenil)-salicílico que, según se ha demostrado en ensayos *in vivo*, posee actividad esquizonticida sobre *Plasmodium berghei* en los primeros estadios de infección inducida en ratón. (Ill-Min Chung. *et al.* 2009)

El potencial antioxidante de algunos miembros de la familia Violaceae también ha sido evaluado, por ejemplo el extracto metanólico de hojas de *V. odorata* ha mostrado una IC50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de alrededor de 245 en el ensayo con DPPH (Ebrahimzadeh Mohammad, *et al.*, 2010)

Sin embargo, uno de los principios activos ampliamente distribuido en la familia Violaceae y que más ha llamado la atención en las dos últimas décadas es el de un grupo de péptidos cíclicos, formados por 28 a 37 aminoácidos, ricos en cisteína, que recibieron el nombre de ciclótidos, de su acrónimo en inglés: péptidos cíclicos (*Cyclic peptides*).

Los ciclótidos exhiben diversas actividades biológicas, tales como:

1. - Introducción

- Actividad inhibitoria sobre el Virus causante del SIDA (VIH)
- Actividad antimicrobiana
- Actividad citotóxica
- Actividad antagonista de neurotensina
- Actividad hemolítica. (Norelle L. Daly et al., 2009)

En ensayos realizados sobre parásitos de animales, se ha comprobado un importante efecto de algunos de los ciclótidos de *Oldenlandia affinis* (R&S) DC (Rubiaceae) sobre *Hemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, resultando ser potentes inhibidores del desarrollo de larvas de nematodos y letales para parásitos adultos, aunque presentan una baja actividad ovicida. (Colgrave et al. 2008)

Todos estos ciclótidos fueron originalmente encontrados en programas de screening para actividades biológicas o en el caso de la actividad uterotónica, a partir de su uso en medicina tradicional. (Bin Chen et al. 2005)

Hasta la fecha, los ciclótidos han sido hallados en todas las especies de Violaceae estudiadas.

Son mucho menos frecuentes en las Rubiaceae (5%-10% de las aproximadamente 200 especies examinadas).

En las Cucurbitaceae se ha estudiado una sola especie, encontrándose solo dos ciclótidos en ella y recientemente se ha reportado su presencia en la familia Apocynaceae. (Norelle L. Daly, et al. 2009)

Fundamentos de la elección del tema

Viola arguta Willd. ex Roem. & Schult. (Nombre vulgar en el Ecuador: Violeta del campo o Violeta Roja) es una especie de la Familia Violaceae que puede ser encontrada en la zona sur-andina del Ecuador en las Provincias de Zamora-Chinchipec y Loja a altitudes entre 1500 y 3500 msm, (Izco Jesús et al., 2007).

1. - *Introducción*

Tiene algunos usos en medicina tradicional: los habitantes de las provincias antes mencionadas preparan una infusión con las partes aéreas frescas de esta planta y se menciona que es utilizada para tratar influenza y fiebre. (Tene Vicente *et al.*, 2006; Minga O. *et al.*, 2009).

También se registra su uso medicinal en la provincia del Cañar, ubicada en el Centro- Sur del Ecuador, donde es utilizada por las personas de esta zona para “el dolor de huesos.” (Minga O. *et al.*, 2009)

El interés por el estudio de *Viola arguta* se fundamenta en que hasta el momento no existen datos botánicos que permitan su reconocimiento.

Tampoco existe información sobre su composición química y actividades biológicas comprobadas que justifiquen su empleo en terapéutica.

Además resulta interesante su estudio fitoquímico para confirmarla como una nueva especie de la familia Violaceae poseedora de ciclótidos, que van erigiéndose como principios activos con potenciales aplicaciones farmacológicas y dentro de esta familia de plantas en particular, como marcadores quimiotaxonómicos.

2.- Antecedentes

2.1.- Genero *Viola*

2.1.1.- Antecedentes Botánicos y distribución geográfica:

Harvey E. Ballard, Jr. (1994), describe el género *Viola* L., como "... plantas herbáceas perennes, rara vez anuales o subarborescentes; hojas alternas sobre tallos erectos o ascendentes, o bien, dispuestas en rosetas basales, estípulas típicamente conspicuas, membranáceas o foliáceas, láminas linear-lanceoladas a reniformes, estrechándose en forma gradual a profundamente cordadas en la base, enteras a manifiestamente divididas; flores casi siempre axilares y solitarias, pedúnculos bibracteolados, desprovistos de articulaciones; cáliz (en las especies americanas) con aurículas bien desarrolladas a modo de prolongaciones que se dirigen hacia atrás de las bases de los sépalos, éstos (a veces considerablemente) más cortos que los pétalos; corola fuertemente zigomorfa, el pétalo inferior prolongado hacia atrás en mayor o menor grado para formar un espolón manifiesto, su limbo por lo general glabro, conspicuamente más corto que los pétalos laterales, los que a menudo llevan interiormente un mechón de pelos; filamentos libres en la base, las dos anteras inferiores provistas de nectarios bien desarrollados; estilo sencillo y uniformemente cilíndrico, o con más frecuencia variadamente modificado; fruto en forma de cápsula trivalvada, sobre un pedúnculo postrado o erecto, con pocas o numerosas semillas..."

El género *Viola* es el más grande de la familia *Violaceae* con ca. 650 especies.

Se las encuentra en las regiones templadas del hemisferio norte y en zonas tropicales del hemisferio sur, especialmente en la zona cordillerana, donde son endémicas.

Suelen ser plantas ornamentales, aunque muchas de ellas también tienen importancia como plantas medicinales y en la alimentación (Ballard, 1994)

2.1.2.- Antecedentes de uso en medicina tradicional.

Numerosas especies de esta familia *Violaceae* han sido reconocidas desde la antigüedad como un grupo de plantas con importantes propiedades medicinales,

2. - Antecedentes

algunos de los ejemplos más importantes incluye a *Viola tricolor* conocida popularmente como “pensamientos” y algunos de sus usos en medicina tradicional incluyen: tratamiento de las vías respiratorias superiores, diurético (Viktoria Vukics et al, 2008; Rimkiene et al., 2003), sudorífico, para el reumatismo (S. Al-Qura.n, 2008), y externamente en casos de impétigo, eczemas, acné, (Witkowska-Banaszczak et al. , 2005) entre otras.

Una de las especies ampliamente distribuida en el mundo es *Viola odorata*, comúnmente llamada violeta dulce, las partes aéreas de esta planta han sido utilizadas por vía oral para tratamiento de bronquitis, tos, asma, desórdenes del sueño, agitación nerviosa; externamente las decocciones de la planta son utilizadas para tratar infecciones de boca y garganta al igual que afecciones cutáneas. (Anastasia Karioti et al. 2010)

En el Ecuador los usos tradicionales de esta planta incluyen: tratamiento de la tos, resfrío, catarro, tisis, laringitis, viruela, sarampión, escarlatina de la piel, úlceras cancerosas, abscesos del estómago e intestino, empachos e intoxicaciones. (Rios Moserrat et al., 2007)

Una de las especies con usos en la medicina natural Oriental es *Viola yedoensis* distribuida en Corea, Japón y China, con muchos usos en estas medicinas tradicionales. (Chen Xie et al. 2003)

Otro ejemplo es *Viola ibukiana* , especie que se encuentra en el sur de Corea y que en medicina tradicional ha sido utilizada como expectorante, diurético, para tratamientos de bronquitis, reumatismo, eczemas y erupciones de la piel. (Hyung-In Moon et al. 2005)

Otra especie del sur de Corea es *Viola hondoensis*, cuyos usos en medicina tradicional son similares a los indicados para *V. ibukiana*.

Resultados interesantes se han obtenido para una especie que no cuenta con referencias de uso en medicina tradicional, *V. declinata*. Siguiendo el enfoque quimiotaxonómico de búsqueda de principios activos se ha demostrado que tiene una composición fitoquímica muy similar a los de *V. tricolor*, por lo que se estima que compartirían algunas actividades biológicas. (Anca Toiu et al. 2009)

2.1.3.- Antecedentes Fitoquímicos

Dentro del género *Viola* se han caracterizado a numerosos principios activos: en el caso de *Viola tricolor* se ha reportado que contiene un 0,3% de ácido salicílico y derivados como su metil ester y violutósido que es el glucósido-arabinosido del metil ester del ácido salicílico. Adicionalmente contiene ácidos fenilcarboxílicos como el trans-cafeico, un 10% de mucílago compuestos principalmente de glucosa, galactosa, arabinosa y ramnosa, taninos, flavonoides, carotenoides, cumarinas como umbeliferona, pequeñas cantidades de saponinas, ácido ascórbico y tocoferol. (Rimkienė, *et al.*, 2003)

Las propiedades antiinflamatorias, expectorantes y diuréticas se atribuyen a la presencia de saponinas, flavonoides, mucílago, carotenoides y derivados del ácido salicílico, siendo responsables de la acción antiinflamatoria estos últimos compuestos junto con la rutina, ejerciendo las saponinas un efecto sinérgico. (Anca Toiu *et al.*, 2009)

Para el caso de *Viola odorata* se ha podido determinar la presencia de taninos, flavonoides, esteroides/triterpenos, (Khatibi *et al.*, 1989; Samra *et al.*, 2006), compuestos fenólicos, glucósidos y alcaloides. (Vishal Antil, *et al.*, 2011)

Se ha reportado que uno de los componentes de naturaleza flavonoide (2',4',5,7-tetrahydroxyisoflavona) encontrado en *Viola ibukiana* tiene la capacidad de inhibir la expresión de la Metaloproteinasa I de la Matriz extracelular en cultivos de fibroblastos de piel humana sometidos a irradiación con luz UV, por lo que este compuesto podría ser útil en el tratamiento y prevención de la expresión de esta endoproteasa dependiente de Zinc, cuyo aumento en condiciones fisiológicas permite la normal remodelación del tejido dañado, pero que está vinculada también con el proceso de envejecimiento foto-inducido. (Hyung-In Moon *et al.* 2005)

Viola websteri, es una especie que contiene entre sus principios activos compuestos conocidos colectivamente como ácidos anacárdicos.

2. - Antecedentes

De *V. websteri* fueron aislados el ácido 6-(8'Z-pentadecenil)-salicílico (Figura 2.1) y el ácido 6-(8'Z, 11'Z, 14'Z-heptadecatrienil)-salicílico (Figura 2.1), que poseen actividad *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (Sung Jae Lee *et al.* 2009)

En experimentos *in vivo* para evaluar la actividad y empleando como modelo de estudio ratón infectado con *Plasmodium berghei*, el ácido 6-(8'Z-pentadecenil)-salicílico mostró actividad esquizotóxica en los primeros estadios de infección. (Ill-Min Chung *et al.* 2009)

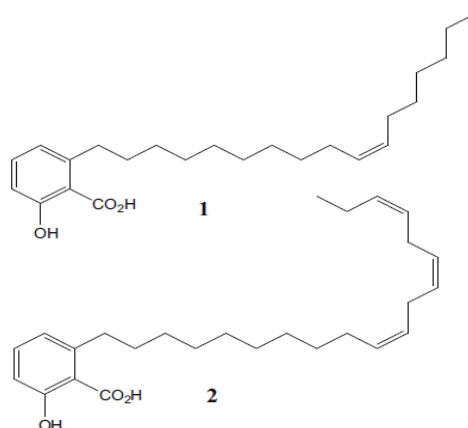


Fig. 2.1. Ácidos anacárdicos de *Viola websteri*

Los ácidos anacardicos han mostrado otras actividades y dentro de las que se destaca su actividad antioxidante derivada de su capacidad para quelar metales como Cu^{++} y Fe^{+++} , que participan como co-factores enzimáticos en la generación de radicales libres de oxígeno por reacciones tipo Fenton. Además pueden inhibir directamente a enzimas como la Xantina Oxidasa (Isao Kubo *et al.*, 2005) que produce estas especies reactivas como subproductos de su catálisis.

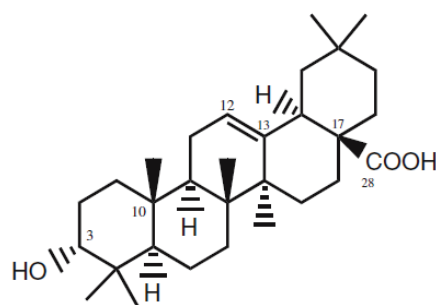
También han mostrado capacidad de ser activos contra varias líneas celulares cancerosas, sensibilizan células tumorales a la radioterapia, y a nivel molecular se ha comprobado que produce una inhibición potente sobre la activación del Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B) lo que posiblemente justifica su acción anti-angiogénica, anti-proliferativa y anti-metástica (Gomes de Melo *et al.*, 2011)

Son también inhibidores de Transacetilasas de Histonas (TAHs), enzimas que tienen como función modificar el grado de condensación de la cromatina y a través de

2. - Antecedentes

este mecanismo regulan varios procesos celulares y dentro de las vías involucradas están las de señalización para inflamación y cáncer (Massimo Ghizzoni, *et al.*, 2010)

En otra especie con antecedentes de uso tradicional, *Viola canescens*, utilizada en la región de Garhwal (India) para el tratamiento de infecciones por protozoarios y fiebre, se ha aislado a partir del extracto éter de petróleo un metabolito identificado como ácido epi-Oleanólico, el cual presenta una interesante actividad anti-plasmodial (Hyung-In Moon *et al.*, 2006)



Ácido epi-Oleanólico

Sin embargo, uno de los principios activos ampliamente distribuido en la familia *Violaceae* y que más ha llamado la atención en las dos últimas décadas es el de un tipo de Ciclopéptidos llamados **Ciclótidos** por acrónimo en inglés (*Cyclic peptides* = péptidos cíclicos). (Lars Bohlin, *et al* 2010)

Los ciclótidos constituyen uno de los ocho tipos en los que se han agrupado los ciclopéptidos.

Se definen como ciclopéptidos a compuestos cíclicos formados por 2 a 37 aminoácidos de tipos proteínicos así como no proteínicos pero en los que predominan los isómeros *L*.

Si el ciclo está constituido enteramente por enlaces peptídicos se los designa como homociclopéptidos de lo contrario se denominan heterociclopéptidos. (Ning-H Tan y Jun Zhou, 2006)

2. - Antecedentes

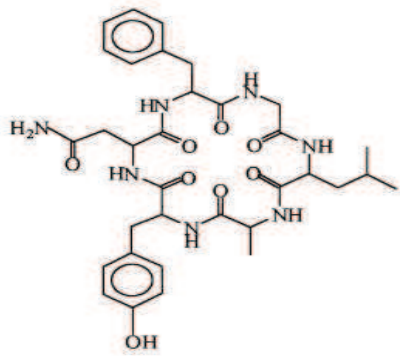


Fig. 2.2.
Homociclopeptido
Diantina - A
Ciclopeptido extraído de
Dithanus superbus (Caryophyllaceae)
(Wang Youichu, *et al.* 1998)

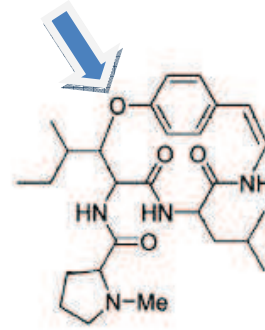


Fig. 2.3. Heterociclopeptido
Ceanotina-D
Ciclopeptido extraído de
Ceanothus americanus (Rhamnaceae)
(Ning-H Tan y Jun Zhou, 2006)

*La Flecha indica enlace tipo éter en lugar de peptídico

Fue a finales de la década del cincuenta del siglo XX que algunos grupos de investigación reportaron la presencia de varios ciclopeptidos de importancia. (Ning-Hua Tan y Jun Zhou, 2006)

Algunos de los ciclopeptidos poseen potentes efectos biológicos de tipos: citotóxica, inmunosupresora, antiplasmodial, vasorelajante, inhibidora de ciclooxigenasa, inhibidora de la ECA y Tripsina, entre otras. (Afef Dellai et al, 2010)

Uno de los sistemas que se han utilizado para clasificarlos los dividen en 8 Tipos, éstos son:

- Tipo I: Alcaloides Ciclopeptidos
- Tipo II: Depsiciclopeptidos
- Tipo III: Ciclopeptidos tipo Solanaceae
- Tipo IV: Ciclopeptidos tipo Urticaceae
- Tipo V: Ciclopeptidos tipo Compositae
- Tipo VI: Ciclopeptidos tipo Caryophyllaceae
- Tipo VII: Ciclopeptidos tipo Rubiaceae.
- Tipo VIII: Ciclotidos.

(XU WenYan, *et al.* 2008).

Algunos ejemplos de cada uno de los ocho tipos se incluyen en la siguiente tabla (tabla 1.1.):

Tabla 1.1. Clasificación y ejemplos de ciclopéptidos

Tipo	Ciclopéptido	Planta	Actividad del ciclopéptido	Referencia
I. Alcaloides Ciclopéptidos	sanjoinia A	<i>Zizyphus sp</i> (Rhamnaceae)	Sedante	XU WenYan, <i>et al.</i> 2008
	zizifinas	<i>Zizyphus oenoplia</i> var. <i>brunoniana</i>	antiplasmodial	Sunit Suksamrarn <i>et al.</i> 2005
II. Depsiciclopéptidos	FR 900359	<i>Ardisia crenata</i> (Myrsinaceae)	Hipotensora (en ratas anestesiadas)	Hua Tan y Jun Zhou, 2006
III. Ciclopéptidos tipo Solanaceae	luciuminas	<i>Lycium chinense</i> (Solanaceae)	Inhibidora de la Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)	Hua Tan y Jun Zhou, 2006
IV. Ciclopéptidos tipo Urticaceae	moroidina	<i>Laportea moroides</i> (Urticaceae)	Inhibidora de la polimerización de tubulina con mayor potencia que la Colchicina	Hua Tan y Jun Zhou, 2006
	moroidina	<i>Celosia argétea</i> (Amarantaceae)		
V. Ciclopéptidos tipo Compositae	astinas	<i>Aster tataricus</i> (Compositae)	Antitumoral	Rosanna Cozzolino, et al 2005
VI. Ciclopéptido tipo Cariophilaceae	ciclinopéptido A	<i>Linum usitatissimum</i> (Lináceae)	Inmunosupresora	Stefanowitz Piotr, 2004
VII. Ciclopéptidos Tipo Rubiaceae	bouvardina, deoxibouvardina	<i>Bouvardia ternifolia</i> (Rubiaceae)	Antitumoral <i>in vivo e in vitro</i>	Peter Seydel y Heike Dörnenburg, 2006
	RA-VII	<i>Rubia cordifolia</i> (Rubiaceae)		
VIII. Ciclotidos	Circulina A	<i>Chassalia parviflora</i> (Rubiaceae)	Antibacterial Anti HIV Citotóxica	Hua Tan y Jun Zhou, 2006

Uno de los Tipos de ciclopéptidos que ha tenido más atención en las últimas dos décadas es el Tipo VIII, también conocido como Ciclotidos. (Hua Tan y Jun Zhou, 2006)

La historia de su descubrimiento se remonta al año 1970:

2. - Antecedentes

Lorenz Gran, médico Noruego de la Cruz Roja en Congo, se percató del uso que los nativos del lugar hacían de una planta: *Oldelandia affinis* (Rubiaceae), con ésta preparaban una decocción y se la administraban a las embarazadas previo al parto, de esta manera se facilitaba la labor (Burman, 2011) pero al mismo tiempo se dio cuenta de las fuertes contracciones que se producían y de la inusual frecuencia de complicaciones en el parto que obligaban a practicar un alto número de cesáreas. (Trabi y Craik, 2004)

Gran, llevó muestras de esta planta a Noruega y realizó estudios en búsqueda del principio activo responsable de la actividad uterotónica, logrando identificar a la sustancia como un polipéptido.

Para el año 1973 logró secuenciar el péptido casi completamente y lo llamó Kalata B1 por el nombre nativo de la planta: Kalata-Kalata pero pasaron varios años y recién en 1995 se logró determinar por R.M.N. su estructura. (Burman R, 2011)

Los Ciclotidos contienen de 28 a 37 aminoácidos y poseen una extraordinaria estructura: son macrociclos cabeza-cola con tres enlaces disulfuro organizados en el motivo denominado Nudo Cíclico de Cistinas (Cyclic Cystine Knot o CCK) el cual está conservado dentro de la familia de ciclotidos y los hacen extremadamente estables ya que resisten degradaciones térmica, química y enzimáticas.

Adicionalmente, estas interconexiones en el ciclo obligan a sus regiones hidrofóbicas a exponerse en la superficie de la molécula. (Anders Herrmann, et al, 2007)

Otra característica definida por estos enlaces disulfuro es la presencia de lazos (Loops), que en número de 6 son los segmentos del péptido comprendidos entre cisteínas consecutivas involucradas en la formación del puente disulfuro. Uno de los aminoácidos que es fundamental en la estructura de los ciclotidos es Cis-prolina en el lazo 5, ya que define dos subfamilias de ciclotidos: Möbius y brazaletes (fig. 2.4.). Este aminoácido está presente en la primera subfamilia y ausente en la otra. (Jun Tang et al., 2010)

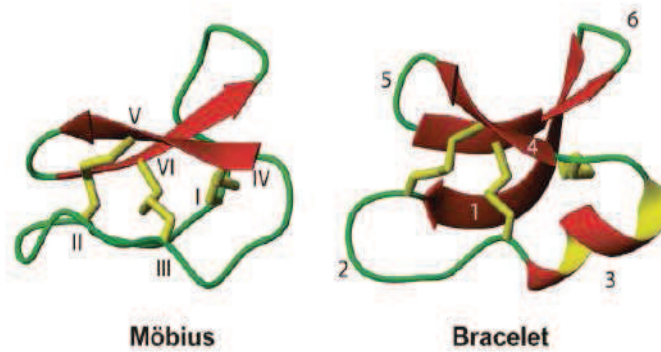


Fig. 2.4. Estructura esquemática de las dos subfamilias de ciclótidos: Moebius y brazalete. (Burman R, 2011)

Las plantas individualmente expresan grupos de muchos diferentes ciclótidos, su rol natural en éstas parece ser el de agentes de defensa principalmente contra insectos (David J. Craik, *et al.* 2010).

Este grupo de péptidos son genéticamente codificados a diferencia de la mayoría de péptidos cíclicos que se habían identificado con tamaños menores a 12 aminoácidos y que son sintetizados por las enzimas Sintetasas de Péptidos No – Ribosomales o NRPS (Non-Ribosomal-Peptido-Synthetase).

Los genes de los ciclótidos codifican para proteínas precursoras de 11 a 14 KDa, las cuales pueden contener hasta tres dominios de Ciclótidos maduros junto con la secuencia señal para el Retículo Endoplasmático (RE) (David J. Craik. *et al.*, 2010), un Pro-dominio y los dominios ciclótidos precedidos por una pequeña región repetida llamada Repetición N- Terminal o NTR (N- Terminal Repeat) (Norelle L Daly. *et al.*, 2009)

Si bien el procesamiento del precursor no se conoce totalmente se piensa que la escisión proteolítica y la ciclación estarían generadas por una asparaginil endopeptidasa (Janette Contreras, et al 2011; Saska et al., 2007)

OaK4



OaK2



Representación de dos proteínas precursoras de ciclótidos de *Oldelandia affinis*: OaK4 y OaK2. B2, B3 y B6 representan a los ciclótidos Kalata B2,B3 y B6 (Norelle L Daly. *et al.*, 2009)

2. - Antecedentes

Muchos ciclótidos fueron originalmente encontrados en programas de screening para actividades biológicas o en el caso de la actividad uterotónica, de su uso en medicina tradicional. (Bin Chen *et al.*, 2005)

Los estudios dirigidos a la búsqueda de ciclótidos, los han encontrado en todas y cada una de las especies de *Violaceas* estudiadas, por otro lado son menos frecuentes en las *Rubiaceae* (5%-10% de las aproximadamente 200 especies examinadas), en las *Cucurbitáceas* se ha estudiado una sola especie y se han encontrado 2 ciclótidos, además se ha reportado su presencia en la familia *Apocynaceae*. (Norelle L. Daly, *et al.* 2009) y en la familia *Fabaceae* (Julio A. Camarero. 2011)

Los ensayos *in vitro* realizados sobre parásitos de animales, permitieron comprobar un importante efecto de algunos de los ciclótidos de *Oldenlandia affinis* sobre *Hemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, demostrándose que constituyen potentes inhibidores del desarrollo de larvas de nematodos y letales para parásitos adultos aunque presentan una baja actividad ovicida. (Colgrave *et al.*, 2008)

También se han estudiado posibles usos en el control de plagas de cultivos, los ciclótidos han mostrado actividad molusquicida ensayada contra *Pomacea canaliculata*; los ciclótidos *kalata B1* y *kalata B2* de *O. affinis* y *cicloviolacina O1* de *V. Odorata* exhiben una actividad superior a la del propio metaldehído, que es tradicionalmente empleado en el control de gasterópodos. (Manuel Rey R Plan, *et al.* 2008; Pranting, 2002). Estas actividades se resumen en la tabla 2.2.

Los diferentes campos de aplicación que tienen los ciclótidos han despertado mucho interés y han llevado a investigar la posibilidad de emplear el cultivo *in vitro* como herramienta para conseguir su producción. El cultivo por ésta técnica de *O. affinis* abre las puertas a la posibilidad de que en un futuro se pueda obtener rendimientos convenientes por medios biotecnológicos. (Peter Seydel y Heike Dörnenburg, 2006) Además se ha empezado la investigación de su expresión heteróloga en bacterias. (Julio A. Camarero, *et al.* 2007)

2. - Antecedentes

El interés en los ciclótidos va mas allá de las actividades que ya han demostrado. En efecto, debido a las características de estabilidad que presentan se podrían lograr modificaciones en esta estructura mediante la incorporación de secuencias de aminoácidos con el fin de conseguir nuevas estructuras con potenciales aplicaciones farmacéuticas y agroquímicas adicionales a las que ya se han mencionado. (Craik *et al.*, 1999)

Tabla 2.2. Ejemplos de ciclótidos, sus fuentes de obtención y actividades

Ciclótido	Planta	Actividad
Kalata B1	<i>Oldelandia affinis</i> <i>Viola odorata</i> <i>Viola baoshanensis</i> <i>Viola yedoensis</i>	Nematocida Molusquicida Insecticida Anti-HIV Antibacterial Inhibición de proteasas
	<i>Viola odorata</i>	Nematocida Molusquicida
Kalata B2	<i>Oldelandia affinis</i>	Nematocida Moluscida Insecticida
Palicourein	<i>Palicourea condensata</i>	Anti- HIV
	<i>Viola odorata</i> <i>Viola biflora</i>	Nematocida Toxicidad para células cancerosas
Ciclopsicotrida A	<i>Psychotria longipes</i>	Inhibidor de Neurotensina

Tomado de Cybase (2011)

2.2.- *Viola arguta* Willd. ex Roem. & Schult

Nombre común en el Ecuador: Violeta del campo o Violeta Roja

Es una especie de la Familia *Violaceae* que puede ser encontrada en la zona sur-andina del Ecuador en las Provincias de Zamora-Chinchipec y Loja a altitudes entre 1500 y 3500 msm, (Izco *et al.*, 2007).

Jesus Izco no hace referencia a su presencia en otras provincias de este país, debido a que en su estudio se ha limitado a las provincias antes mencionadas. Sin embargo, en el Catalogo de plantas vasculares de Ecuador (2011) se cita su existencia

2. - Antecedentes

en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Morona-Santiago, Pichincha, Zamora-Chinchipe (Ver fig 2.5.)

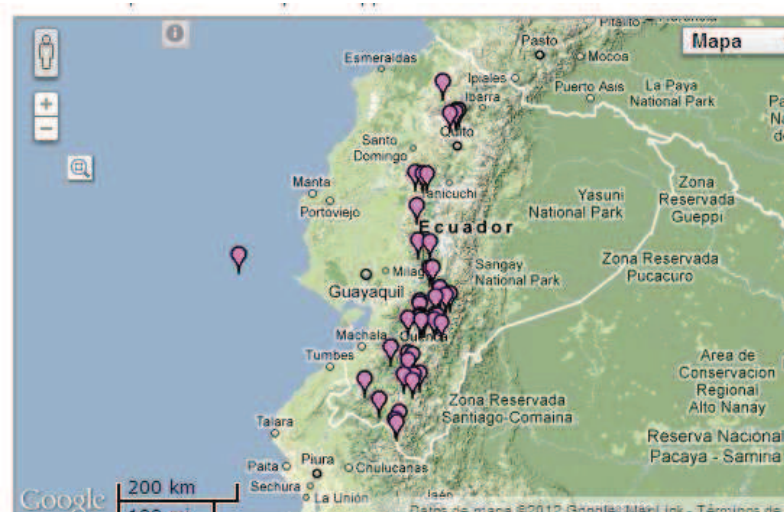


Fig. 2.5. Distribución geográfica de *V. arguta*
<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=50073572&projectid=2>

Su tamaño supera los 0,5m de longitud, el tallo es leñoso. Sus pétalos son de color rojo, anteras amarillas y estilo rojo.

Tiene algunos usos en medicina tradicional: los habitantes de las provincias antes mencionadas preparan una infusión con partes aéreas de esta planta y se menciona que es utilizada para tratar influenza y fiebre. (Tene Vicente *et al.*, 2006).

También se registra su uso medicinal en la provincia del Cañar, ubicada en el Centro- Sur del Ecuador, donde es utilizada por las personas de esta zona para “el dolor de huesos” según su propia expresión.

También existen referencias del uso de esta planta en medicina tradicional en Colombia. Específicamente María Cristina Arango Mejía en su libro: “*Plantas medicinales: botánica de interés medico*” (2006) menciona a *Viola arguta* como una planta utilizada con fines terapéuticos en el Departamento del Putumayo, que está ubicado en la frontera con Ecuador, aunque no especifica cuáles son estos usos medicinales .

3.- Objetivos

3.1.- Objetivo general

El presente trabajo de investigación se encuentra dirigido a la micrográfica, ensayos fitoquímico y de bioactividades de *Viola arguta* (Violaceae), ya que no existen datos analíticos que permitan su correcta identificación, o estudios fitoquímicos o farmacológicos que posibiliten la justificación de su uso tradicional o ausencia de toxicidad.

Por tratarse de una especie de uso medicinal es necesario definir características botánicas macro y microscópicas para su correcta identificación e investigar los grupos fitoquímicos presentes, estableciendo perfiles cromatográficos para su reconocimiento.

El **objetivo general** es contribuir a la revalorización de la flora autóctona latinoamericana, para su mejor aprovechamiento medicinal.

3.2.- Objetivos específicos

- Efectuar ensayos químicos preliminares y determinación de perfiles cromatográficos (Cromatografía en capa delgada) de los extractos de *V. arguta*.
- Determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro*.
- Establecer los elementos de diagnóstico micrográficos y valores numéricos de las hojas de *Viola arguta*.
- Establecer la presencia de metabolitos secundarios característicos del género *Viola*

4.- Materiales y métodos.

4.1.- Material vegetal

4.1.1.- Procedencia

Las plantas de *Viola arguta* Willd. ex Roem. & Schult. fueron recolectadas el 21 de marzo de 2011 en la Parroquia Baños del Cantón Cuenca, en la Provincia del Azuay, República del Ecuador.

El sitio de recolección corresponde a una colina que se encuentra en la carretera Baños – Insayana a una altura de 2.800 msnm, siendo sus coordenadas: S: 2° 55' 13" W: 79° 04' 47" ("Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador").



Fig.4.1. Etapas de la recolección del material vegetal

4. - Materiales y métodos

4.1.2.- Recolección y acondicionamiento del material vegetal

Para el desarrollo del trabajo se utilizó material fresco correspondiente a la parte aérea vegetativa de la planta. La recolección se realizó en forma manual con el empleo de tijera de jardinería.

Para la realización de los estudios botánicos, varios ejemplares de la planta fueron acondicionados para su herborización, mientras que otra parte del material vegetal se fijó en líquido conservador: FAA (Formol- alcohol etílico 96º - ácido acético glacial- agua destilada 50:25:250:175)

El resto del material vegetal obtenido fue acondicionado y secado en estufa con convección forzada de aire a 37⁰ C por 5 días en el laboratorio del Proyecto de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca, por gentileza de la Dra. Raffaella Ansaloni y posteriormente acondicionado en bolsas de papel tipo empaque.

En esas condiciones, el material fue transportado hacia Argentina a la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata. Allí, a los efectos de la realización de los estudios fitoquímicos, fue molido y conservado en recipientes de cierre perfecto y al abrigo de la luz.

Un ejemplar del material herborizado (fig. 4.2.) fue depositado en el Museo "Carlos Spegazzini", de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, bajo el registro (LPE-1161).

4.1.3.- Determinación taxonómica

La determinación de la especie fue realizada por la Profesora Dra. Raffaella Ansaloni, Directora del Herbario de la Universidad del Azuay (HA-7827) y confirmada por la Dra. Etilde D. Spegazzini de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, Argentina.

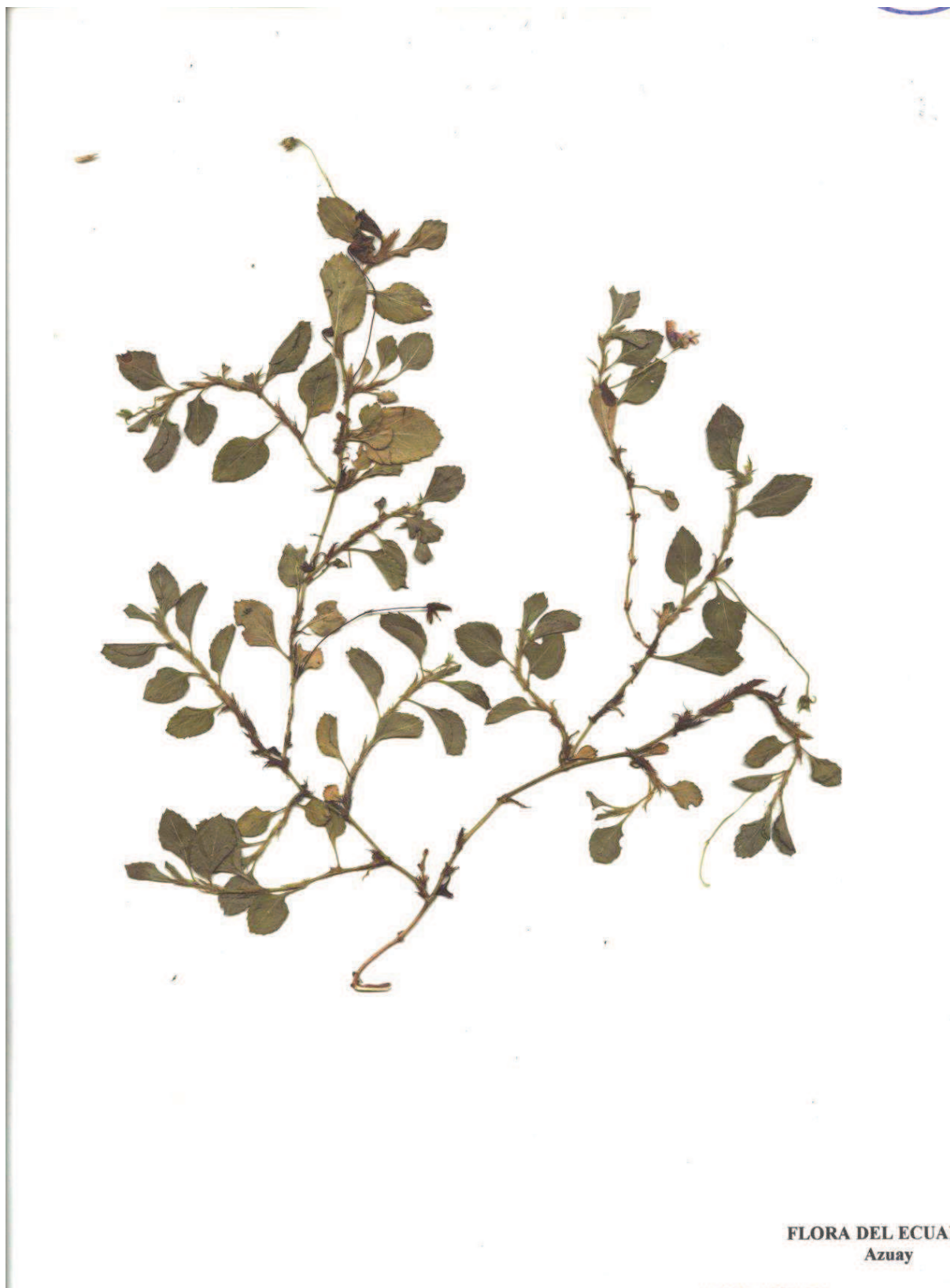


Fig. 4.2. Ejemplar de *V. arguta* HA-7827

Recolector: J.M. Carpio Arevalo

Foto: HA

4.2.- Microscopía analítica

4.2.1.- Equipos utilizados

Las observaciones se efectuaron con microscopio estereoscópico Iroscope YZ-6 y microscopio óptico (MO) Olympus CX31 equipado con tubo de dibujo Iroscope. Las microfotografías fueron tomadas Cámara Fotográfica Olympus Camedia y software y con una cámara digital Samsung.

Las observaciones y microfotografías con microscopio electrónico de barrido (MEB) fueron realizadas con un equipo Philips 505 perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge J. Ronco” (CINDECA), CONICET, UNLP.

4.2.2.- Observación de epidermis foliar con microscopio óptico (MO)

Diafanización de las hojas

El procedimiento de diafanización según técnica de Dizzeo de Stritmatter (1973) se llevó a cabo aplicando el siguiente protocolo:

- Se colocaron hojas de *Viola arguta* en un vaso precipitado con un volumen suficiente de etanol de 96º y se llevó a ebullición durante 5 minutos.
- Se agregó igual volumen de hidróxido de sodio al 5% y se mantuvo en ebullición por 1 minuto.
- Las hojas se lavaron con agua destilada varias veces hasta eliminar el álcali.
- Se colocaron en hipoclorito de sodio comercial diluido al 50% hasta decoloración total.
- Se lavaron con agua destilada varias veces hasta eliminar el decolorante.
- Se colocaron en una solución de Hidrato de Cloral (5 gr. en 100 ml) por 24 horas.

4. - *Materiales y métodos*

-El material transparente de hoja fue lavado y montado en gelatina glicerina.

Estos preparados permitieron analizar la distribución de estomas y tricomas en la parte media y sobre ambas caras de la lámina. Los recuentos de células epidérmicas, estomas y células en empalizada permitieron establecer los valores numéricos proporcionales correspondientes a los índices de estomas (Salisbury, 1927) y empalizada (Zornig y Weiss, 1925).

Determinación de valores numéricos o magnitudes proporcionales

- Determinación del índice de estomas

Esta determinación se realizó en base al valor numérico definido por Salisbury (1927), quien define al índice de estomas como la relación existente entre el número de estomas y el número total de células por unidad de superficie.

$$IS = \frac{S}{S + E} \times 100$$

IS: Índice de estomas

S: número de estomas

E: número de células epidérmicas

Se trabajó con 25 muestras de hojas diafanizadas de *V. arguta*, para cada una de las cuales se repitió el conteo de estomas y células epidérmicas en diez campos distintos y seleccionados. Los campos observados fueron dibujados mediante el tubo de dibujo en unidades de superficie representadas por cuadrados de 10 cm de lado.

- Determinación del índice de empalizada

Esta magnitud representa el promedio de células en empalizada que aparecen por debajo de cada célula epidérmica.

Se obtiene contando el número de células en empalizada que se encuentran debajo de cuatro células epidérmicas y dividiendo por cuatro

$$IE = \frac{E}{4 E_p} \times 100$$

4. - *Materiales y métodos*

IE: índice de empalizada

E: número de células en empalizada

Ep: Célula epidérmica

Veinticinco muestras correspondientes a fragmentos de 5 mm de lado, de las hojas diafanizadas de *V. arguta* fueron examinados en visión frontal o adaxial. De esta manera, las células en empalizada aparecen como pequeños círculos por debajo de las células epidérmicas. Se efectuaron observaciones microscópicas de 5 campos para cada muestra, realizándose los diseños correspondientes con el tubo de dibujo, obteniéndose los valores promedio.

Todos los valores obtenidos de cada parámetro se expresaron en rangos, promedio y moda (Mo).

4.2.3.- Observación de la epidermis foliar con microscopio electrónico de barrido (MEB)

Porciones de 1mm de pecíolo y lámina foliar fueron fijadas en FAA, deshidratadas hasta alcohol etílico absoluto y secadas al aire. Las muestras montadas sobre un soporte metálico fueron cubiertas con una fina capa conductora de oro-paladio. Se registraron imágenes digitalizadas de las estructuras del pecíolo, lámina y cristales con el uso de un microscopio electrónico de barrido Philips.

4.3.- Ensayos fitoquímicos

4.3.1.- Preparación de los extractos

* Extracción con solventes de polaridad creciente

a) Extracción para los ensayos fitoquímicos preliminares y actividades biológicas *in vitro*

El material seco y molido (10 g) fue extraído a temperatura ambiente con hexano (Hx), durante 24 horas con agitación frecuente. Luego de este tiempo se repitió el procedimiento. Los extractos se filtraron por papel y se reunieron.

El marco de la extracción anterior se dejó secar a temperatura ambiente y se volvió a extraer con diclorometano (DCM) como segundo solvente de extracción, procediendo de igual manera que con el solvente anterior. El procedimiento se repitió, utilizando metanol (MeOH).

Los solventes utilizados fueron solventes Merck grado analítico.

Los solventes fueron evaporados a presión reducida en un evaporador rotatorio Heidolph y el rendimiento fue calculado en gramos de extracto/100 gramos de planta seca.

Con los extractos así obtenidos se efectuaron los ensayos químicos y cromatográficos preliminares.

b) Extracción de ciclótidos a partir de un extracto en MeOH 60% (Método de Claeson y Burman modificados)

Los ciclótidos presentes en *V. arguta* fueron extraídos y semipurificados mediante un procedimiento basado en los trabajos de Claeson et al (1998) y Burman et al. (2010), que hemos modificado según el siguiente protocolo:

El material seco y molido (10 g) fue extraído a temperatura ambiente con hexano (Hx), durante 24 horas con agitación frecuente. Luego de este tiempo se repitió el procedimiento. Los extractos se filtraron por papel y se reunieron.

El marco de la extracción anterior se dejó secar a temperatura ambiente y se volvió a extraer con diclorometano (DCM) como segundo solvente de extracción, procediendo

4. - *Materiales y métodos*

de igual manera que con el solvente anterior. El procedimiento se repitió, utilizando una solución de Metanol al 60% (Burman et al., 2010)

Evaporar a sequedad el extracto MeOH 60%.

Retomar el extracto seco con MeOH 99,9% (10 ml), transferir a un tubo de centrifuga y añadir 1 ml de diclorometano. Centrifugar durante 10 min.

Desechar el sobrenadante y lavar 3 veces con MeOH/DCM 10:1.

Redisolver el precipitado con MeOH 60%

c) Extracción de ácidos orgánicos a partir del extracto hexánico (Soares Costa Oliveira et al., 2011)

Macerar 10 g de material vegetal con 40 ml de hexano

Filtrar

Diluir el filtrado con 30ml de MeOH 5%

Añadir 2,5g de Ca (OH)₂, poco a poco y con agitación constante

Elevar la temperatura a 50° C con agitación constante por 3 hs

Filtrar y lavar el precipitado con MeOH en embudo Buchner

Secar el precipitado en estufa a 45-50° C durante 2 hs

Resuspender en 40 ml de agua destilada, conteniendo 5,45 ml de HCl 11M.

Agitar durante 1 hs

Extraer la solución resultante con Acetato de etilo (14 ml x 2)

Lavar la capa orgánica con agua desionizada y secar sobre SO₄Na₂ anhidro.

Evaporar el acetato de etilo hasta pequeño volumen.

* Extracción acuosa

Las partes aéreas de *Viola arguta* (hojas, tallos y flores) fueron extraídas con agua, mediante una infusión realizada con 10g de planta pulverizada en 100ml de agua destilada durante 15 minutos. El extracto acuoso así obtenido se liofilizó en un equipo liofilizador L-T4 Rificor y se calculó su rendimiento en g de liofilizado/100 g de planta.

4. - Materiales y métodos

Sobre este liofilizado se efectuaron ensayos químicos preliminares, y los ensayos de actividad *in vitro*.

4.3.2.- Pruebas químicas orientativas

1) Detección de Alcaloides:

Para la extracción de los alcaloides que podrían estar presentes en el material vegetal se procedió a utilizar el método de extracción en medio ácido, proceso que permite que estos metabolitos formen sales solubles en agua.

Para esto se pesaron 10 g de *Viola arguta* seca y pulverizada, se maceraron por 24 horas con 40 ml de ácido clorhídrico al 2%, transcurrido este tiempo se filtró y se distribuyeron 20ml del filtrado en 4 tubos de ensayo (5ml c/u) sobre los que se adicionaron 2 o 3 gotas de cada uno de los reactivos para precipitación de alcaloides: Dragendorff, Mayer, Acido Tánico y Bouchardat. (Domínguez, 1973)

Caracterización de alcaloides

- Dragendorff : Reacción de precipitación
- Mayer: Reacción de precipitación
- Acido Tánico: Reacción de precipitación
- Bouchardat: Reacción de precipitación

2) Detección de Antraquinonas (Aglicones y Heterósidos)

Para la extracción de los aglicones y heterósidos de antraquinonas que podrían estar presentes en la plantas se procedió a una extracción con ácido sulfúrico 1M y la detección de antraquinonas se realizó usando la reacción de Borntrager.

Se pesó 1 g de *Viola arguta* seca y pulverizada, se añadieron 10 ml de H₂SO₄ 1M y se calentó a ebullición en Baño de María por 10 minutos, transcurrido este tiempo se filtró en caliente, una vez frío tomamos 5 ml de filtrado para realizar una extracción

4. - Materiales y métodos

Líquido-Líquido utilizando 3 ml de Cloroformo, se separó la fase orgánica y se añadieron sobre ésta 3ml de Amoniaco concentrado (Reacción de Borntrager), de estar presentes aglicones libres en la planta o aglicones que se liberan de sus azúcares (heterósidos) en la hidrólisis del proceso anterior, debía producirse un color rojo-rosa intenso en la capa amoniacal (Domínguez, 1973).

Caracterización de Antraquinonas

- Reacción de Borntrager

3) Detección de Saponinas.

Para la detección de saponinas se procedió a investigar su presencia los extractos Metanólico y Acuoso poniendo en evidencia su capacidad afrógena.

Para esto se colocaron 4 ml de cada uno de los extractos en tubos de ensayo junto con 4ml de agua destilada, se agitaron vigorosamente por 30 segundos y se observó si se generó la formación de espuma estable (Domínguez, 1973)

Caracterización de Saponinas

- Capacidad afrógena

4) Detección de taninos

La investigación de la presencia de Taninos se efectuó en los extractos metanólico y acuoso.

La reacción para identificarlos se realizó añadiendo a 5 ml de los extractos señalados 3 gotas de Cl_3Fe al 10% y observando el cambio de coloración producido. (Domínguez, 1973)

Caracterización de Taninos

- Cl_3Fe

5) Detección de Mucílagos y gomas

Los mucílagos se investigaron únicamente en el extracto acuoso por ser insolubles en el resto de solventes utilizados.

Su caracterización se basa justamente en la insolubilidad de estas sustancias en alcohol y que se verifica por la precipitación que se da al añadir etanol al extracto acuoso que los contenga.

Se toman 10 ml de extracto acuoso y se añade poco a poco etanol absoluto, la formación de un precipitado es presuntiva de la presencia de gomas o mucílagos. (Korwar et. Al, 2010; FA VI ed, 1978)

Además de este ensayo, se realizó una reacción histoquímica consistente en tratar el preparado de hoja en vista superficial con una solución diluida de azul de metileno, con el cual, algunos mucílagos adquieren una coloración azul (Trease y Evans, 2008)

Caracterización de Mucílagos y gomas

- Precipitación con etanol absoluto
- Reacción histoquímica con azul de metileno

6) Detección de flavonoides

La identificación de flavonoides se realizó en todos los extractos y se empleó para tal propósito la reacción de Shinoda.

A 3 ml de cada uno de los extractos se les agregó unos pocos fragmentos de Magnesio metálico seguido de unas 5 gotas de HCl concentrado, la presencia de un color magenta indica la presencia de flavonoides.

Alícuotas de los extractos Hexánico, DCM, MeOH y acuoso obtenidos fueron retomados con sus correspondientes solventes y sometidos a una serie de ensayos químicos destinados a poner de manifiesto la presencia de los diferentes grupos fitoquímicos. (Domínguez, 1973)

Caracterización de flavonoides:

- Reacción de Shinoda
- Reacción con Cl_3Fe al 2% en EtOH y observación visible
- Reacción con Cl_3Al al 2% en EtOH y observación visible y UV366
- Reacción con H_3BO_3 al 2% en EtOH y observación visible y UV366
- Reacción con KOH al 1% en EtOH y observación visible y UV366

4.3.3.- Cromatografía en capa delgada (CCD):

Las cromatografías se efectuaron sobre cromatofolios de silicagel 60 GF254 Merck 0,25 mm (origen Alemania)

4.3.3.2.- Fases móviles utilizadas

Fase	Solventes	Proporción
I	Acetato de etilo/Metanol/Agua	100:13,5:10
II	Hexano/Acetato de Etilo	7:3
III	Tolueno/Acetato de etilo	7:3
IV	Butanol/ Acido Acético/ Agua	3:1:1
V	Toleno/acetato de etilo	8:2
VI	Eter etílico/éter de petróleo/ acido formico	70:30:1
VII	Acetato de etilo/ acido acetico/ acido formico/ agua	100:11:11.26

4.3.3.3.- Detección

Los reveladores utilizados en las CCD fueron:

- i. Observación a la luz ultravioleta de 254nm y 366 nm + vapores de NH_3
- ii. Pulverización con reactivo de productos naturales (éster del acido 2-amino etil difenil borico al 1% en metanol) + calor y posterior observación al visible y al UV₃₆₆
- iii. Pulverización con Anisaldehido sulfúrico y calentamiento en estufa a 120°C durante 5 minutos. Observación al visible

4. - *Materiales y métodos*

- iv. Pulverización con solución diclorometánica al 1% de β -caroteno.y observación al visible a tiempo 0, 30 y 60 minutos.
- v. Pulverización con Ninhidrina al 0,2% en Etanol Absoluto
- vi. Pulverización con Azul Brillante de Coomassie G-250
- vii. Pulverización con Azul de bromofenol al 0,1% en etanol
- viii. Pulverización con Cl_3Fe al 10 %

4.3.3.4- Testigos utilizados

Para el análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se utilizaron con fines comparativos los compuestos: (aclarar en cada uno marca y/u origen)

- **Rutina (Rt)** (provisto por la Cátedra de Farmacognosia, Fac. de Cs. Exactas, UNLP)
- **Quercetina (Q)** (provisto por la Cátedra de Farmacognosia, Fac. de Cs. Exactas, UNLP)
- **Acido Salicílico (AS)** (gentilmente provisto por la Mg. Maria E. Del Valle (Cátedra de Farmacognosia, Fac. de Cs. Exactas, UNLP)
- **Salicilato de metilo (SM)** (gentilmente provisto por la Mg. Maria E. Del Valle (Cátedra de Farmacognosia, Fac. de Cs. Exactas, UNLP)
- **Vitexina** (Cátedra de Farmacognosia, Fac. de Cs. Exactas, UNLP)
- **Isovitexina** (Cátedra de Farmacognosia, Fac. de Cs. Exactas, UNLP)

4.3.3.5.- Sistemas cromatográficos utilizados para los distintos extractos

Los sistemas cromatográficos utilizados para examinar los extractos obtenidos, surgen de la combinación de fase estacionaria, fases móviles y sistemas de detección descriptos en los ítems anteriores.

Se detallan en las siguientes tablas:

4. - Materiales y métodos

Tabla Sistemas cromatográficos utilizados para CCD de los extractos Hexánico y DCM

Sistemas cromatográficos	Fase móvil	Revelador
1	II	i, ii, iii, iv
2	III	i, ii, iii, iv
2b	VI	lii, vii

Tabla Sistemas cromatográficos utilizados para la CCD del extracto Metanólico

Sistemas cromatográficos	Fase Móvil	Revelador
3	I	i, ii, iii, iv
4	II	i, ii, iii, iv
5	III	i, ii, iii, iv
6	V	vi

Tabla Sistemas cromatográficos utilizados para la CCD del extracto Metanólico al 60%

Sistemas cromatográficos	Fase Móvil	Revelador
4	IV	i, ii, v, vi

4.3.4.- Caracterización de ciclótidos por CCD

El extracto Metanólico al 60% obtenido por el método de Claeson y Burman modificado, se sembró en tres placas de sílica gel (Placas A, B y C) que se desarrollaron simultáneamente en las condiciones del sistema cromatográfico antes indicado (Sistema IV).

4. - Materiales y métodos

Concluido el desarrollo se evaporó la fase móvil y se colocó una de las placas (A) suspendida en un tubo de vidrio tapado junto a 1 ml de HCl (37%) y se lo sometió a calentamiento en una estufa a 110⁰C por 2 horas para generar la hidrólisis de los péptidos presentes.

Pasadas las dos horas se sacó la placa del tubo, se eliminó totalmente el HCl en corriente de aire caliente y se reveló

La placa C (no hidrolizada) se reveló con el Azul Brillante de Coomassie mientras que la placa A (hidrolizada) y la placa B (no hidrolizada) se revelaron con ninhidrina al 0,2% y calentando con corriente de aire caliente durante varios minutos.

4.3.5.- Detección de ácidos por CCD

La solución obtenida en 4.3.1. c (ver materiales y métodos) fue cromatografiada utilizando el sistema 2b (Eter etílico/éter de petróleo/ ácido formico) y revelada alternativamente con anisaldehido sulfurico y azul de bromofenol.

4.4.- Actividades

4.4.1.- Actividad antioxidante por métodos espectrofotométricos

La ingesta de productos naturales con capacidad antioxidante suele ser relacionada con el efecto beneficioso de éstos en la prevención y/o tratamiento de diversas enfermedades tales como cáncer, enfermedades coronarias, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedades respiratorias, fibrosis quística, enfermedades del sistema inmune, Alzheimer, etc. (Ing-Chien Chen, et al.,2004; Pham-Huy e al., 2008; Pourahmad, 2002)

Entre los metabolitos secundarios con capacidad antioxidante que pueden estar presentes en estos productos podemos citar ácidos fenólicos, flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanos, estilbenos, taninos, alcaloides, aminos, betalainas, vitaminas, terpenoides, etc. (Yizhong Cai, et al., 2003)

4. - Materiales y métodos

En general, las determinaciones de la capacidad antioxidante de un extracto constan de una serie de etapas comunes a todas ellas, que pueden resumirse:

- Preparación del extracto.
- Preparación de solución madre de extracto:
 - ✓ disolución de 10 mg de extracto seco en 1ml dimetilsulfoxido (DMS).
 - ✓ Preparación de diluciones en DMS
- Preparación del Standard (St):
 - ✓ disolución de 10 mg de standard en 1ml DMS.
 - ✓ Preparación de diluciones en DMS
 - ✓ Construcción de curva patrón.
- Realización de las reacciones según cada ensayo, buscando que cada dilución de extracto quede en el rango de absorción de la curva de calibración.
- Cálculo como equivalentes de St /mg de extracto seco.

La actividad antioxidante de los extractos de *V. arguta*, fue ensayada mediante distintos métodos *in vitro*, en comparación con patrones conocidos tales como ácido ascórbico, Trolox, ácido tánico, rutina, etc. (Cavin *et al.* 1998; Kuskoski *et al.*, 2005; Muñoz Jáuregui *et al.*, 2007; Aubad López *et al.*, 2007; Neira González , 2009). También fue determinada la concentración de flavonoides y fenoles totales.

4.4.1.1.- Actividad frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Esta determinación se realizó mediante el método de Brand Williams *et al.* (1995), modificado.

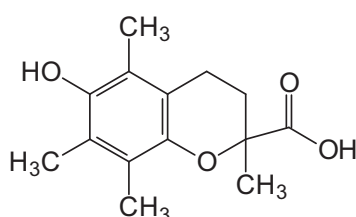
Esta técnica se basa en la reducción que sufre el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) en presencia de un antioxidante, pasando del color violeta intenso que exhibe la forma oxidada al incoloro de la forma reducida.

La decoloración producida se traduce en una disminución de la absorbancia a 517 nm (A_{517}), proporcional a la concentración del DPPH reducido, y permite

4. - Materiales y métodos

cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos.

La capacidad antioxidante de los compuestos presentes en un extracto, puede ser expresada como actividad antioxidante equivalente, (TEAC en μg compuesto referencia/mg muestra), a un antioxidante de referencia: el 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) (PM 250,3) (Aubad López *et al.*, 2007).



Según el protocolo de Cavin *et al.* (1998) se introduce en un tubo de reacción 7,5 μL de la muestra a ensayar, vehículo o compuestos de referencia (2,6-di(ter-butil)-4-metilfenol o BHT, quercetina, trolox) a las concentraciones estudiadas, 250 μL de agua destilada y 500 μL de la disolución de DPPH (20 mg/mL). Tras incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min, se lee la absorbancia a 517 nm.

Curva de calibración: se realiza aplicando el protocolo descrito precedentemente y determinando la A_{517} para soluciones de trolox a distintas concentraciones. La actividad de los antioxidantes de la muestra, expresados como μg trolox/mg extracto seco, puede ser calculada a partir del gráfico A_{517} vs. [μg trolox]

Preparación de la muestra a ensayar: 10 mg de los extractos a ensayar se disolvieron a un volumen final de 1 ml con DMSO. De esta solución madre se tomaron 7,5 μl y se llevaron a 100 μl con DMSO. Para la mezcla de reacción se tomaron 10 μl de esta dilución y se llevaron a un volumen final de 1 ml.

Preparación de la solución de DPPH (20 mg/L): 10 mg DPPH se disuelven con cantidad suficiente de MeOH hasta 50 ml. Esta solución madre se conserva a 4°C en envase de vidrio color caramelo y envuelto en papel de aluminio.

4. - Materiales y métodos

El ensayo se realiza con una dilución 1/10 de la solución madre, en MeOH.

El ensayo con DPPH se realiza según el siguiente protocolo:

Ensayo con DPPH				
	Blanco Control (-)	Control (-)	Blanco Muestra	Muestra
Muestra	-	-	7.5 µL	7.5 µL
Vehículo	7.5 µL	7.5 µL	-	-
AD	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
DPPH (20mg/L)	-	500 µL	-	500 µL
MetOH	500 µL	-	500 µL	-
Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min				
Leer la absorbancia a 517 nm.				

4.4.1.2.- Actividad frente al radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)

El ensayo se efectuó según la metodología desarrollada por Re *et al.*, (1999). Esta técnica se basa en la reducción que sufre el radical catiónico 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS^{•+}) en presencia de un antioxidante, pasando del color verde que exhibe la forma oxidada (ABTS^{•+}) al incoloro de la forma reducida (ABTS).

El radical ABTS^{•+} presenta cuatro máximos de absorción a 414, 645, 732 y 815 nm lo cual permite seleccionar la longitud de onda adecuada para evitar interferencias con los compuestos presentes en la muestra a estudiar. En el caso de los extractos de *V. arguta*, la decoloración producida se traduce en una disminución de la absorbancia a 732 nm (A_{732}), proporcional a la concentración del ABTS reducido, y permite cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados compuestos (Kuskoski *et al.*, 2004).

4. - Materiales y métodos

El radical $ABTS^{\bullet+}$ se formó tras la reacción de ABTS (3,5mM) con persulfato potásico (1,25 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó con etanol hasta obtener un valor de absorbancia de $0,700 \pm 0,100$ a 732 nm (longitud de máxima absorción).

Las muestras filtradas se diluyeron con etanol hasta que se obtuvo un 20-80% de inhibición comparadas con la absorbancia del blanco tras añadir 20 μ l de la muestra. A 980 μ l de dilución del radical $ABTS^{\bullet+}$ así generado se le determina la A_{732} a 30°C, se añade 10 μ l de la muestra y se mide de nuevo a A_{732} pasado 1 minuto. La absorbancia fue continuamente medida después de 4 minutos. Se ensayaron extractos en un rango de concentración final entre 1 y 200 μ g/ml.

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el cambio de A_{732} de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ cuando se alcanza el estado estacionario (Aubad López *et al.*, 2007)

Curva de calibración: se realiza aplicando el protocolo descrito precedentemente y determinando la A_{517} para soluciones de trolox a concentración de 0-15 μ M (concentración final) en etanol. La actividad de los antioxidantes de la muestra, expresados como μ g trolox/mg extracto seco (TEAC), puede ser calculada a partir del gráfico A_{732} vs [μ g trolox]

Preparación de la muestra a ensayar: 10 mg de los extractos a ensayar se disolvieron a un volumen final de 1 ml. De esta solución madre se tomaron 10 μ l que se diluyeron a 40 μ l finales (dilución 1:4). Para la mezcla de reacción se tomaron 10 μ l de esta dilución y se llevaron a un volumen final de 1 ml.

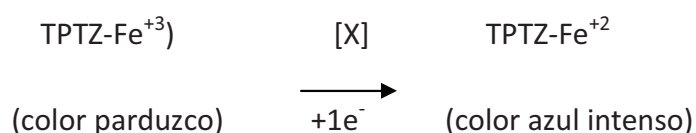
4.4.1.3. Evaluación de la capacidad reductora por el método FRAP

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra biológica de acuerdo a su capacidad para reducir un determinado compuesto. Originariamente este método se lo denominó "Ferric reducing ability of plasma" (FRAP) porque fue utilizado

4. - Materiales y métodos

para medir la actividad antioxidante del plasma humano. Actualmente se lo denomina “Ferric reducing/antioxidant power” y su utilización se ha extendido al estudio de diferentes compuestos, mezclas o extractos biológicos.

El fundamento del método consiste en la reducción de un compuesto o mezcla de compuestos (**X**) sobre el Fe^{+3} presente en un complejo con un compuesto orgánico: Tripyridyltriazina (TPTZ). Cuando el hierro del complejo es reducido a la forma ferrosa toma un color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm y cuya intensidad de color es proporcional a la capacidad reductora del compuesto o compuestos ensayados (Benzie et al., 1996).



La determinación de la capacidad reductora se lleva a cabo en tampón acético - acetato de sodio 0,3 M a pH 3,6 conteniendo TPTZ (1 mM) y FeCl_3 (2 mM). Las soluciones deben ser preparadas el mismo día del ensayo.

Para la medida de la capacidad antioxidante se mezcla un volumen de la muestra con 10-100 volúmenes del reactivo recientemente preparado. Se determina la absorbancia a 593 nm se compara con la obtenida en una determinación paralela utilizando una sal de Fe^{+2} (FeSO_4 , 100 – 1000 μM) o Acido Ascórbico (5 a 25) como compuesto de referencia.

Las actividades de las muestras en estudio se expresan como equivalentes de Fe^{+2} o de ácido ascórbico. También se puede utilizar ácido ascórbico como compuesto de referencia. Los volúmenes a utilizar dependerán de los instrumentos disponibles ya que la determinación se puede realizar en forma automatizada o manual.

El tiempo que se requiere para completar la reacción puede ser muy variable en función de los compuestos o mezclas de ellos a estudiar, variando desde segundos hasta minutos, aunque se considera que tras 8 minutos la reacción se completa, al menos con la mayoría de compuestos ensayados.

4. - Materiales y métodos

La relación dosis–respuesta es lineal hasta un ΔAbs de 2,0 para concentraciones de compuestos de 1 mM o superiores. Se puede realizar también un monitoreo cinético determinando las pendientes de crecimiento de la absorbancia a tiempos variables, si el objetivo del trabajo lo requiere.

Las soluciones de los reactivos utilizados y el método aplicado se resumen en los siguientes protocolos:

Ensayo	900 μL Rvo FRAP X μL muestra o soluciones de calibración (100 – X) μL AD
Mezclar y leer inmediatamente a 593 nm (A_0).	
Esperar 8 min (o lo que corresponda) y leer A_8	

Soluciones

a) Buffer Acetato de sodio – Acido acético 300 mM pH3,6

Acetato de sodio. 3 H₂O..... 3,1 g
Ácido Acético..... 16 mL
AD csp 1L
Ajustar a pH= 3,6

b) TPTZ – 10 mM en HCl 40 mM

b.1) HCl 40 mM

HCl cc..... 170 μL
AD csp 50 mL

b.2) TPTZ – 10 mM

TPTZ 15,6 mg
HCl 40 mM csp..... 5 mL

c) FeCl₃ . 6 H₂O – 20 mM

FeCl₃ . 6 H₂O 54 mg

AD csp 5 mL

Reactivo de Trabajo “Reactivo FRAP”

Buffer AcONa – AcOH 300 mM pH 3,6 25 mL
TPTZ – 10 mM 2,5 mL

FeCl₃ . 6 H₂O – 20 mM 2,5 mL

Soluciones para calibrar

- a) Solución de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100 – 1000 μM)
27,8 mg/10 mL \rightarrow Dil. 1/10 (1mM)
- b) Solución de ácido ascórbico (100 – 1000 μM)
17,6 mg/10 mL \rightarrow Dil. 1/10 (1mM)

4.4.1.4.- Determinación del contenido de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se efectuó espectrofotométricamente utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu que por reducción produce un pigmento azul en solución alcalina.

La curva de calibración (A_{760} vs [μg ácido tánico/ml]) se realiza midiendo la absorbancia a 760 nm de las diluciones obtenidas a partir de una solución de ácido tánico de concentración conocida. A partir de esa curva puede ser calculada la concentración de polifenoles en la muestra. (Georgé *et al.*, 2005; Rodrigo-García *et al.*, 2006).

Los resultados se expresaron como μg ácido tánico/mg extracto seco

4.4.1.5.- Determinación del contenido de flavonoides totales

Los flavonoides se cuantificaron con el método colorimétrico de cloruro de aluminio, modificado (Chang *et al.*, 2002; Meneses Reyes *et al.*, 2008).

El método se basa en la formación de un complejo entre el flavonoides y el Cl_3Al , cuya coloración es proporcional a la concentración

La curva de calibración (A_{510} vs [μg rutina/mg extracto seco]) se realiza midiendo la absorbancia a 510 nm de las diluciones obtenidas a partir de una solución de rutina de concentración conocida. A partir de esa curva puede ser calculada la concentración de flavonoides en la muestra.

Los resultados se expresaron como μg rutina/mg extracto seco

4. - Materiales y métodos

Preparación del extracto a ensayar

En cada tubo de reacción se colocan 400 µl de agua y se agrega el extracto (10 a 100 µl) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) o agua.

Se completa el volumen a 500 µl totales con DMSO o agua según en que esté el extracto disuelto. Se agrega en cada tubo 30 µl de (NO₂Na al 5%).

Se deja reposar 5 min y se agregan 30 µl de Cl₃Al al 10% en metanol, se deja reposar 5 min y luego se agregan 200 µl de NaOH 1M.

Completar a 1000 µl con 240 µl de agua destilada. Dejar en la oscuridad durante 15 min .

Leer la absorbancia a 510nm

Hacer cada ensayo por duplicado

Curva de calibración con Rutina

Se preparan 5 diluciones, por duplicado, con una concentración de rutina entre 15-250 µg/ml, las cuales son tratadas según un protocolo similar al descrito anteriormente.

Resultados

A partir de la curva de calibración puede calcularse la concentración de flavonoides totales expresado como rutina, en µg equivalente Rutina /mg de muestra

4.4.2.- Actividad antiinflamatoria

La inflamación es una reacción localizada de tipo protectora que surge en respuesta a irritación alérgica o química, heridas o infecciones; se caracteriza por dolor, calor, rubor, hinchazón que resultan de la vasodilatación que produce incremento del aporte de sangre y aumento de los espacios intercelulares que permite el movimiento de leucocitos, proteínas y fluidos a las zonas inflamadas. (E. O. Iwalewa, et al., 2007)

4. - Materiales y métodos

Este mecanismo que se pone en marcha bajo las condiciones antes indicadas es la característica de varias enfermedades como aterosclerosis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, enfermedad de Crhon, asma, (Olga Barreiro, et al., 2010), artritis gotosa (N. Dalbeth y D. O. Haskard, 2005) , etc.

En el proceso inflamatorio se produce la acumulación de varios factores solubles que intervienen en el reclutamiento de leucocitos, activación de células residentes (fibroblastos, células endoteliales, macrófagos tisulares y mastocitos) así como de células reclutadas (monocitos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos), también estos factores son responsables de efectos sistémicos tales como fiebre, caquexia, hipotensión, síntesis de proteínas de la fase aguda de la inflamación, leucocitosis, etc. (Carol A. Feghali y Timothy M. Wright, 1997).

El óxido nítrico constituye uno de los mediadores proinflamatorios (B Fermor, et al., 2007) que está vinculado a una gran variedad de efectos biológicos como la homeostasis vascular, neurotransmisión defensa contra agentes infecciosos (Gaby Walker, et al.,1997) y es reconocida su participación en procesos como la vasodilatación que se genera en shock séptico e inflamación. (Eun-Jin YANG, et al., 2009).

El descubrimiento de la participación del Oxido Nítrico en las respuestas defensivas e inmunes se remonta a los trabajos de Stuehr and Marletta con macrófagos murinos, quienes constataron la producción de nitritos y nitratos en respuesta a la presencia de Lipolisacáridos bacterianos y probaron que un compuesto con la reactividad del Oxido Nítrico era el intermediario en el proceso; luego Hibbs y col. demostraron que este gas era la molécula efectora de la citotoxicidad mediada por macrófagos. (Riku Korhonen, et al., 2005).

El Óxido Nítrico es sintetizado por enzimas denominadas Oxido Nítrico Sintetasas (ONS) a través de una reacción oxidación que involucra a 5 electrones y que produce como intermediario a N_G -hidroxi-L-arginina; los sustratos para esta reacción son el aminoácido Arginina, Oxígeno molecular, Nicotinamida y Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma reducida (NADPH) y los cofactores que se requieren son

4. - Materiales y métodos

Tetrahidrobiopteridina, (BH4) Dinucleótido de Adenina y Flavina (FAD) y el Mononucleótido de Flavina (FMN) (Roland Govers y Ton J. Rabelink, 2001).

Existen tres isoformas diferentes de Oxido Nítrico Sintetasas:

- La Oxido Nítrico Sintetasa Neuronal o Tipo I (Neuronal Oxide Nitric Synthase o nNOS): se expresa de forma constitutiva y predominantemente en el Sistema Nervioso Central y Sistema Nervioso Periférico, su activación es dependiente del aumento de los niveles de Calcio citosólico.

- Oxido Nítrico Sintetasa Inducible o Tipo II (Inducible Oxide Nitric Synthase o iNOS): No se detecta su expresión en la mayoría de células y solo se sintetiza tras estímulos por productos microbianos como Lipopolisacáridos, RNA de doble cadena (dsRNA) o por citocinas proinflamatorias como Interleucina-1(IL-1), Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) e Interferón - γ

- Oxido Nítrico Sintetasa Endotelial o Tipo III (Endothelial Oxide Nitric Synthase o eNOS): se expresa de forma constitutiva y principalmente por las células endoteliales su activación también es dependiente del aumento de los niveles de Calcio citosólico. (P. L. Beck. et al., 2004)

A nivel molecular las acciones del ON pueden dividirse en tres categorías:

1. Regulación de la actividad de enzimas que tiene como grupos prostéticos a metales de transición como Fe, Cu y Zn y que pueden reaccionar directamente con el ON

2. El ON puede reaccionar con grupos Tiol de las Cisteinas de proteínas en una reacción conocida como N- Nitrosilación y por la cual puede modificar sus actividades.

4. - *Materiales y métodos*

3. El anión Superoxido puede reaccionar muy rápidamente con el ON y de esta manera generar el radical peroxinitrito (ONOO^\cdot) que es un agente nitrante y poderoso oxidante que puede reaccionar con múltiples blancos celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Dado el papel relevante que desempeña el óxido nítrico en enfermedades con alta prevalencia como Osteoartritis y artritis reumatoide ha existido considerable interés en desarrollar inhibidores de la producción de óxido nítrico, además es conocida la interacción de otros mediadores de la inflamación como prostaglandinas y leucotrienos con el óxido nítrico por lo que la posibilidad de encontrar inhibidores duales de la cascada de la inflamación es una idea atractiva reciente. (B Fermor, et al., 2007)

En la medicina tradicional existen plantas que han sido muy utilizadas para combatir la inflamación, un sitio preponderante tiene el Sauce (*Salix sp.*), desde los registros que se tienen de Celsus en el año 30 AC sobre el uso de esta planta para tratar los síntomas de la inflamación que él describió como rubor, calor, dolor y tumor, ya mencionó el uso de extractos de las hojas de esta planta para aliviarlos.

Otra planta con varios siglos de uso como antiinflamatorio es el álamo que comparte con el sauce uno de los metabolitos a los que se le atribuyó el efecto terapéutico: el ácido Salicílico (John Vane y Regina Botting, 1987).

Mucha investigación se ha realizado sobre plantas con actividad antiinflamatoria y de los principios activos responsables de esta acción, dentro de los que destacan la Curcumina (*Curcuma longa*), Partenólido (*Tanacetum parthenium*), 1,8-Cineole (*Eucalyptus sp.*), Pseudopterosins de (*Pseudopterogorgia elisabethae*), (Gaofeng Yuan, et al., 2006), flavonoides (Lien Ai Pham-Huy, et al., 2008), etc.

Estudio de la inhibición de la producción de óxido nítrico in vitro

Extractos utilizados

4. - *Materiales y métodos*

Para la determinación de la actividad inhibidora de la producción de óxido nítrico, se emplearon los extractos Hexánico, Diclorometánico, Metanólico evaporados y la decocción liofilizada, obtenidas de las partes aéreas de *Viola arguta*.

Con el fin de establecer el nivel de acción y cuantificar los efectos farmacológicos se han seleccionado conocidas técnicas *in Vitro*

- Ensayo de viabilidad celular.

Este ensayo se realiza con la Linea RAW 264,7 con la finalidad de conocer el efecto de las diferentes concentraciones de los extractos sobre la viabilidad de estas células y así determinar el rango de concentraciones para el ensayo, considerándose adecuada una viabilidad celular del 95-98%.

El efecto citotóxico de los productos sobre los distintos tipos celulares se mide usando el ensayo del 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromuro de tetrazolio (MTT) (Mossman, 1983), que se basa en la conversión del MTT de color amarillo a formazán de color azul oscuro. Esta reacción está catalizada por succinildeshidrogenasas mitocondriales. Las células (1×10^6 /195 μ l PBS) se tratan con 5 μ l de la muestra durante 30 min. en estufa a 37 °C, en una placa de 96 pocillos. Una vez eliminado el xenobiótico se añade a cada pocillo 100 μ l de MTT de una solución de 0.45 mg/ml. Se incuba la placa a 37 °C hasta la aparición de color azul, al menos en los controles. El medio se elimina y se añaden 100 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) a cada pocillo que disuelve los cristales de formazán. Se mide la absorbancia en un lector de placas a 492 nm.

- Inhibición de la producción de NO (óxido nítrico) en macrófagos RAW 264.7.

Basado en el método descrito por De León *et al.* (2003). Se prepara una curva patrón de nitritos para poder extrapolar las absorbancias que se obtengan con los productos y conocer su concentración. Se preparan concentraciones decrecientes desde 80 mM hasta 2,5 mM. Se añaden 100 ml de cada disolución al pocillo

4. - Materiales y métodos

correspondiente y 100 ml del reactivo de Griess (Naftilendiamina al 0,1% en H₂O y sulfanilamida al 1% en H₃PO₄). Se siembran 2×10^6 células/ml en una placa de 96 pocillos y se dejan incubar 24 h para que la población se doble. Se elimina el medio y se añaden 200 ml medio fresco sin suero fetal bovino. Se añaden los productos a las concentraciones finales de: control y blanco (DMSO al 0,5%), productos objeto de estudio (0,1-50 μ M) y se deja incubar a 37 °C en una atmósfera del 5% en CO₂ durante 3 h. La liberación de NO se estimula mediante la adición de 20 ml de lipopolisacárido (LPS) (1mg/ml). Se toman alícuotas de 100 ml del sobrenadante a las 24 h y se disponen en otra placa de 96 pocillos, añadiendo 100 ml del reactivo de Griess. Se mide la absorbancia a 570 nm.

5.- Resultados y discusión

5.1.- Elementos de diagnóstico y determinación de valores numéricos en hojas de *V. arguta*

Las hojas de *V. arguta* se presentan como hojas simples, pecioladas, oval-lanceoladas, de ápice agudo,

El borde presenta dientes glandulares que se ven oscuros bajo el microscopio estereoscópico.

Presenta estípulas persistentes y laciniadas (ver fig.)



Fig. 5.1. Hoja de *V. arguta* y estípulas

5. - Resultados y Discusión

Bajo el microscopio estereoscópico la superficie del envés presenta un aspecto rugoso con puntos brillantes y abundante pubescencia en toda la superficie, especialmente sobre las nervaduras. Los pelos tienen aspecto de cintas, aplanados (ver fig.5.2.)

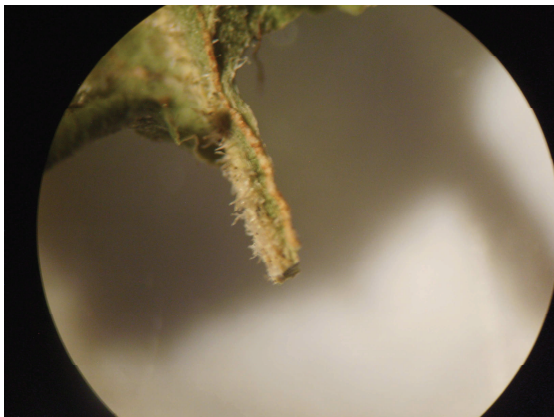


Fig. 5.2. Hoja de *V.arguta* observada al microscopio estereoscópico. Vista de los pelos (arriba), del diente (izq.) y estipula (abajo)



5.1.1.- Análisis micrográfico de las hojas de *Viola arguta*

Epidermis vista en superficie (VS)

Las hojas están cubiertas en ambas caras por una capa de cutícula estriada con abundantes ceras epicuticulares. Tanto la epidermis adaxial como la abaxial presentan células de paredes anticlinales rectas (penta o hexagonales) y células mucilagíníferas de forma aovada,(fig. 5.3) las cuales son más grandes que las restantes células epidérmicas y que en algunos casos presentan un contenido de color anaranjado. Estas se encontraron en mayor cantidad en los dientes (fig. 5.4).

Los estomas son una transición entre rubiáceos y crucíferos y se hallan distribuidos en toda la superficie de la cara abaxial, caracterizando a la hoja como hipostomática (fig. 5.5.).

En el envés de la hoja especialmente a nivel de las nervaduras, se observan tricomas tectores o eglandulares, unicelulares o uniseriados con cutícula estriada y arrugada y ceras epicuticulares (fig. 5.6.).

Por transparencia se observa en el mesófilo una capa de cristales en forma de drusas. El borde de la hoja presenta papilas (fig. 5.8, que toman una coloración azul en presencia de azul de metileno, lo cual también sugiere la presencia de mucílagos.

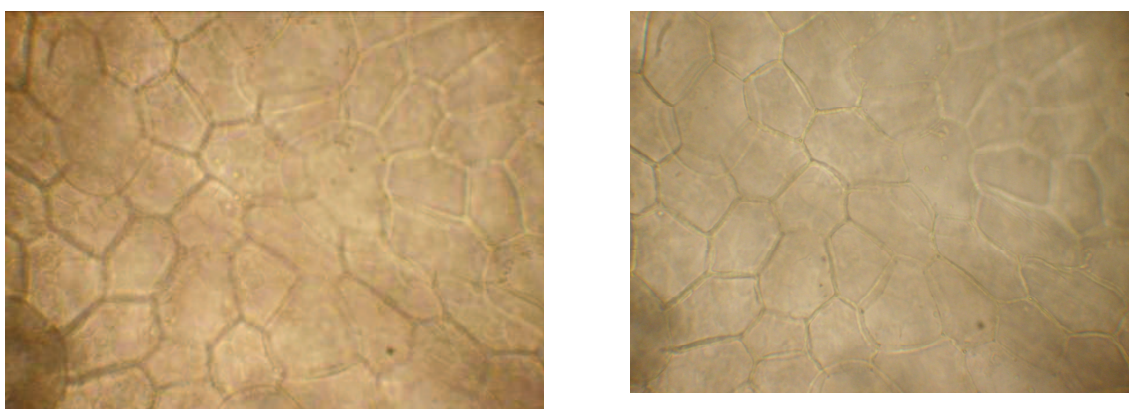


Fig. 5.3. Epidermis adaxial

5. - Resultados y Discusión

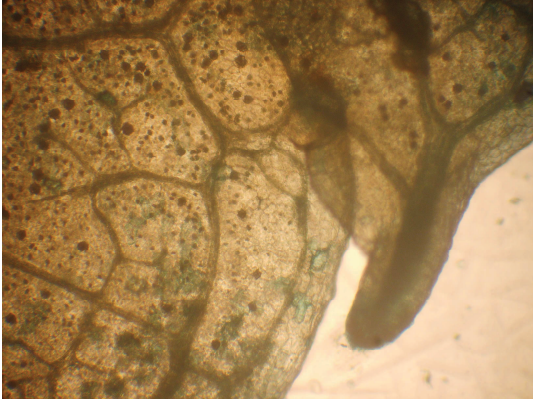


Fig. 5.4. Hoja diafanizada a nivel del diente

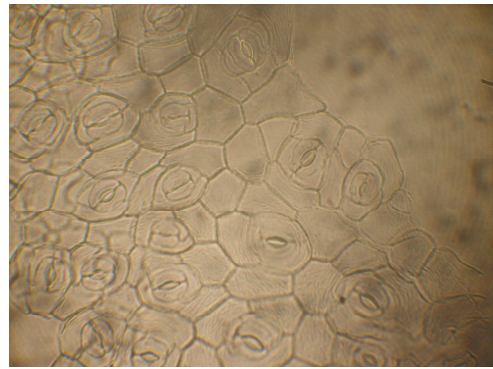


Fig. 5.5. Epidermis abaxial y estomas

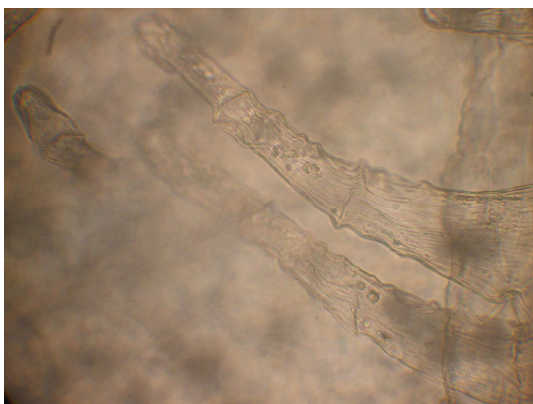


Fig. 5.6. Detalle de los pelos tectores

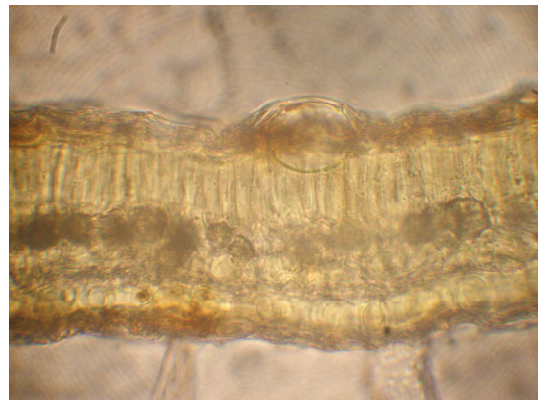
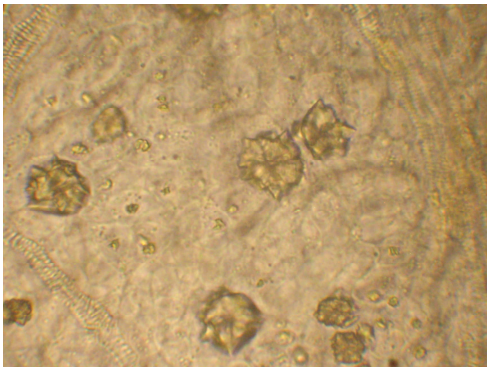
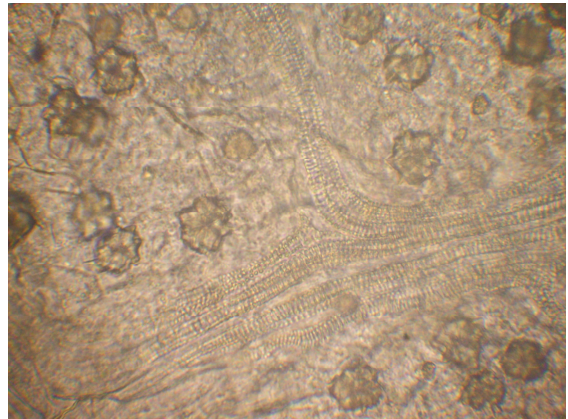
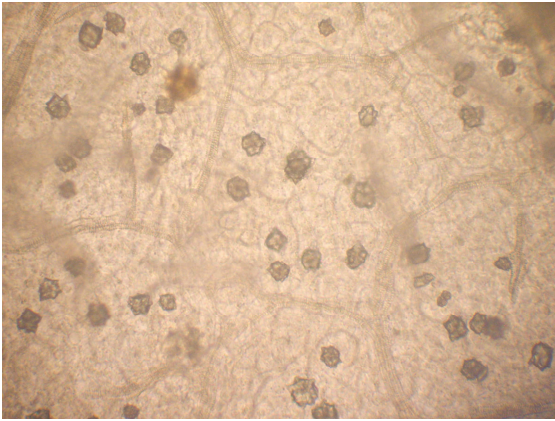


Fig. 5.7. Drusas observadas en vista superficial (arriba e izq.) y en corte transverso (abajo der.)

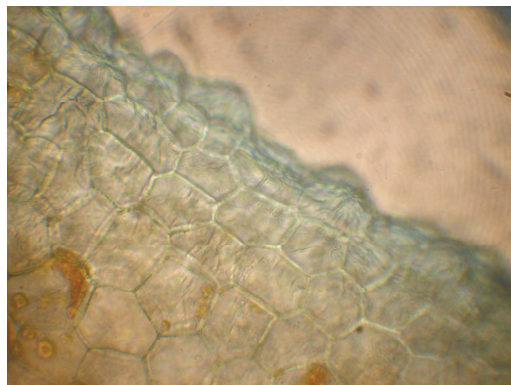


Fig. 5.8. Papilas

En el corte transversal, se observa la nervadura central biconvexa y entre 5 y 7 capas colénquima (fig. 5.9.).



Fig. 5.9. Corte transversal a nivel de la nervadura central

5.1.2. Determinación de valores numéricos o magnitudes proporcionales

Determinación de los índices de estomas y de empalizada

Para cada una de las 25 muestras seleccionadas de hojas diafanizadas de *V. arguta* se efectuó, con auxilio del MO, la determinación de los índices de estoma y empalizada, según se describió en el capítulo de “Materiales y métodos”.

Con los valores obtenidos para cada una de estas magnitudes proporcionales, fue establecido un rango y calculado el valor promedio y la moda (Mo), obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 5.1. Magnitudes cuantitativas

	Rango	Promedio	Moda
Índice estomático	15,15 – 21,42	17,31	15,30
Índice empalizada	5,00-14,50	9,65	9,00

5.1.3. Observación de la epidermis foliar mediante MEB

Observada al microscopio electrónico de barrido (MEB), la superficie foliar presenta una cutícula estriada. El MEB también permite apreciar en la cara abaxial la presencia de estomas, así como tricomas eglandulares, acintados, con cutícula estriada y ceras epicuticulares.

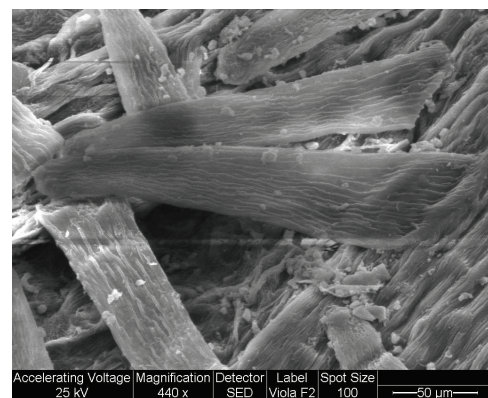
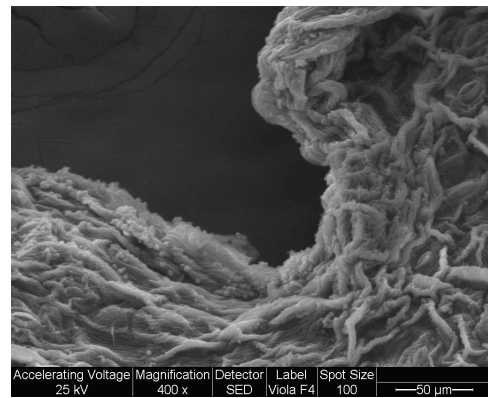
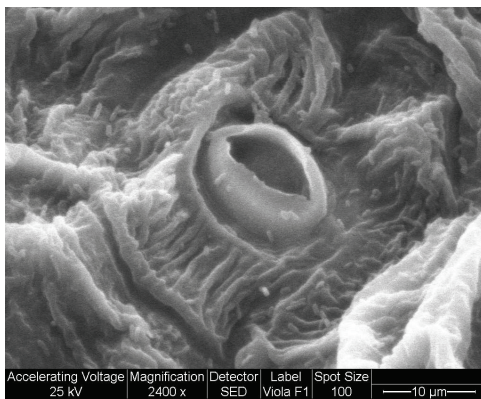


Fig. 5.10

5.2.- Ensayos fitoquímicos

5.2.1.- Rendimientos de los extractos de *Viola arguta* calculado en % (g extracto/100 g material vegetal seco)

Extracto	% (g extracto seco /100 g material vegetal seco)
Extracto hexánico:	1,30
Extracto diclorometanico	1,29
Extracto Metanólico	14,77
Extracto Metanólico 60%	18,85
Extracto acuoso	5,58

5.2.2.- Pruebas químicas orientativas efectuadas a los extractos acuoso, diclorometánico y metanólico de *Viola arguta*

1) Detección de Alcaloides:

Reactivo	Tipo de precipitado con alcaloides	Resultado en <i>Viola arguta</i>
Dragendorff	Rojo	Negativo
Mayer	Crema	Negativo
Acido Tánico	Beige	Negativo
Bouchardat	Rojo - pardo	Negativo

2) Detección de Antraquinonas (Aglicones y Heterósidos)

Reacción	Color en presencia de antraquinonas:	Resultado en <i>Viola arguta</i>
Borntrager	Rojo-rosa	Negativo

3) Detección de Saponinas.

Reacción positiva	Hexánico	Diclorometánico	Metanólico	Acuoso
Formación de espuma	NR	NR	Positivo	Positivo

4) Detección de taninos

Reacción positiva	Extr. Hexánico	Extr. Diclorometánico	Extr. Metanólico	Extr. Acuoso
Coloración Azul oscura o Verde Oscura	N/R	N/R	Positivo (Azul oscuro)	Positivo (Azul oscuro)

5. - Resultados y Discusión

5) Detección de Mucílagos y gomas

Reacción	Reacción positiva	Hexánico	Diclorometánico	Metanólico	Acuoso
Etanol absoluto	Precipitado	N/R	N/R	N/R	Positivo
Azul de metileno	Coloración azul	Positivo (observación microscópica de la coloración en vista superficial de hoja)			

6) Detección de flavonoides

Reacción	Reacción positiva	Hexánico	Diclorometánico	Metanólico	Acuoso
Shinoda	Color magenta	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Cl ₃ Fe al 2%	Color verde o azul	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Cl ₃ Al al 2%	Fluorescencia amarilla (UV ₃₆₆)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
H ₃ BO ₃ al 2%	Fluorescencia amarillo-verdosa (UV ₃₆₆)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
KOH al 1%	Amarillo (vis) fluorescente (UV ₃₆₆)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla Resumen.

Principio activo	Extracto				Extracto específico MeOH 60%	Reacción histoquímica en hoja
	Hexánico	DCM	Metanólico	Acuoso		
Alcaloides	N/R	N/R	N/R	N/R	Negativo	N/R
Antraquinonas	N/R	N/R	N/R	N/R	Negativo	N/R
Saponinas	N/R	N/R	Positivo	Positivo	N/R	N/R
Taninos	N/R	N/R	Positivo	Positivo	N/R	N/R
Mucílagos /gomas	N/R	N/R	N/R	Positivo	N/R	Positiva
Flavonoides	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N/R	N/R

5.2.3.- Análisis de las cromatografías en capa delgada (CCD) efectuadas a los extractos hexánico, diclorometánico y metanólico de *V. arguta*

Extracto Hexánico

De todos los sistemas cromatográficos ensayados, el que tuvo mejor resolución fue el sistema cromatográfico II (Tolueno/Acetato de etilo 7:3) (Fig.5.11 y tabla 5.2)

Tabla 5.2. Perfil cromatográfico del extracto hexánico

Vis	Rf			AS
	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	RPN + UV ₃₆₆	
0 (amarillo claro)				
0,1 (amarillo)				
0,13 (amarillo)				
		0,17 (café)		
0,38 (verde amarillenta)				
0,5 (verdosa)				
0,52 (grisácea)				
0,66 (grisácea)				
	0,69			
	0,75			0,75 (violácea)
	0,82	0,82 (azulado)		
				0,88 (violácea)
	0,94	0,94 (azul)	0,94 (crema-azulado)	0,94 (café)
0,98 (naranja)				



Fig. 5.11. Ext Hexanico + AS

El perfil cromatográfico de este extracto muestra al visible la presencia de 8 bandas, una de ellas de color amarillo pálido en el origen y otra amarilla-naranja intenso en Rf = 0,98.

5. - Resultados y Discusión

Próximas al punto de siembra aparecen dos bandas amarillas (Rf 0,1 y 0,13) y otra de color verde amarillenta a Rf 0,38

Hacia la mitad de la placa (Rf 0,5) se observa una banda verdosa poco intensa y justo sobre ésta otra grisácea (Rf 0,52); a Rf 0,66 también aparece una de color grisáceo.

La observación al UV 254 nm, permite visualizar 4 nuevas bandas (Rf 0,69 a 0,94).

Con Luz UV 366 se observan tres bandas que no se apreciaban al visible, de Rf 0,17 (café); 0,82 (Azulado) y 0,95 (azul intensa).

Esta última con el reactivo de productos naturales (RPN) fluoresce con un tono crema-azulado y mostró capacidad de evitar la oxidación del β -caroteno cuando se utilizó éste como revelador, comportamiento típico de los aglucones de cumarinas cuya presencia ha sido citada para algunas especies de Viola.

Al revelar con anisaldehído sulfúrico la banda que presentó fluorescencia con RPN (Rf 0,94) adquiere una tonalidad café, y aparecen dos bandas violáceas: una a Rf 0,88 y otra a Rf 0,75 que es una de las que no fue detectada al visible

Extracto diclorometánico

Para el extracto diclorometánico se obtuvo una mejor resolución con el sistema cromatográfico II. (ver fig 5.12 y tabla 5.3).

En estas condiciones a la luz visible se detectaron un mayor número de bandas que en el extracto hexánico: 13 bandas en total, siendo las principales: una de color verde oscuro muy intensa en el punto de siembra y otra de color amarillo- naranja justo bajo el frente del solvente, con un Rf coincidente con la banda de iguales características presentes en el extracto hexánico (Rf 0,98).

En la primera mitad de la placa se concentran 8 de las 13 bandas.

Observadas al visible, cuatro bandas de color amarillo destacan en el primer tercio de la placas, dos de ellas con Rf muy próximos a sus pares de la placa anterior (Rf =0,1 y 0,13), una ubicada bajo estas dos (Rf= 0,07) y la otra sobre estas tres y mostrando una mayor intensidad

5. - Resultados y Discusión

Observadas con luz UV 366 se muestran como manchas opacas de color oscuro.

El color amarillo al visible que se intensifica con RPN .

Este comportamiento, sumado a las observaciones anteriores y al comportamiento al UV366 hacen pensar que podría tratarse de aglucones tipo flavona.

A $R_f = 0,19$ aparece otra banda de color café-grisáceo (visible) que al iluminarla con UV366 se vuelve azul-violácea

Revelado con AS o RPN no se observan cambios en la coloración.

Tabla 5.3. Perfil cromatográfico del extracto DCM

Vis	Rf			
	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	RPN + UV ₃₆₆	AS
0 (verde oscuro)				
0,07 (amarillo)		0,07 (marrón)	0,07 (amarillo)	
0,1 (amarillo)		0,1 (marrón)	0,1 (amarillo)	
0,13 (amarillo)		0,13 (marrón)	0,13 (amarillo)	
0,17 (amarillo intenso)		0,17 (marrón)	0,17 (amarillo intenso)	
0,19 (café-grisáceo)		0,19 (azul violáceo)		
0,98 (naranja)				



Fig. 5.12. Ext DCM + AS

Extracto Metanólico

Para el extracto Metanólico la mejor resolución se obtuvo utilizando el sistema cromatográfico III. (ver tabla 5.4)

Tabla 5.4. Perfil cromatográfico del extracto Metanólico

Vis	Rf			AS
	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	RPN + UV ₃₆₆	
0 (marrón)				
0,21 (amarillo)		0,21 (marrón)	0,21 (amarillo intenso)	
0,44 (amarillo)		0,44 (marrón)	0,44 (amarillo intenso)	
0,52 (amarillo)		0,52 (marrón)	0,52 (amarillo intenso)	
	0,62			
	0,75	0,75 Fluores. Celeste NH ₃		
	0,85			
0,89 (gris verdoso)				
0,98 (verde oscuro)				

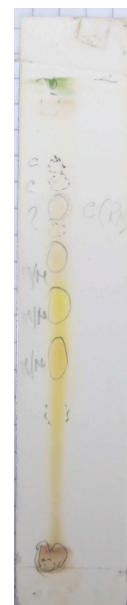


Fig. 5.13. Ext MeOH+ RPN

En estas condiciones al visible se observaron 7 bandas, una en el origen, de color marrón muy intensa y justo bajo el frente del solvente (Rf 0,98) otra de color verde oscuro muy notoria.

Observada la placa al visible, destacan tres bandas de color amarillo (Rf 0,21; 0,44 y 0,52).

Todas se muestran opacas y oscuras al observar con luz UV366, mientras que con el reactivo de productos naturales se tornan amarillo muy intenso, lo cual nos lleva a pensar en la presencia de flavonas, presentes como heterósidos en el extracto metanólico.

Una banda adicional de tono gris-verdosa está presente en Rf 0,89. (Vis)

Al UV254 aparecen tres nuevas bandas, ausentes en el visible, a Rf 0,62; 0,75 y 0,85 aparecen tres nuevas bandas. Destaca entre éstas la segunda banda indicada, que al someter la placa a vapores de NH₃ adquiere una fluorescencia celeste.

Aparece también otra banda indetectable anteriormente y que solo es visible con NH₃ y fluoresce como una banda crema-celeste que con anisaldehído sulfúrico se colorea de violeta.

Este comportamiento es compatible con el de una saponina.

Este extracto MeOH se comparó además con testigos de Rutina, quercetina, pero con éstos no se encontraron coincidencias.

Además analizado el comportamiento cromatográfico y del extracto metanólico en el sistema cromatográfico Tolueno: Acetato de etilo / 8:2 (sistema VI) frente a testigo de ácido salicílico se demostró la ausencia de este metabolito en el extracto.

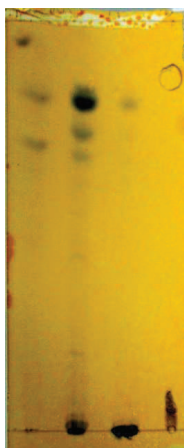


Fig. 5.14

5.2.4.- Caracterización de ciclótidos por TLC.

La aplicación del protocolo descrito en materiales y métodos para investigar la presencia de ciclótidos en *Viola arguta* presentó inicialmente algunas complicaciones, fundamentalmente relacionadas con la dificultad para visualizar las reacciones de los reveladores debido al solapamiento o proximidad con los otros compuestos presentes en el extracto.

Para estas primeras pruebas, la extracción se realizó con el procedimiento descrito en la mayoría de los trabajos sobre ciclótidos publicados en los últimos años. Este protocolo consiste en una extracción inicial con metanol al 60% seguido de una partición Líquido-Líquido con Diclorometano.

El inconveniente inicial que hemos mencionado se tornaba más severo en las placas sometidas a hidrólisis, en las que aparecía un oscurecimiento generalizado de toda la zona por la que se desplazaban los metabolitos.

5. - Resultados y Discusión

Esta situación nos llevó a intentar procedimientos en lo posible simples y rápidos que nos permitieran eliminar la mayor cantidad de las sustancias interferentes.

De esta manera, el aprovechamiento de las particulares características de solubilidad de estos péptidos en relación a las de la mayoría de los componentes del extracto, resultaba ser una primera alternativa a explorar.

Como primer paso se realizaron extracciones preliminares del material vegetal (10g) de forma secuencial con Hexano y Diclorometano, lo que nos permitió contar con extractos Hexánico y Diclorometánico adicionales para otras actividades, al tiempo que retiramos componentes de tipo liposolubles sin extraer los ciclótidos del vegetal.

La insolubilidad de los ciclótidos en estos solventes se encuentra descrita desde los primeros trabajos de Claeson (1998) y obviamente está en concordancia con el natural comportamiento de las sustancias peptídicas en este tipo de solventes.

Como siguiente paso se usó el marco de la extracción con DCM que una vez libre del solvente se extrajo con solución de Metanol al 60% en la que los ciclótidos si se solubilizan (Burman., et al 2010) y constituye la mezcla que se usa comúnmente como paso inicial de extracción.

Debido a que estas concentraciones de Metanol nos permiten extraer los ciclótidos del material vegetal pero a la vez conserva las características de un solvente general, el extracto presentaba aun una composición muy compleja que se evidenciaba por los perfiles cromatográficos en CCD en donde a un Rf superior a 0,5 predominaban sustancias con características semejantes a flavonas y además en la placa hidrolizada persistía el oscurecimiento en la zona de tránsito de los metabolitos (fig. 5.15).



Fig. 5.15. Comparación de una placa sin Hidrolizar (Izquierda) y con hidrólisis

Un paso mas que se implementó con el propósito de eliminar más sustancias interferentes del extracto, consistió en intentar la precipitación de los péptidos en un medio en el que muchas de las sustancias que los acompañaban siguieran siendo solubles. Es así que optamos por evaporar totalmente el extracto metanólico al 60% y retomararlo con una mezcla de Metanol con Diclorometano (10ml+1ml).

El objetivo fue disminuir la polaridad del metanol lo suficiente para reducir la posibilidad de que este solvente fuera capaz de solubilizar los ciclótidos pero siguiera conservando su poder de disolver el resto de sustancias acompañantes.

Luego de tres ciclos de centrifugación y lavado con esta mezcla de solventes se obtuvo un precipitado que se redisolvió en Metanol al 60%

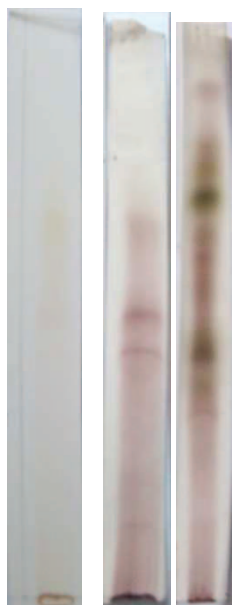


Fig 5.16. Comparación de una placa sin hidrolizar (izq.) y una hidrolizada luego del proceso de semipurificación (centro) y la placa hidrolizada sin el procedimiento (der.)

5. - Resultados y Discusión

Con la reducción de la cantidad de componentes en el extracto la observación del comportamiento en presencia de los reveladores fue más sencilla (Fig.5.16.).

El extracto metanólico al 60% se sembró en tres placas de sílica gel (Placas A, B y C) que se desarrollaron simultáneamente en las condiciones del sistema cromatográfico antes indicado.

Concluido el desarrollo se evaporó la fase móvil y se colocó una de las placas (A) suspendida en un tubo de vidrio junto a 1 ml de HCl (37%) y se lo sometió a calentamiento en una estufa a 110⁰C por 2 horas para generar la hidrólisis de los péptidos presentes.

Pasadas las dos horas se sacó la placa del tubo, se eliminó totalmente el HCl usando aire caliente y se reveló (Fig. 5.17.).

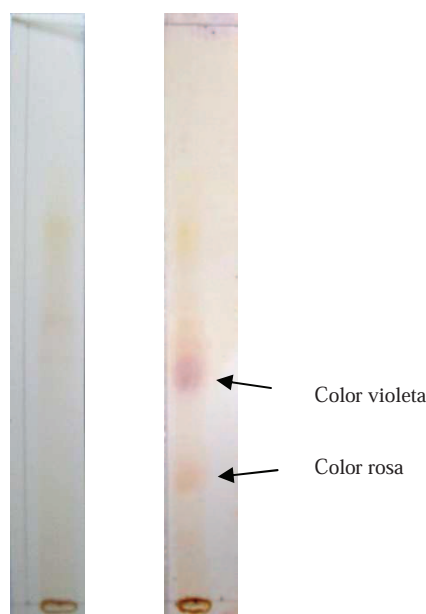


Fig. 5.17. Comparación de la placa sin hidrólisis Antes (izquierda) y después del Revelado con Ninhidrina

La placa C (no hidrolizada) se reveló con el Azul Brillante de Coomassie mientras que la placa A (hidrolizada) y la placa B (no hidrolizada) se revelaron con Ninhidrina al 0,2% y calentando con un secador de aire durante varios minutos.

Para la detección de ciclótidos en *Viola arguta* se utilizó el método reportado por XU Yan *et al.*, (2008) que emplea Ninhidrina y Azul Brillante de Coomassie G-250.

5. - Resultados y Discusión

Este método, utilizado para investigar ciclótidos en *V. labridorica*, *V. tricolor*, *V. hamiltoniana*, *Momordica charantia* y *M. cochinchinensis*, fue definido por los autores como: “un método de buena especificidad y sensibilidad químicas para ciclótidos y puede ser empleado eficazmente no sólo para detectar si extractos de plantas contienen ciclótidos sino también para guiar en su separación y purificación”.

XU Yan *et al.*, (2008) explican el comportamiento de los reveladores frente a ciclopéptidos, aminoácidos y otros tipos de péptidos y proteínas según la siguiente tabla:

Reveladores	Aminoácidos	Ciclótidos	Ciclopéptidos	Péptidos lineales	Proteínas
Ninhidrina (No-Hidrolizado)	+++	- ò +	-	+++	+
Ninhidrina (Hidrolizado)	+++	+++	+++	+++	+++
Azul Brillante de Coomassie	-	+	-	-	+++

“-“ = Negativo
“+“ = Positivo
“+++“ = Más Positivo

Si al revelar la placa hidrolizada con ninhidrina aparece una coloración púrpura – rojiza o amarilla y en el mismo Rf de la placa no hidrolizada no aparecen estas coloraciones, este resultado indicaría la presencia de ciclopéptidos ya que éstos al no poseer extremos N terminales no reaccionan con Ninhidrina y sólo la hidrólisis a la que se someten en la placa permite que se revelen con el reactivo.

Adicionalmente este procedimiento desarrollado por los autores permite ir más allá e identificar dentro de la los ciclopéptidos a los ciclótidos ya que sólo estos últimos pueden ser detectados con Azul Brillante de Coomassie G-250 por su mayor peso molecular comparado con el del resto de los ciclopéptidos que son más pequeños e indetectables para este reactivo,

La modificación sugerida en el trabajo de Xu *et al* (2008) en la preparación de este revelador (Azul Brillante de Coomassie G-250) consiste en el aumento de su concentración y también en agregar una mayor proporción de etanol para una rápida

5. - Resultados y Discusión

volatilización. De esta manera si los ciclopéptidos antes detectados son ciclótidos aparecerá una coloración turquesa sobre el fondo rojo de esta placa.

Realizadas las cromatografías para el extracto MeOH 60% y MeOH 60% semipurificado de *V. arguta*, se obtuvieron los siguientes resultados:

Al revelar las placas B (no hidrolizada) con Ninhidrina podemos observar que aparecen algunas una banda color violeta ($R_f = 0,38$) de intensidad media y otra de color rosa, las dos sin buena resolución, estas bandas no fueron visibles antes del tratamiento con este revelador (fig. 5.18), de esta manera identificamos sustancias presentes en el extracto que correspondería a aminoácidos o algunas moléculas aminadas que son capaces de reaccionar con la Ninhidrina, por lo que la presencia de ciclótidos se descartó en estas posiciones (R_f s) de la placa.

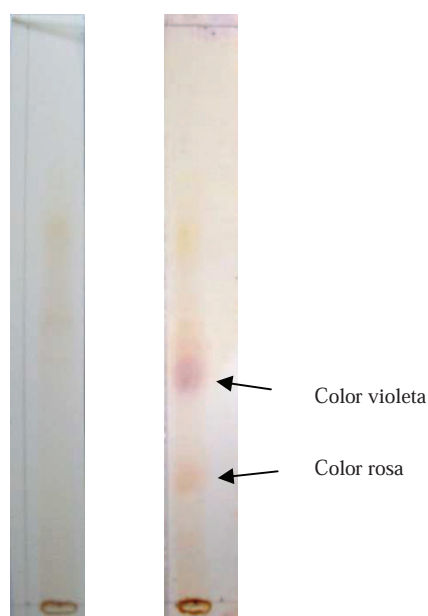


Fig. 5.18. Comparación de la placa sin hidrólisis Antes (izquierda) y después del Revelado con Ninhidrina (der)

5. - Resultados y Discusión

A continuación la placa C (sin Hidrólisis) se reveló con Azul Brillante de Coomassie y se observó la aparición de un color azul que resaltaba en el fondo rosa de la placa y en un $R_f = 0,55$, sin buena resolución y generando una banda amplia (fig. 5.19).



Fig. 5.19. Comparación de las placas reveladas con Ninhidrina (izquierda) y con Azul Brillante de Coomassie.

La aparición de esta banda únicamente en esta zona nos indicó que las sustancias que anteriormente reaccionaron con Ninhidrina necesariamente debían ser aminoácidos o péptidos muy pequeños ya que su escaso tamaño hace que el revelador que ahora empleamos no los alcance a detectar y a la vez nos indicó la presencia en esta amplia zona azul de alguna sustancia o sustancias de tipo peptídico que en cambio no fueron detectados por Ninhidrina, todos estos criterios cumplieron, hasta ese momento, con el comportamiento que debían tener los ciclótidos.

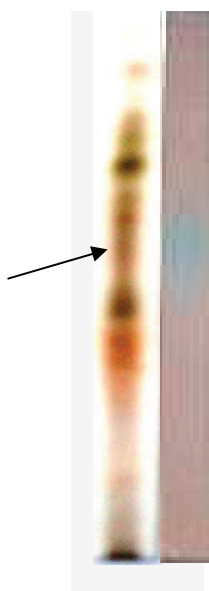
Sin embargo restaba por investigar si esta banda detectada por el Azul Brillante de Coomassie, tras el tratamiento con Ácido Clorhídrico a 110°C por 2 Horas al que se sometería la placa podría reaccionar con Ninhidrina, de hacerlo indicaría que su

5. - Resultados y Discusión

estructura original creaba impedimentos para reaccionar con este último revelador. Este fue justamente el resultado que se observó.

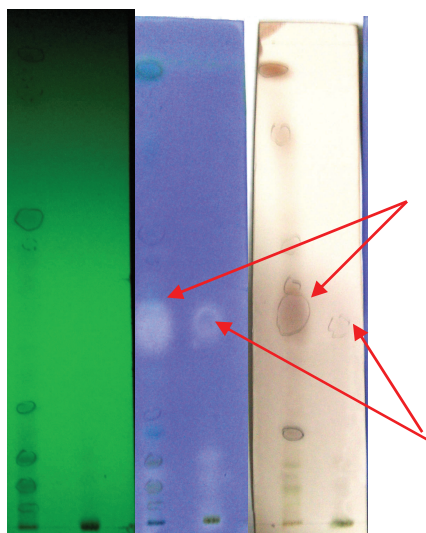
Tras la mencionada hidrólisis se obtuvo una placa que una vez revelada con Ninhidrina de la forma que se explica en la sección de Métodos, vuelve a presentar zonas coloreadas donde antes fue positiva la reacción con Ninhidrina pero con una intensidad menor, mientras la banda violeta también se tornó rosa, pero lo más destacado es que aparece una nueva banda, otra vez sin buena resolución, de color rosa al mismo Rf de la banda revelada con Azul Brillante de Commassie lo que finalmente, al haber observado la concordancia de nuestros resultados con aquellos que los autores indican en su Protocolo, nos indicaría que esta especie de Violeta posee ciclótidos en su composición.

Como se manifestó anteriormente, si bien la existencia de estas moléculas está ampliamente documentada en la familia Violaceae, ésta es la primera vez que se describe su presencia en *Viola arguta*.



Comparación de la placa hidrolizada y revelada con ninhidrina (izq.) con la placa sin hidrolizar revelada con azul brillante

5.2.5.- Detección de ácidos por CCD



CCD del extracto hexanico y hexanico purificado con distintos reveladores UV254 (izq.); azul bromofenol (centro); Anisaldehido sulfurico (der.)

El extracto purificado obtenido partir del extracto hexanico, se cromatografio con el solvente Eter etílico/éter de petróleo/ acido fórmico 70:30:1

Al observar la placa al UV254 se ven 8 manchas en la calle correspondiente al extracto hexanico y no se aprecia ninguna en el extracto purificado.

Al revelar con azul de bromofenol, aparece, tanto en el extracto hexanico como en el extracto purificado, una mancha amarillenta a Rf 0,46 que toma coloracion rosada si la placa se revela con Anisaldehido sulfurico.

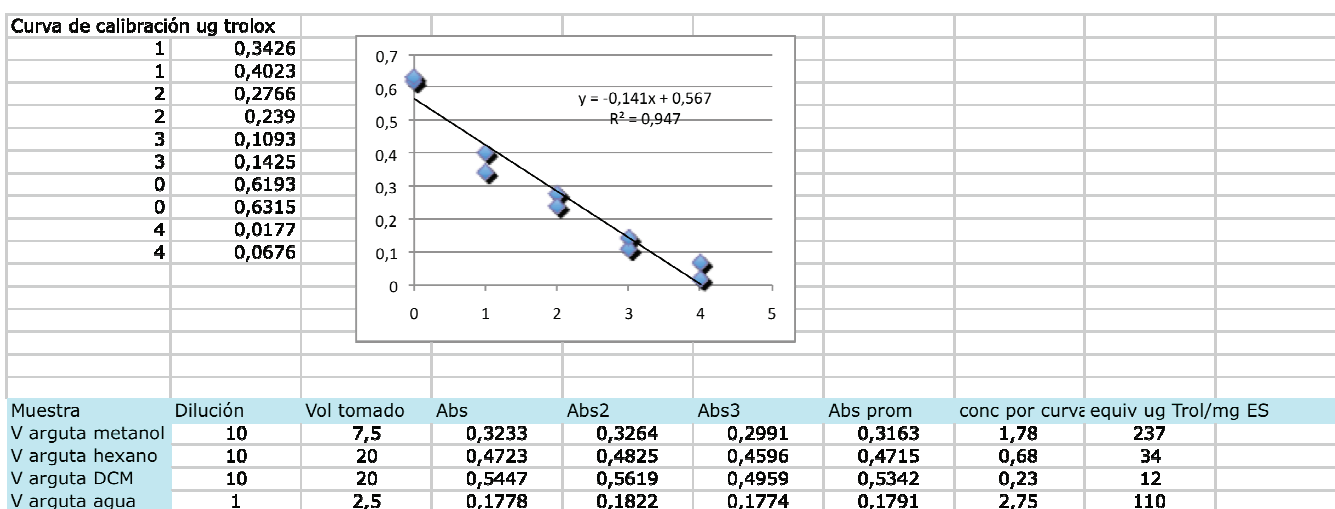
Este comportamiento sugiere que se ha aislado a partir del extracto hexanico una sustancia de naturaleza acida, que podria ser de naturaleza terpenica. Según Wagner y Bladt (1996), las saponinas, a excepción de la glicirricina y el acidoglicirretico presentes en el regaliz, no son detectables por exposición a la luz UV254 o UV366 requiriendo un tratamiento químico.

Dadas las reacciones orientativas previamente realizadas y el comportamiento que observamos al revelar las CCD, podríamos inferir que la sustancia aislada a partir del extracto hexanico seria el aglucon de una saponina.

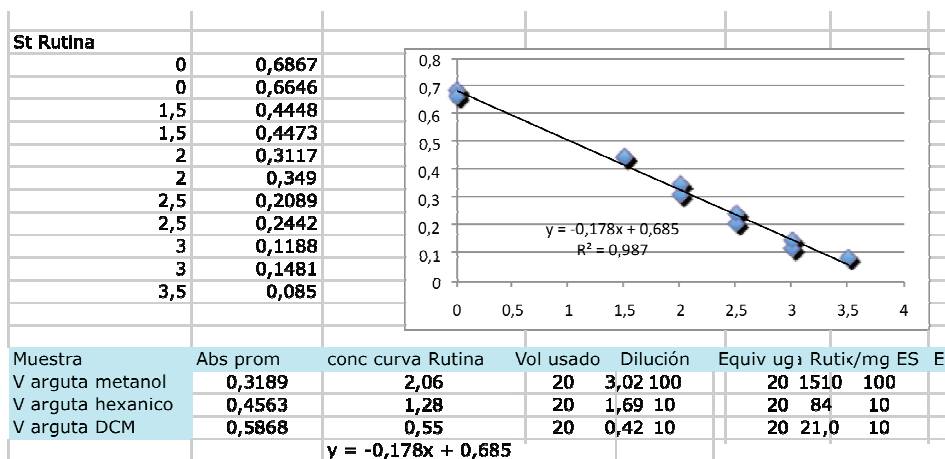
5.3.- Actividades

5.3.1.- Actividad antioxidante por métodos espectrofotométricos

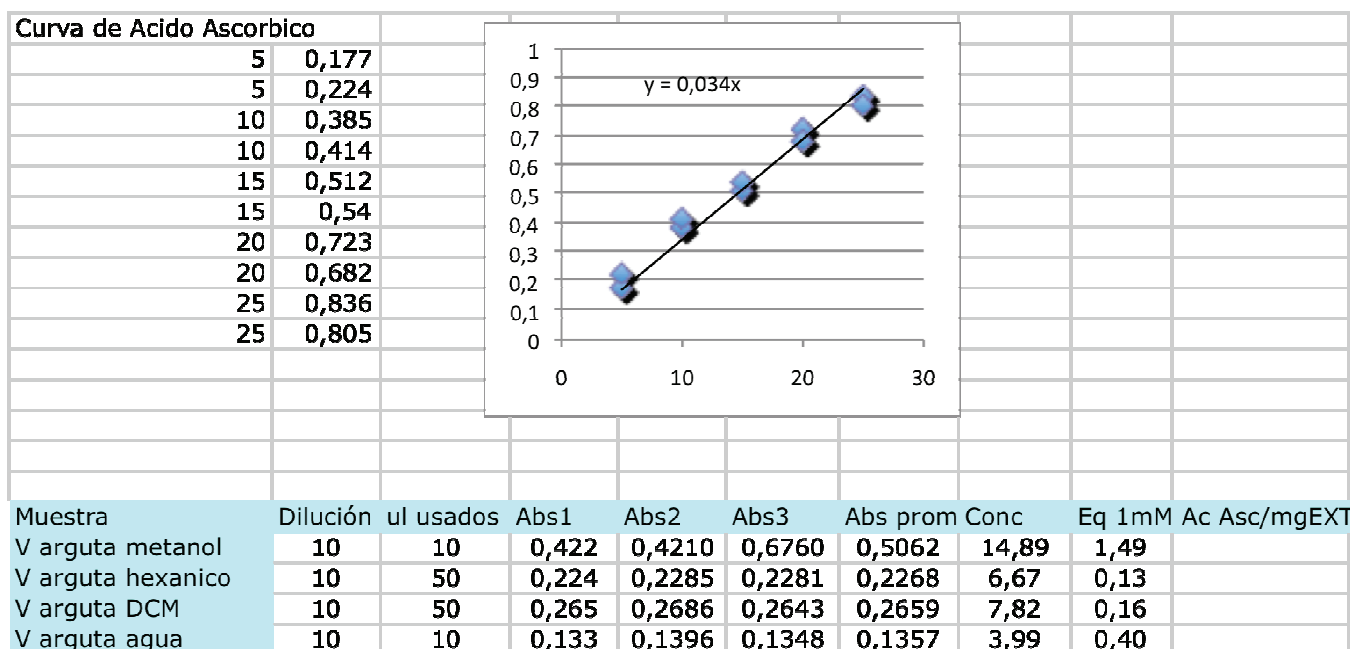
5.3.1.1.- Actividad frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)



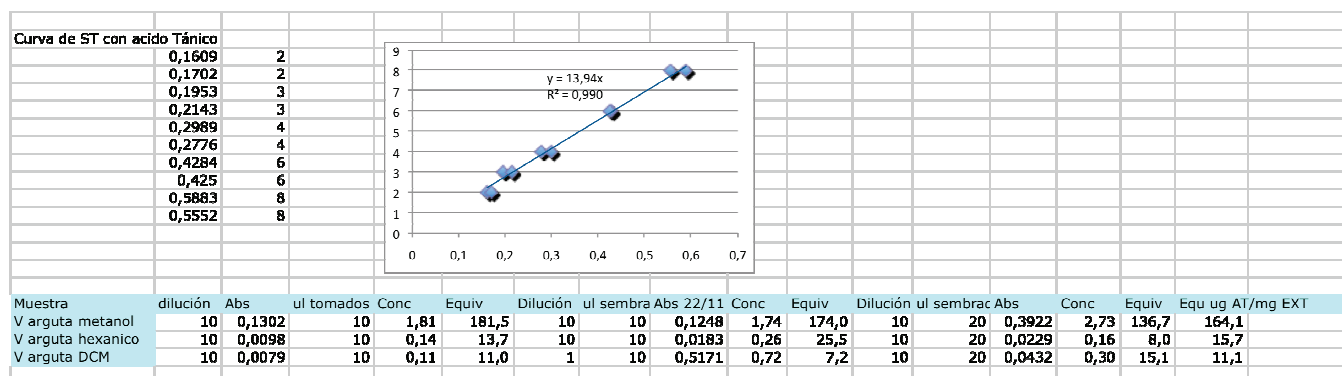
5.3.1.2.- Actividad frente al radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)



5.3.1.3.- Evaluación de la capacidad reductora por el método FRAP

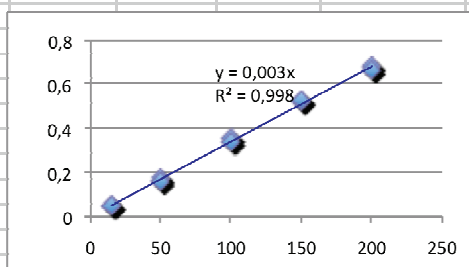


5.3.1.4.- Determinación del contenido de fenoles totales



5.3.1.5.- Determinación del contenido de flavonoides totales

Muestra	Dilución	ul tomados	Abs1	Abs2	Blanco	Abs final	Conc por curv	equiv ug de Rut/mg EXT
V arguta metanol	10	50	0,1044	0,0811	0,0528	0,03995	13,32	266
V arguta hexanico	10	50	0,0103	0,015	-0,0141	0,02675	8,92	178
V arguta DCM	10	100	0,2018	0,2006	0,1031	0,0981	32,70	327
Curva de rutina								
	15		0,0462					
	15		0,0485					
	50		0,1717					
	50		0,1579					
	100		0,3544					
	100		0,3369					
	150		0,5211					
	150		0,5271					
	200		0,6822					
	200		0,6642					



Existe consenso respecto a la necesidad de utilizar más de un método cuando se evalúa la capacidad antioxidante de extractos vegetales, ya que los compuestos antioxidantes pueden actuar por diversos mecanismos según el sistema de reacción utilizado. Los métodos empleados miden la capacidad reductora de los extractos al actuar sobre diversos radicales preformados, lo cual permite la evaluación en un amplio rango del perfil metabólico de la planta ensayada. (Fernández Pachón et al., 2006; Aubad López, 2007; Rojano et al., 2008; Gan et al., 2010).

En general, podemos decir que la actividad antioxidante de una planta es el resultado del balance existente entre los compuestos de alta y baja polaridad existentes (Kuskoski et al., 2004; Repo de Carrasco y Encina Zelada, 2008).

De la observación de los gráficos y tablas, se desprende que las TEAC (μg trolox / mg extracto seco) calculadas por el método DPPH para *V. arguta*, resultaron mayores para el extracto mas polar (MeOH).

Asimismo la concentración de fenoles totales, resultó ser muy superior para el extracto metanólico, lo cual sugiere que uno de los responsables de la actividad

5. - Resultados y Discusión

antioxidante de *V. arguta* serian los compuestos polifenolicos presentes en los extractos mas polares.

La capacidad antioxidante calculada por el método ABTS (μg rutina/mg ES), también resultó mayor para el extracto metanólico, en concordancia con los resultados del método DPPH.

La concentración de sustancias reductoras, calculadas por el método FRAP (μg acido ascórbico/ mg extracto seco) también resulto ser diez veces mayor para el extracto metanólico.

Por otra parte, el contenido de flavonoides es inversamente proporcional a la actividad antioxidante calculada por cualquiera de los métodos anteriormente citados. O sea, los extractos más polares son los que contienen la menor concentración de flavonoides totales expresados como rutina. O dicho de otro modo, los flavonoides se encuentran preferentemente como aglucones (solubles en hexano y diclorometano) y no como heterósidos (más solubles en metanol).

Sin embargo, es bien conocido que los flavonoides poseen actividad antioxidante demostrada. Una posible explicación para estas observaciones aparentemente contradictorias, podría ser que los flavonoides no fueran los únicos compuestos con actividad antioxidante presentes en los extractos metanólico y acuoso de *V. arguta*, compartiendo esta actividad con otras clases de metabolitos reductores.

La determinación del contenido de fenoles totales arroja valores de hasta 10 veces superior en el extracto metanólico con respecto a los extractos hexánico y diclorometánico, por lo cual es lógico pensar que las sustancias reductoras que contribuyen a la acción antioxidante en ese extracto, sean compuestos polifenolicos.

Es de destacar también que aunque en pequeñas cantidades, los compuestos fenólicos también están presentes en los extractos menos polares (hexano y diclorometano).

5.3.2.- Actividad antiinflamatoria: Estudio de la inhibición de la producción de óxido nítrico *in vitro*

1) Ensayo de citotoxicidad.

Este ensayo se realiza con la Línea RAW 264,7 con la finalidad de conocer el efecto de las diferentes concentraciones de los extractos sobre la viabilidad de estas células y así determinar el rango de concentraciones para el ensayo.

Las células fueron cultivadas por 24 horas a 37⁰C en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino, Penicilina (100 units/mL) y sulfato de Estreptomina (100 units/mL), en una atmósfera con 5% de CO₂, a continuación se controló la viabilidad celular y se determinó la densidad usando una cámara de Neubauer con Azul de Tripán como colorante con la finalidad de establecer la dilución del cultivo adecuada para obtener 200.000 células /200µl/pocillo en dos placas de 96 pocillos .

La dilución que se calculó para las dos placas fue de 7,9ml de suspensión celular en 30,5 ml de medio DMEM con la composición antes indicada.

Se colocaron en cada pocillo de cada placa 200 µl de la suspensión celular y se incubaron por 24 Horas en las mismas condiciones anteriores, pasado este tiempo se voltearon las placas para eliminar el medio, se lavaron con el mismo volumen anterior de medio fresco, se eliminó nuevamente este medio y se agregó medio de cultivo compuesto por DMEM con 0,5% de Suero fetal bovino y de los antibióticos en las concentraciones antes indicadas colocando 195µl en 12 pocillos (Blancos) y 175 µl en los 84 restantes (fig. 5.20.)

Se añadieron 5µl del cada uno de los extractos disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO) que permite solubilizar la mayoría de los metabolitos de tipo liposolubles, mientras que el acuoso se disolvió en agua destilada, obviamente el grupo de 12 pocillos que sirvieron como blanco y de 12 para control en lugar de los extractos se colocaron los solventes, en estas condiciones se regresaron las placas a la incubadora por 1 hora.

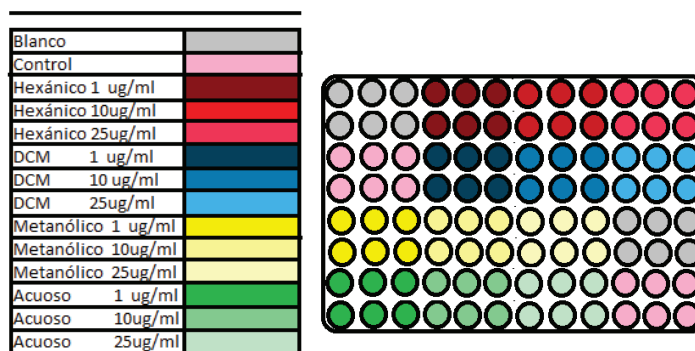


Fig. 5.20. Esquema de la Disposición de los extractos en la placa de 96 pocillos

Se sacaron las placas y se añadió Lipolisacárido para una concentración final en pocillo de 10 μ l/ml; únicamente en el grupo Blanco de las dos placas no se colocó este tratamiento.

Se incubaron por otras 24 horas en las mismas condiciones anteriores y transcurrido este tiempo se tomaron 100 μ l del medio de cada placa y se traspasaron a otra placa de 96 pocillos, se añadieron 100 μ l del reactivo de Griess (Dilución 1 a 1 de ácido sulfanílico al 1% en 3M de ácido clorhídrico y N -(1) Naftilendiamina al 0,02% en agua desionizada) (Griess, et al 1982) se midió la Absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro lector de placas con este valor se calcula la concentración de nitrito presente en el medio de cultivo en una curva de calibración previamente realizada (fig.5.21.).

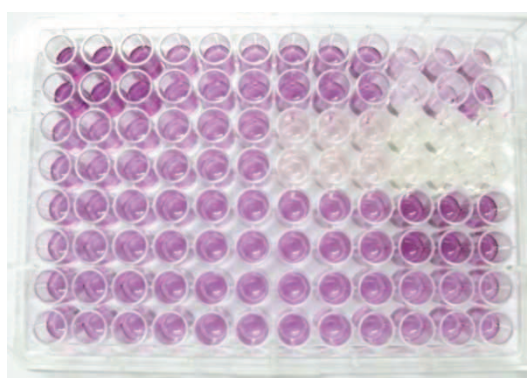


Fig. 5.21. Placa con reactivo MTT para ensayo de citotoxicidad

5. - Resultados y Discusión

El ensayo para determinar citotoxicidad se realizó usando MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (500 µg/ml) en las células del ensayo anterior; una vez se extrajeron los 100 µl por pocillo se voltean las placas y se elimina el remanente del medio de cultivo, se añaden 200 µl / pocillo de medio de cultivo fresco y lo descartamos nuevamente, ahora añadimos 100 µl de MTT e incubamos por 30 minutos, se voltean las placas y se lavan con PBS (100 µl).

Finalmente se añaden 100 µl de Dimetilsulfóxido que permite solubilizar los cristales azules de Formazán generados por las células, se lee la Absorbancia a 570nm en un espectrofotómetro lector de placas.

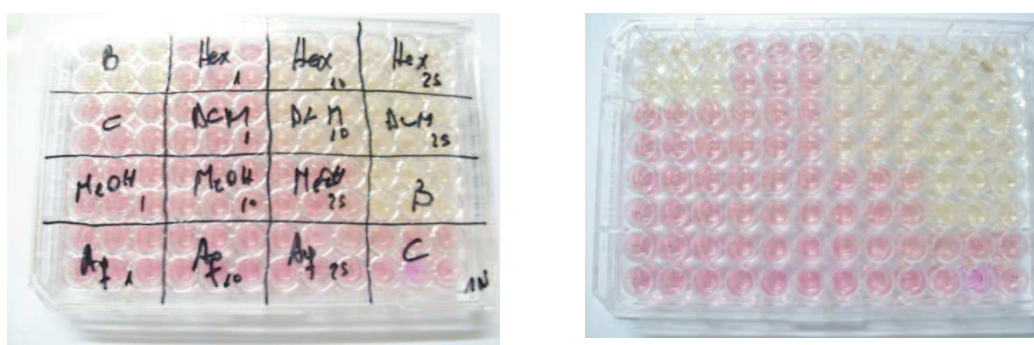


Fig. 5.21. Vista de la Placa para Nitritos con los tratamientos indicados en su tapa Placa para determinación de nitritos con el Reactivo de Griess

Al comparar los valores del Blanco (sin LPS) y el Control (Con LPS) se evidencia una significativa reducción de la viabilidad celular generada por la presencia de este agente inductor de la producción de Óxido Nítrico (fig. 5.22), por lo que la comparación de la viabilidad de las células sometidas a las diferentes concentraciones de extractos se efectuaron frente al valor de la viabilidad del Control que representa las condiciones de partida del modelo de estudio.

En cuanto al extracto Hexánico, las concentraciones de 1µg/ml y 10µg/ml no muestran efectos citotóxicos, sin embargo a la concentración de 25 µg/ml la viabilidad se reduce significativamente (a << 95% de viabilidad).

5. - Resultados y Discusión

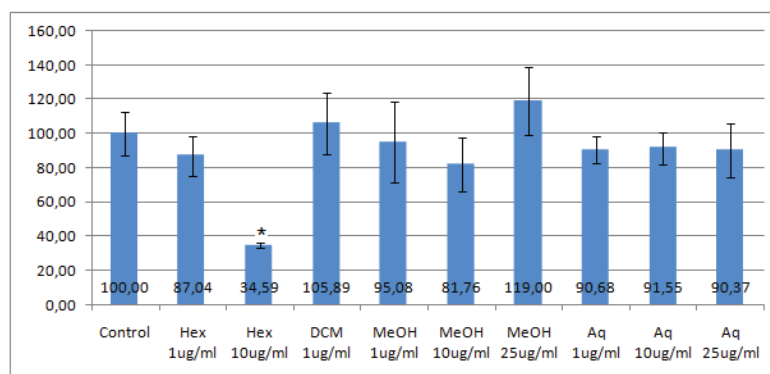
Con los extractos Diclorometánicos a las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se presenta elevada toxicidad siendo la última de éstas la que mayor efecto negativo generó sobre la viabilidad celular entre todos los extractos que se evaluaron (< 23% de Viabilidad), no así a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. que no afectó significativamente la supervivencia de los macrófagos.

Las distintas concentraciones de los extractos Metanólicos y Acuosos no presentaron toxicidad en este modelo, sin embargo hay una aparente tendencia, no significativa, en los extractos acuosos a disminuir la viabilidad del cultivo celular con el incremento de sus concentraciones.

Estos resultados nos permitieron establecer qué concentraciones de los distintos extractos serían consideradas válidos en los ensayos para evaluar la inhibición de la producción de Óxido Nítrico, de esta manera se tomaron en cuenta para esta siguiente prueba los resultados de aquellos extractos con viabilidad superior al 95%, por consiguiente no se consideraron los valores generados con el extracto hexánico a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y Diclorometánicos a 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Al analizar los resultados del extracto Hexánico en el ensayo de inhibición de la producción de Óxido Nítrico se evidencia actividad a las concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ya que reducen la cantidad de nitrito (producto del oxido nítrico generado) en el medio de cultivo y en el caso de la última concentración llega a disminuirlo en más del 60%, siendo este extracto el único que muestra esta capacidad, los restantes extractos se mostraron inactivos en este modelo de investigación a las concentraciones empleadas (fig. 5.23).

Fig. 5.23. Efecto de los extractos (frente al control considerado como 100%) sobre la producción de nitritos



Las barras indican la media de las concentraciones (IC 95%), se evidencia que solo el Hexánico a 10 $\mu\text{g/ml}$ produce una reducción significativamente diferente ($p < 0,05$)

Discusión

La evaluación de la acción inhibitoria sobre la producción de Óxido Nítrico en las células RAW 264,7 de los cuatro extractos (Hexánico, Diclorometánico, Metanólico y Acuoso) a las mismas concentraciones finales (1, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$); indica que el extracto hexánico (a las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$) es el único que presenta actividad y que se refleja por la disminución de la cantidad de nitrito en el medio de cultivo y que se deriva del óxido nítrico que se les induce a generar.

Es interesante destacar que a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de extracto hexánico la inhibición en la producción de Oxido Nítrico es menor al 20 % mientras a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ la inhibición supera el 60% sin que el incremento en 10 veces de la concentración de extracto afecte la viabilidad celular.

Existen antecedentes de un grupo de principios activos conocidos como ácidos anacárdicos presentes en algunas plantas y que también han sido encontrados en *Viola websteri* cuya extracción del material vegetal la han conseguido usando un solvente apolar como Éter de Petróleo (Lee, 2009); estos ácidos han mostrado capacidad de modular a varios componentes de vías de señalización celular involucradas en procesos inflamatorios inhibiendo mecanismos tanto a nivel epigenético (Ghizzoni, 2010) y de tipo transcripcional al producir una potente inhibición de la activación del factor transcripcional NF- κ B (Factor Nuclear kappa B) que controla la transcripción de

5. - Resultados y Discusión

varios genes y entre éstos destaca el que codifica para la enzima Oxido Nítrico Sintetasa Inducible (iNOS) (Sung, 2008)

Las citotoxicidades de los extractos Diclorometánicos a las concentraciones de 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$, puede prestarse para algunas interpretaciones, ya que si bien se puede observar en los resultados una disminución en la producción de óxido nítrico, en primera instancia podría relacionarse este efecto con la disminución de la viabilidad celular a estas concentraciones, sin embargo, no es menos cierto que aun no se podría descartar que dentro de una composición tan compleja como la de un extracto vegetal puedan coexistir metabolitos que generen esta toxicidad junto a metabolitos bioactivos y que no sean detectados bajo estas condiciones experimentales por afectar a las células pero quizás si puedan ponerse de manifiesto aislándolos a través de procesos de fraccionamiento y purificación, además, la ausencia de toxicidad del extracto a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ deja abierta aun la posibilidad de evaluar el extracto a concentraciones un poco superiores aunque en un margen muy estrecho teniendo en cuenta la toxicidad que ya se manifiesta a 10 $\mu\text{g/ml}$.

El caso del extracto metanólico es diferente al anterior, ya que si bien existe una ausencia de efecto inhibitor en la generación de ON, a estas mismas concentraciones tampoco se detectan efectos tóxicos en las células y la posibilidad de utilizar concentraciones superiores a 25 $\mu\text{g/ml}$ es un camino válido en la búsqueda de sustancias con esta actividad biológica.

Para los extractos acuosos es la situación es similar, un primer paso consistiría en determinar el rango de concentraciones mayores a 25 $\mu\text{g/ml}$ que sin afectar la viabilidad celular permita evaluar su actividad en este modelo de investigación, ya que si nos remitimos simplemente a las concentraciones empleadas en este estudio, la ausencia de respuesta inhibitoria por esta vía de señalización celular vinculada con la inflamación nos indica que este no sería el mecanismo por el que puede actuar la infusión de la planta que como hemos anotado anteriormente es la forma en que se la usa en medicina tradicional, teniendo siempre en cuenta varios aspectos:

1) La síntesis de óxido Nítrico es sólo uno de los mecanismo que se ponen en marcha en el proceso de la inflamación, y la complejidad de esta respuesta biológica se debe a

5. - Resultados y Discusión

la gran cantidad de actores y que incluyen a Prostaglandinas, Leucotrienos, Histamina, Serotonina, Proteasas, Especies reactivas de Oxígeno (además del ON), infiltración celular, etc. por lo que, para generar una evaluación más cercana del verdadero potencial de una sustancia por métodos *in vitro* se deberían analizar su actividad frente a varios de estos agentes participantes en la inflamación, así que la evaluación que se ha realizado en este estudio representa solo una parte de esta primera etapa.

2) Los procesos farmacocinéticos a los que se enfrentan los principios activos en el organismo, ausentes en las evaluaciones *in vitro*, desempeñan papeles fundamentales ya que en muchos casos las reacciones metabólicas que se ejecutan son las que transforman a sustancias inactivas *in vitro* en moléculas con acción farmacológica *in vivo*.

Un aspecto que no se podría descartar hasta identificar a la sustancia (o sustancias) en el extracto hexánico responsables de la acción biológica investigada es que ésta se encuentre presente también en la infusión de la planta, obviamente el hecho de que su extracción se haya realizado con un solvente como hexano nos habla de su lipofilicidad, sin embargo, el tratamiento térmico en la infusión de muchas plantas ha mostrado que es capaz de solubilizar sustancias con baja polaridad aunque es claro que estarán en bajas proporciones.

6.- Conclusiones

6. - Conclusiones

Con los nombres vulgares de “violeta del campo” o “violeta roja” es conocida una especie perteneciente al género *Viola*, cuyas partes aéreas son utilizadas popularmente en Ecuador para tratar el “dolor de huesos” y otras patologías relacionadas con los procesos inflamatorios.

Se describieron los principales elementos de diagnóstico de las hojas de *V. arguta*, así como los valores de los índices de estoma y de empalizada. Si bien estos últimos no permiten por si solos establecer la identidad de esta especie, son útiles para complementar los datos morfológicos

Microscópicamente, las hojas de *V. arguta* pueden ser identificadas por sus índices de estoma y empalizada y mediante la combinación de distintos caracteres, tales como:

- Hojas hipostomática
- Estomas transicionales entre rubiáceos y crucíferos
- Epidermis adaxial y abaxial con células mucilagíferas, abundantes en los dientes
- Epidermis abaxial con pelos unicelulares o uniseriados, acintados con cutícula estriada.
- Abundantes cristales (drusas) formando una capa por debajo del parénquima en empalizada.

Teniendo en cuenta el uso tradicional de *V. arguta* y la posibilidad de que en un futuro integre la formulación de medicamentos fitoterapicos, el análisis de estos elementos de diagnóstico, junto a la determinación de los perfiles cromatográficos y ensayos fitoquímicos constituye la base para un futuro control de calidad.

Desde el punto de vista fitoquímico, todos los extractos de *V. arguta* dan positivas las reacciones preliminares para flavonoides, siendo las flavonas los compuestos que parecen predominar en los extractos DCM y metanólico, lo que sugiere que estos metabolitos se hallan tanto como aglucones como en forma de heterósidos

6. - Conclusiones

En tanto que los ensayos para detectar taninos y saponinas solo son positivos para los extractos mas polares (metanólico y acuoso). Todos estos resultados preliminares son confirmados por las respectivas CCD, que también nos permiten confirmar la ausencia de acido salicílico.

En cuanto a la existencia de otros ácidos orgánicos, dadas las reacciones orientativas previamente realizadas y el comportamiento que observamos al revelar las correspondientes CCD, no se descarta la presencia de aglucones de tipo triterpenico en el extracto hexanico.

Mediante la aplicación de métodos descritos en la bibliografía, que hemos modificado a fin de optimizar el procedimiento de extracción y purificación, se ha podido confirmar la presencia de ciclótidos en la especie estudiada. Estos ciclopéptidos son descritos por primera vez en esta *Viola arguta*.

Los compuestos que reaccionan con anisaldehido sulfúrico, predominan en los extractos hexánico y también aparecen en el metanólico (posible presencia de sustancias de naturaleza terpenica).

Respecto a sus actividades, se comprueba la actividad antioxidante, que es mucho más notable en el extracto más polar (metanólico), y la actividad antiinflamatoria *in vitro*, siendo el extracto hexánico el único que inhibió la producción de oxido nítrico: ca. 60% de inhibición, sin mostrar toxicidad para las células.

De acuerdo a estos últimos resultados, podría inferirse que *V. arguta* no tendría las propiedades antiinflamatorias que se le atribuyen tradicionalmente, dado que lo que se utiliza es la infusión (acuosa) y los compuestos antiinflamatorios se hallan en el extracto hexánico. Sin embargo, no debe olvidarse la presencia de saponinas, que podrían actuar en forma sinérgica, facilitando la extracción de esos compuestos con solventes mas polares.

En cuanto al trabajo a seguir incluiría poner a punto el paso de extracción que se introdujo ya que si bien nos ayudó a resolver el problema de interferencias antes indicado y sabemos que un proceso de extracción Líquido- Líquido más exhaustivo en relación al realizamos en este trabajo podría llevarnos a mejores resultados, así

6. - Conclusiones

también cabría la posibilidad de que sustituir la centrifugación por otro método como el filtrado y lavado del precipitado faciliten la tarea, también está pendiente definir la composición ideal de la mezcla de solventes que usamos para la precipitación, calcular rendimientos parciales para el proceso y que tan eficiente es en la extracción, además, un paso que se podría agregar es la extracción líquido-líquido: butanol-agua (Broussalis, et al. 2001) así a través de la suma de estos sencillos procesos se podría llegar a una eliminación eficiente de muchos productos previo a su purificación definitiva

De todo lo expuesto, podemos concluir que *V. arguta* es una especie promisoría desde el punto de vista de un posible uso medicinal, debiéndose encarar la realización de estudios más exhaustivos a fin de:

- Identificar los compuestos presentes en los distintos extractos.
- Purificar, aislar e identificar los ciclótidos presentes.
- Confirmar la actividad antiinflamatoria de *V. arguta*

7.- Resúmen

***Viola arguta* (Violaceae)
una especie de la medicina tradicional
ecuatoriana**

**Elementos de diagnóstico, ensayos fitoquímicos y
actividades biológicas**

**Tesis de Maestría para optar al grado de
Magíster en Plantas Medicinales, UNLP**

**Bioquímico
Juan Marcelo Carpio Arevalo**

**Directora de Tesis
Dra. María Adelaida Rosella**

Lugar de trabajo:
Cátedras de Farmacobotánica y Farmacognosia,
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

2012

Introducción

Ecuador se reconoce desde la Constitución del año 1998 como un país pluricultural y multiétnico y que además está ubicado en uno de los sitios de mayor megabiiodiversidad del Planeta.

Dentro de esa biodiversidad, *Viola arguta* es una planta endémica del país, que crece en la zona cordillerana, a altitudes de 1500 a 3500 msm, en las Provincias de Zamora-Chinchipe, Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Morona-Santiago, Pichincha, Zamora-Chinchipe y Loja.

Conocida como violeta del campo o violeta roja, es utilizada tradicionalmente para el tratamiento de diversas afecciones, entre ellas algunas relacionadas con la capacidad antiinflamatoria que se le atribuye.

Hasta donde sabemos, no existen hasta el momento datos botánicos que permitan su reconocimiento, ni información sobre su composición química y actividades biológicas que justifiquen su empleo en terapéutica.

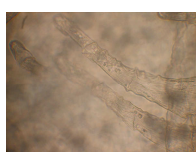
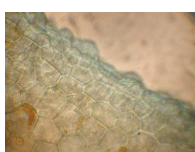
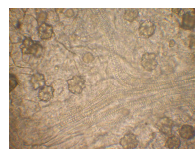
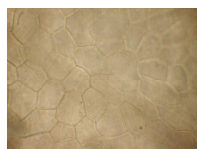
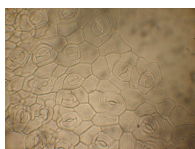
A fin de proveer elementos de diagnóstico que contribuyan a su identificación, y eventual control de calidad, así como contribuir a su estudio fitoquímico se encara el análisis micrográfico de esta especie, así como se efectúan los ensayos fitoquímicos preliminares, detección de metabolitos secundarios característicos del género *Viola* y la determinación de la acción antioxidante y actividad antiinflamatoria

Resultados obtenidos

Elementos de diagnóstico y determinación de valores numéricos en hojas de *V. arguta*

Botánicamente, las hojas de *V. arguta*, pueden ser identificadas por la combinación de diversos caracteres, siendo los principales:

Hojas hipostomática, estomas transicionales entre rubiáceos y crucíferos, epidermis adaxial y abaxial con células mucilagíferas, abundantes en los dientes, epidermis abaxial con pelos unicelulares o uniseriados, acintados con cutícula estriada, Abundantes cristales (drusas) formando una capa por debajo del parénquima en empalizada.



Los valores numéricos se muestran en la siguiente tabla

Tabla Magnitudes cuantitativas

	Rango	Promedio	Moda
Índice estomático	15,15 – 21,42	17,31	15,30
Índice empalizada	5,00-14,50	9,65	9,00

Ensayos fitoquímicos

Respecto a los ensayos fitoquímicos preliminares, las reacciones efectuadas permiten establecer la presencia de los siguientes grupos fitoquímicos: taninos y saponinas en los extractos metanólico y acuoso; mucílagos, en el extracto acuoso, confirmado mediante la reacción histoquímica con azul de metileno; flavonoides en todos los extractos (hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso).

Tabla resumen de las reacciones químicas orientativa efectuadas en extractos de *V. arguta*

Principio activo	Hexánico	DCM	Metanólico	Acuoso	Extracto específico MeOH 60%	Reacción histoquímica en hoja
Alcaloides	N/R	N/R	N/R	N/R	Negativo	N/R
Antraquinonas	N/R	N/R	N/R	N/R	Negativo	N/R
Saponinas	N/R	N/R	Positivo	Positivo	N/R	N/R
Taninos	N/R	N/R	Positivo	Positivo	N/R	N/R
Mucílagos /gomas	N/R	N/R	N/R	Positivo	N/R	Positiva
Flavonoides	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N/R	N/R

La cromatografía en capa delgada realizadas permite establecer una serie de perfiles cromatográficos típicos para cada extracto y que son concordantes con los resultados obtenidos mediante las reacciones preliminares para los distintos extractos.

Las características de color y fluorescencia y Rf de las bandas, indicaría la presencia de aglucones de cumarinas en el extracto hexánico; aglucones tipo flavona en el extracto diclorometánico; heterósidos de flavonas y cumarinas en el extracto metanólico y la ausencia en este ultimo extracto de ácido salicílico.

La CCD contra testigo en el sistema VII (Acetato de etilo/ ácido acético/ ácido formico/ agua 100:11:11:26) y el análisis por HPLC permiten confirmar, entre los heterósidos flavonoides, la presencia de vitexina en el extracto metanólico.

Tabla Perfil cromatográfico del extracto hexánico

Vis	Rf			AS
	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	RPN + UV ₃₆₆	
0 (amarillo claro)				
0,1 (amarillo)				
0,13 (amarillo)				
		0,17 (café)		
0,38 (verde amarillenta)				
0,5 (verdosa)				
0,52 (grisácea)				
0,66 (grisácea)				
	0,69			
	0,75			0,75 (violácea)
	0,82	0,82 (azulado)		
				0,88 (violácea)
	0,94	0,94 (azul)	0,94 (crema-azulado)	0,94 (café)
0,98 (naranja)				

Tabla Perfil cromatográfico del extracto DCM

Vis	Rf		
	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	RPN + UV ₃₆₆
0 (verde oscuro)			
0,07 (amarillo)		0,07 (marrón)	0,07 (amarillo)
0,1 (amarillo)		0,1 (marrón)	0,1 (amarillo)
0,13 (amarillo)		0,13 (marrón)	0,13 (amarillo)
0,17 (amarillo intenso)		0,17 (marrón)	0,17 (amarillo intenso)
0,19 (café-grisáceo)		0,19 (azul violáceo)	
0,98 (naranja)			

Tabla Perfil cromatográfico del extracto Metanólico

Vis	Rf		
	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆	RPN + UV ₃₆₆
0 (marrón)			
0,21 (amarillo)		0,21 (marrón)	0,21 (amarillo intenso)
0,44 (amarillo)		0,44 (marrón)	0,44 (amarillo intenso)
0,52 (amarillo)		0,52 (marrón)	0,52 (amarillo intenso)
	0,62		
	0,75	0,75 Fluores. Celeste NH3	
	0,85		
0,89 (gris verdoso)			
0,98 (verde oscuro)			

Caracterización de ciclótidos

La extracción y semipurificación de ciclótidos, se efectuó empleando los métodos de Claeson y Burman, que fueron modificados a fin de optimizar el procedimiento.

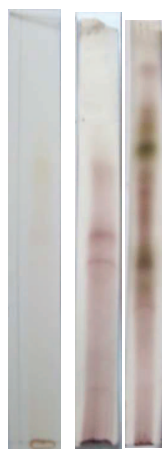
Como primer paso se realizaron extracciones preliminares del material vegetal (10g) de forma secuencial con Hexano y Diclorometano,

El marco de la extracción con DCM se extrajo con solución de Metanol al 60% en la que los ciclótidos se solubilizan (Burman., et al 2010) y constituye la mezcla que se usa comúnmente como paso inicial de extracción.



Comparación de una placa sin Hidrolizar (Izquierda) y con hidrólisis

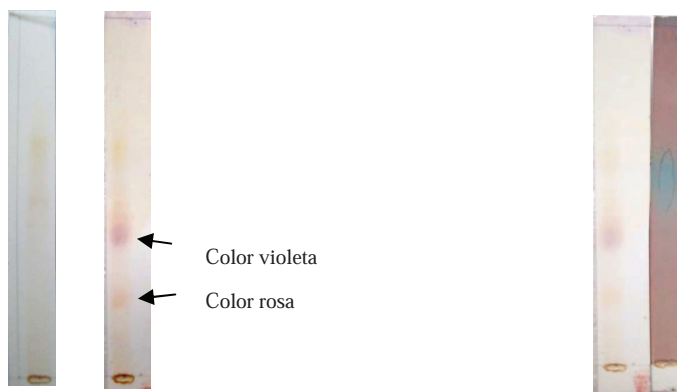
Un paso mas que se implementó con el propósito de eliminar más sustancias interferentes del extracto, consistió en intentar la precipitación de los péptidos en un medio en el que muchas de las sustancias que los acompañaban siguieran siendo solubles. Es así que optamos por evaporar totalmente el extracto metanólico al 60% y retomarlo con una mezcla de Metanol con Diclorometano (10ml+1ml).



Comparación de una placa sin hidrolizar (izq.) y una hidrolizada luego del proceso de semipurificación (centro) y la placa hidrolizada sin el procedimiento (der.)

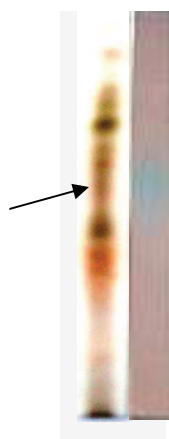
El objetivo fue disminuir la polaridad del metanol lo suficiente para reducir la posibilidad de que este solvente fuera capaz de solubilizar los ciclótidos pero siguiera conservando su poder de disolver el resto de sustancias acompañantes.

Para la detección de ciclótidos en *Viola arguta* se utilizó el método reportado por XU Yan *et al.*, (2008) que emplea Ninhidrina y Azul Brillante de Coomassie G-250.



Comparación de la placa sin hidrólisis
Antes (izquierda) y después del
Revelado con Ninhidrina

Comparación de las placas reveladas con
Ninhidrina (izquierda)
y con Azul Brillante de Coomassie.



Comparación de la placa hidrolizada y revelada
con ninhidrina (izq.) con la placa sin hidrolizar
revelada con azul brillante (der.)

Al haber observado la concordancia de nuestros resultados con aquellos que los autores indican en su Protocolo, nos indicaría que esta especie de *Viola* posee ciclótidos en su composición.

Detección de ácidos por CCD

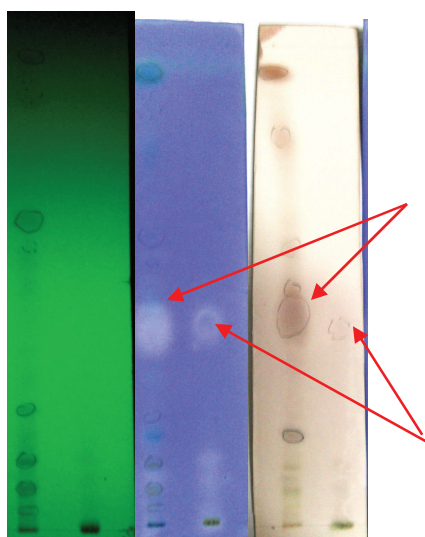
El extracto purificado obtenido partir del extracto hexanico, se cromatografio con el solvente Eter etílico/éter de petróleo/ ácido fórmico 70:30:1

Al observar la placa al UV254 se ven 8 manchas en la calle correspondiente al extracto hexanico y no se aprecia ninguna en el extracto purificado.

Al revelar con azul de bromofenol, aparece, tanto en el extracto hexanico como en el extracto purificado, una mancha amarillenta a Rf 0,46 que toma coloracion rosada si la placa se revela con Anisaldehido sulfurico.

Este comportamiento sugiere que se ha aislado a partir del extracto hexanico una sustancia de naturaleza acida, que podria ser de naturaleza terpenica. Según Wagner y Bladt (1996), las saponinas, a excepción de la glicirricina y el acidoglicirretico presentes en el regaliz, no son detectables por exposición a la luz UV254 o UV366 requiriendo un tratamiento químico.

Dadas las reacciones orientativas previamente realizadas y el comportamiento que observamos al revelar las CCD, podríamos inferir que la sustancia aislada a partir del extracto hexanico seria el aglucon de una saponina.



CCD del extracto hexanico y hexanico purificado con distintos reveladores UV254 (izq.); azul bromofenol (centro); Anisaldehido sulfurico (der.)

Actividad antioxidante *in vitro*

La actividad antioxidante *in vitro* fue evaluada por dos métodos espectrofotométricos: **DPPH** Y **ABTS**, expresándola como μg trolox/mg extracto seco y μg rutina/mg extracto seco respectivamente.

Se determino además la **capacidad reductora** (metodo FRAP), expresada como μg acido ascórbico/mg extracto seco; el **contenido de fenoles totales**, expresados como μg acido tanico/mg extracto seco y el **contenido de flavonoides totales**, expresados como μg rutina/mg extracto seco.

Los resultados obtenidos se resumen en las siguientes tablas:

Actividad frente al radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

Muestra	Dilución	Vol tomado	Abs	Abs2	Abs3	Abs prom	conc por curve equiv ug Trolox/mg ES
V arguta metanol	10	7,5	0,3233	0,3264	0,2991	0,3163	1,78 237
V arguta hexano	10	20	0,4723	0,4825	0,4596	0,4715	0,68 34
V arguta DCM	10	20	0,5447	0,5619	0,4959	0,5342	0,23 12
V arguta agua	1	2,5	0,1778	0,1822	0,1774	0,1791	2,75 110

Actividad frente al radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)

Muestra	Abs prom	conc curva Rutina	Vol usado	Dilución	Equiv ug Rutix/mg ES
V arguta metanol	0,3189	2,06	20	100	1510
V arguta hexanico	0,4563	1,28	20	10	84
V arguta DCM	0,5868	0,55	20	10	21,0
		y = -0,178x + 0,685			

Evaluación de la capacidad reductora por el método FRAP

Muestra	Dilución	ul usados	Abs1	Abs2	Abs3	Abs prom	Conc	Eq 1mM Ac Asc/mgEXT
V arguta metanol	10	10	0,422	0,4210	0,5760	0,5062	14,89	1,49
V arguta hexanico	10	50	0,224	0,2285	0,2281	0,2268	6,67	0,13
V arguta DCM	10	50	0,265	0,2686	0,2643	0,2659	7,82	0,16
V arguta agua	10	10	0,133	0,1396	0,1348	0,1357	3,99	0,40

Determinación del contenido de fenoles totales

Muestra	dilución	Abs	ul tomados	Conc	Equiv	Dilución	ul sembra	Abs 22/11	Conc	Equiv	Dilución	ul sembrac	Abs	Conc	Equiv	Equ ug AT/mg EXT
V arguta metanol	10	0,1302	10	1,81	181,5	10	10	0,1248	1,74	174,0	10	20	0,3922	2,73	136,7	164,1
V arguta hexanico	10	0,0098	10	0,14	13,7	10	10	0,0183	0,26	25,5	10	20	0,0229	0,16	8,0	15,7
V arguta DCM	10	0,0079	10	0,11	11,0	1	10	0,5171	0,72	7,2	10	20	0,0432	0,30	15,1	11,1

Determinación del contenido de flavonoides totales

Muestra	Dilución	ul tomados	Abs1	Abs2	Blanco	Abs final	Conc por curv: equiv ug de Rut/mg EXT
V arguta metanol	10	50	0,1044	0,0811	0,0528	0,03995	13,32
V arguta hexanico	10	50	0,0103	0,015	-0,0141	0,02675	8,92
V arguta DCM	10	100	0,2018	0,2006	0,1031	0,0981	32,70

De la observación de las tablas, se desprende que las TEAC (μg trolox / mg extracto seco) calculadas por el método DPPH para *V. arguta*, resultaron mayores para el extracto mas polar (MeOH).

Asimismo la concentración de fenoles totales, resultó ser muy superior para el extracto metanólico, lo cual sugiere que uno de los responsables de la actividad antioxidante de *V. arguta* serian los compuestos polifenólicos presentes en los extractos mas polares.

La capacidad antioxidante calculada por el método ABTS (μg rutina/mg ES), también resultó mayor para el extracto metanólico, en concordancia con los resultados del método DPPH.

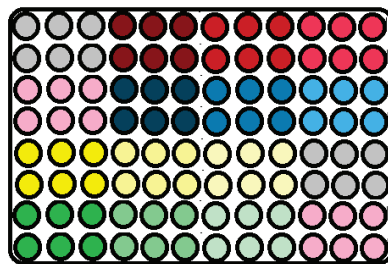
La concentración de sustancias reductoras, calculadas por el método FRAP (μg acido ascórbico/ mg extracto seco) también resulto ser diez veces mayor para el extracto metanólico.

Por otra parte, el contenido de flavonoides es inversamente proporcional a la actividad antioxidante calculada por cualquiera de los métodos anteriormente citados. O sea, los extractos más polares son los que contienen la menor concentración de flavonoides totales expresados como rutina. O dicho de otro modo, los flavonoides se encuentran preferentemente como aglucones (solubles en hexano y diclorometano) y no como heterósidos (más solubles en metanol).

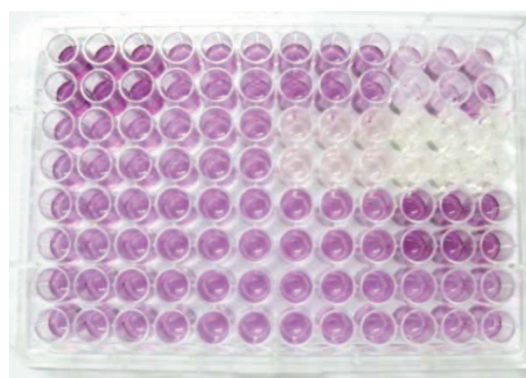
Las sustancias reductoras que contribuyen a la acción antioxidante en ese extracto, son fundamentalmente compuestos polifenólicos.

Actividad antiinflamatoria:
Estudio de la inhibición de la producción de óxido nítrico *in vitro*

Ensayo de citotoxicidad Línea RAW 264,



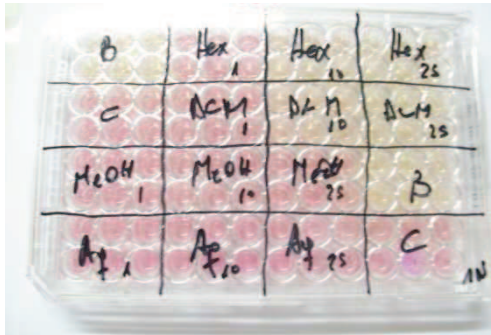
Esquema de la Disposición de los extractos en la placa de 96 pocillos



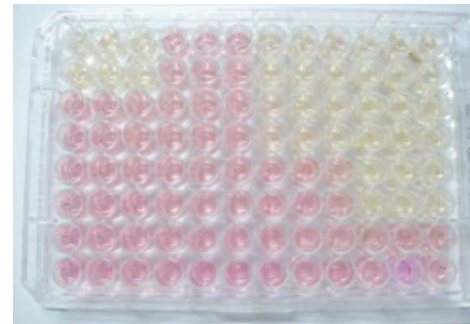
Placa con reactivo MTT para ensayo de citotoxicidad

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

7. - Resumen



Vista de la Placa para Nitritos con los tratamientos indicados en su tapa



Placa para determinación de nitritos con el Reactivo de Griess

Al comparar los valores del Blanco (sin LPS) y el Control (Con LPS) se evidencia una significativa reducción de la viabilidad celular generada por la presencia de este agente inductor de la producción de Óxido Nítrico, por lo que la comparación de la viabilidad de las células sometidas a las diferentes concentraciones de extractos se efectuaron frente al valor de la viabilidad del Control que representa las condiciones de partida del modelo de estudio.

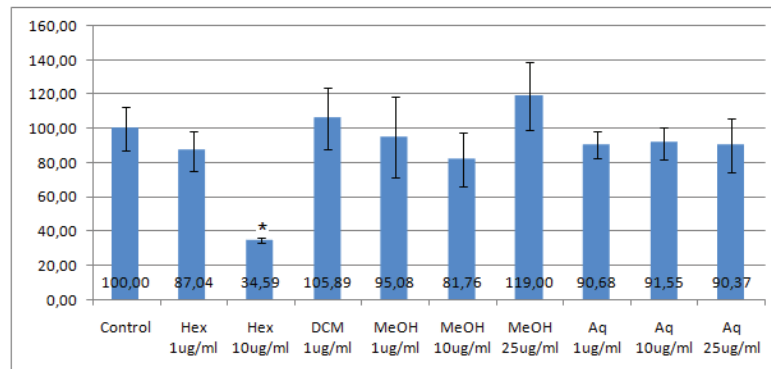
En cuanto al extracto Hexánico, las concentraciones de 1 μ g/ml y 10 μ g/ml no muestran efectos citotóxicos, sin embargo a la concentración de 25 μ g/ml la viabilidad se reduce significativamente (a \ll 95% de viabilidad)-

Con los extractos Diclorometánicos a las concentraciones de 10 y 25 μ g/ml se presenta elevada toxicidad siendo la última de éstas la que mayor efecto negativo generó sobre la viabilidad celular entre todos los extractos que se evaluaron (< 23% de Viabilidad), no así a la concentración de 1 μ g/ml. que no afectó significativamente la supervivencia de los macrófagos.

Las distintas concentraciones de los extractos Metanólicos y Acuosos no presentaron toxicidad en este modelo, sin embargo hay una aparente tendencia, no significativa, en los extractos acuosos a disminuir la viabilidad del cultivo celular con el incremento de sus concentraciones.

Estos resultados nos permitieron establecer qué concentraciones de los distintos extractos serían consideradas válidas en los ensayos para evaluar la inhibición de la producción de Óxido Nítrico, de esta manera se tomaron en cuenta para esta siguiente prueba los resultados de aquellos extractos con viabilidad superior al 95%, por consiguiente no se consideraron los valores generados con el extracto hexánico a 25 μ g/ml y Diclorometánicos a 10 y 25 μ g/ml.

Fig. 5.23. Efecto de los extractos (frente al control considerado como 100%) sobre la producción de nitritos



Las barras indican la media de las concentraciones (IC 95%), se evidencia que solo el Hexánico a 10 $\mu\text{g/ml}$ produce una reducción significativamente diferente ($p < 0,05$)

Al analizar los resultados del extracto Hexánico en el ensayo de inhibición de la producción de Óxido Nítrico se evidencia actividad a las concentraciones de $1\mu\text{g/ml}$ y $10\mu\text{g/ml}$ ya que reducen la cantidad de nitrito (producto del óxido nítrico generado) en el medio de cultivo y en el caso de la última concentración llega a disminuirlo en más del 60%, siendo este extracto el único que muestra esta capacidad, los restantes extractos se mostraron inactivos en este modelo de investigación a las concentraciones empleadas.

Conclusiones

Se describieron los principales elementos de diagnóstico de las hojas de *V. arguta*, así como los valores de los índices de estoma y de empalizada. Si bien estos últimos no permiten por sí solos establecer la identidad de esta especie, son útiles para complementar los datos morfológicos

Microscópicamente, las hojas de *V. arguta* pueden ser identificadas por sus índices de estoma y empalizada y mediante la combinación de distintos caracteres, tales como:

- Hojas hipostomática
- Estomas transicionales entre rubiáceos y crucíferos
- Epidermis adaxial y abaxial con células mucilagíniferas, abundantes en los dientes
- Epidermis abaxial con pelos unicelulares o uniseriados, acintados con cutícula estriada.

- Abundantes cristales (drusas) formando una capa por debajo del parénquima en empalizada.

Teniendo en cuenta el uso tradicional de *V. arguta* y la posibilidad de que en un futuro integre la formulación de medicamentos fitoterapicos, el análisis de estos elementos de diagnóstico, junto a la determinación de los perfiles cromatográficos y ensayos fitoquímicos constituye la base para un futuro control de calidad.

Desde el punto de vista fitoquímico, todos los extractos de *V. arguta* dan positivas las reacciones preliminares para flavonoides, siendo las flavonas los compuestos que parecen predominar en los extractos DCM y metanólico, lo que sugiere que estos metabolitos se hallan tanto como aglucones como en forma de heterósidos

En tanto que los ensayos para detectar taninos y saponinas solo son positivos para los extractos mas polares (metanólico y acuoso). Todos estos resultados preliminares son confirmados por las respectivas CCD, que también nos permiten confirmar la ausencia de acido salicílico.

En cuanto a la existencia de otros ácidos orgánicos, dadas las reacciones orientativas previamente realizadas y el comportamiento que observamos al revelar las correspondientes CCD, no se descarta la presencia de aglucones de tipo triterpenico en el extracto hexanico.

Mediante la aplicación de métodos descritos en la bibliografía, que hemos modificado a fin de optimizar el procedimiento de extracción y purificación, se ha podido confirmar la presencia de ciclótidos en la especie estudiada. Estos ciclopéptidos son descritos por primera vez en esta *Viola arguta*.

Los compuestos que reaccionan con anisaldehído sulfúrico, predominan en los extractos hexánico y también aparecen en el metanólico (posible presencia de sustancias de naturaleza terpenica).

Respecto a sus actividades, se comprueba la actividad antioxidante, que es mucho más notable en el extracto más polar (metanólico), y la actividad antiinflamatoria *in vitro*, siendo el extracto hexánico el único que inhibió la producción de óxido nítrico: ca. 60% de inhibición, sin mostrar toxicidad para las células.

De acuerdo a estos últimos resultados, podría inferirse que *V. arguta* no tendría las propiedades antiinflamatorias que se le atribuyen tradicionalmente, dado que lo que se utiliza es la infusión (acuosa) y los compuestos antiinflamatorios se hallan en el extracto hexánico. Sin embargo, no debe olvidarse la presencia de saponinas, que podrían actuar en forma sinérgica, facilitando la extracción de esos compuestos con solventes mas polares.

En cuanto al trabajo a seguir incluiría poner a punto el paso de extracción que se introdujo ya que si bien nos ayudó a resolver el problema de interferencias antes indicado y sabemos que un proceso de extracción Líquido- Líquido más exhaustivo en relación al realizamos en este trabajo podría llevarnos a mejores resultados, así también cabría la posibilidad de que sustituir la centrifugación por otro método como el filtrado y lavado del precipitado faciliten la tarea, también está pendiente definir la composición ideal de la mezcla de solventes que usamos para la precipitación, calcular rendimientos parciales para el proceso y que tan eficiente es en la extracción, además,

7. - Resumen

un paso que se podría agregar es la extracción líquido-líquido: butanol-agua (Broussalisa, et al. 2001) así a través de la suma de estos sencillos procesos se podría llegar a una eliminación eficiente de muchos productos previo a su purificación definitiva

De todo lo expuesto, podemos concluir que *V. arguta* es una especie promisoría desde el punto de vista de un posible uso medicinal, debiéndose encarar la realización de estudios más exhaustivos a fin de:

- Identificar los compuestos presentes en los distintos extractos.
- Purificar, aislar e identificar los ciclótidos presentes.
- Confirmar la actividad antiinflamatoria de *V. arguta*

8.- Bibliografía

8. Bibliografía

- AL-QURAN. (2008) Taxonomical and Pharmacological Survey of Therapeutic Plants in Jordan. *Journal of Natural Products*. 1:10-26
- ANTIL, V.; Kumar P, Kannappan N, Diwan A, Saini P, Singh S (2011) Evaluation of the analgesic activity of *Viola odorata* aerial parts in rats. *Journal of Natural Pharmaceuticals* 2(1): 24-27
- ARANGO MEJÍA, María Cristina (2006) “*Plantas medicinales: botánica de interés medico*” Ed. María Cristina Arango Mejía, Mexico DC
- AUBAD LOPEZ, P.; Rojano, B.A.; Lobo Echeverri, T. (2007) Actividad antioxidante en musgos. *Scientia et Técnica Universidad tecnológica de Pereira*, Colombia. XIII (033): 23-26
- BALLARD, Harvey E. Jr (1994) Flora del bajo y de regiones adyacentes. Fascículo 31 VIOLACEAE. *Department of Botany University of Wisconsin-Madison*. Madison, Wisconsin, U.S.A.
- BARREIRO Olga, Pilar Martín, Roberto Gonzalez-Amaro, Francisco Sanchez-Madrid. (2010) Molecular cues guiding inflammatory responses *Cardiovascular Research* 86, 174–182
- BECK P. L., R. Xavier, J. Wong, I. Ezedi, H. Mashimo, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, A. K. Bhan, D. K. Podolsky. (2004). Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G137-G147.
- BENZIE, I.F.F.; Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76.
- BOHLIN, Lars; Ulf Goransson; Cecilia Alsmark Christina Weden; Anders Backlund. (2010) Natural products in modern life science. *Phytochem Rev* 9:279–301
- BRAND-WILLIAMS, W.; Cuvelier, ME; Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30
- BROUSSALISA Adriana M., Ulf Goransson, Jorge D. Coussio, Graciela Ferraro, Virginia Martino, Per Claeson. (2001) First cyclotide from *Hybanthus* (Violaceae) *Phytochemistry* 58: 47–51

8. Bibliografía

- BURMAN, ROBERT. (2010). Distribution and chemical diversity of cyclotides from Violaceae. *Thesis for the degree of Doctor of Philosophy (Faculty of Pharmacy)*. Upsala Universiteit, Sweden.
- BURMAN Robert, Christian W. Gruber, Kristina Rizzardj, Anders Herrmann, David J. Craik, Mahabir P. Gupta, Ulf Göransson. (2010). Cyclotide proteins and precursors from the genus *Gloeospermum*: Filling a blank spot in the cyclotide map of Violaceae. *Phytochemistry* 71: 13–20
- CAIA Yizhong, Qiong Luob, Mei Sunc, Harold Corke (2004) Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74 2157–2184
- CAMARERO, Julio A. (2011). Legume cyclotides shed light on the genetic origin of knotted circular proteins. *PNAS* 108 (25): 10025–10026
- CATALOGO de plantas vasculares de Ecuador (2011) <http://www.tropicos.org/specimen/252964?projectid=2> (recuperado Diciembre 2011)
- CAVIN, A.; Hostettmann, K.; Dyatmyko, W.; Potterat, O. (1998) Antioxidant and Lipophilic Constituents of *Tinospora crispa*. *Planta Med* 64: 393-396
- CHEN Bin, Colgrave Michelle L, Daly Norelle L., K. Rosengren Johan, Gustafson Kirk R, Craik David J. (2005). Isolation and Characterization of Novel Cyclotides from *Viola hederaceae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(23):22395-405
- CHEN, Ing-Chien, Hui-Chi CHANG, Hui-Wen YANG, Gan-Lin CHEN (2004) Evaluation of Total Antioxidant Activity of Several Popular Vegetables and Chinese Herbs: A Fast Approach with ABTS/H₂O₂/HRP System in Microplates. *Journal of Food and Drug Analysis* 12(1): 29-33
- CHOI Hyon K.; David B. Mount; Anthony M. Reginato. (2005) Pathogenesis of Gout *Ann Intern Med*.143: 499-516.
- CHUNG1 Ill-Min, Su-Hyun Seo, Eun-Young Kang, Won-Hwan Park, Hyung-In Moon. (2009) Anti-malarial activity of 6-(8'-pentadecenyl)-salicylic acid from *Viola websteri* in mice. *Malaria Journal* 8:151
- CLAESON Per, Ulf Goransson, Senia Johansson, Teus Luijendijk, Lars Bohlin (1998). Fractionation Protocol for the Isolation of Polypeptides from Plant Biomass. *J.*

- Nat. Prod.* 61: 77-81
- COLGRAVE Michelle L., Kotze Andrew C., Huang Yen-Hua, O'Grady John, Simonsen Shane M., Craik David J. (2008) Cyclotides: Natural, Circular Plant Peptides that Possess Significant Activity against Gastrointestinal Nematode Parasites of Sheep. *Biochemistry* 47 (20): 5581–5589
- CONTRERAS Janette, Ahmed Y.O. Elnagar, Sarah F. Hamm-Alvarez, Julio A. Camarero (2011) Cellular uptake of cyclotide MCoTI-I follows multiple endocytic pathways. *Journal of Controlled Release* 155: 134–143
- COZZOLINO, Rosanna, Pasquale Palladino, Filomena Rossi, Gaetano Cali, Ettore Benedetti, Paolo Laccetti. (2005) Antineoplastic cyclic astin analogues kill tumour cells via caspase-mediated induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 26(4): .733--739
- CRAIK, David J., Joshua S. Mylne, Norelle L. Daly. Cyclotides: macrocyclic peptides with applications in drug design and agriculture. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 9–16
- DALBETH N., D. O. Haskard (2005) Mechanisms of inflammation in gout. *Rheumatology* 44:1090–1096
- DALY, Norelle L., Rosengren K. Johan, Craik David J. (2009) Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(11):918-30.
- De LEÓN EJ, Alcaraz MJ, Dominguez JM, Charris J, Terencio MC. (2003). 1-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-3-(3(2-chloroquinolinyl))-2-propen-1-one, a chalcone derivate whit analgesic, anti-inflammatory and immunomodulatory properties. *Inflamm. Res.* 52:246-257.
- DELLAI Afef, Igor Maricic, Vipin Kumar, Sergey Arutyunyan, Abderrahman Bouraoui, Adel Nefzi. (2010). Parallel synthesis and anti-inflammatory activity of cyclic peptides cyclosquamosin D and Met-cherimolacyclopeptide B and their analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20: 5653–5657
- DIAZ ACOSTA AE, Membrillo Hernandez J (2006) Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *TIP revista especializada en ciencias químico-biológicas* 9(1): 34-44
- DIZZEO DE STRITMATTER, C. (1973). Nueva técnica de diafanización. *Boletín de la*

8. Bibliografía

- Sociedad Argentina de Botánica* 15:126-129.
- DOMINGUEZ, X. A. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa S. A., México, D. F.
- EBRAHIMZADEH Mohammad Ali, Nabavi Mohammad Seyed. Nabavi Fazel Seyed, Bahramian Fatemeh, Bekhradnia Ahmad Reza, (2010). Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum.*, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1): 29-34
- EVANS, William Charles (2009). Trease and Evans' Pharmacognosy, 16th Edition. Ed. Saunders Ltd Elsevier, USA
- FARMACOPEA Nacional Argentina VI ed, (1978)
- FEGHALI Carol A., Timothy M. Wright. (1997). Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* 2: 12-26
- FERMOR, B; SE Christensen, I Youn, JM Cernanec, CM Davies, JB Weinberg. (2007). Oxygen, nitric oxide and articular cartilage. *ECells and Materials* 13: 5 6 – 6 5
- GAN Ren-You, Lei Kuang, Xiang-Rong Xu, Yuan Zhang, En-Qin Xia, Feng-Lin Song, Hua-Bin Li. (2010) Screening of Natural Antioxidants from Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Treatment of Rheumatic Disease. *Molecule* 15: 5988-5997
- GEORGÉ, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M.J. (2005) Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* 53:1370-1373
- GHIZZONI Massimo, André Boltjes, Chris de Graaf, Hidde J. Haisma, Frank J. Dekke. (2010). Improved inhibition of the histone acetyltransferase PCAF by an anacardic acid derivative. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18: 5826–5834
- GOMES DE MELO, Joabe, Ariane Gaspar Santos, Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim, Silene Carneiro do Nascimento, Ulysses Paulino de Albuquerque.(2011). Phytochemical and pharmacological notes of plants indicated to treat tumors in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(4): 744-753.
- GOVERS Roland, Ton J. Rabelink (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F193-F206,
- ANDERS, Herrmann (2007) Structure and Activity of Circular Plant Proteins Cytotoxic

8. Bibliografía

- Effects of *Viola Cyclotides*. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy (Faculty of Pharmacy). Upsala Universiteit, Sweden
- IWALEWA, E. O.; L. J. McGaw, V. Naidoo, J. N. Eloff. (2007) Inflammation: the foundation of diseases and disorders. *African Journal of Biotechnology* 6 (25): 2868-2885.
- IZCO Jesús, Pulgar Íñigo, Aguirre Zhofre, Santin Fernando, (2007) Estudio florístico de los páramos de pajonal meridionales de Ecuador. *Revista peruana de biología*, 14(2): 237-246.
- JANOVSKÁ D., K, Kubíková, L. Kokoška (2003) Screening for Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Species of Traditional Chinese Medicine *Czech J. Food Sci.* 21(3): 107–110
- KHATIBI, A., A.H. Shah, A.M. Ageel, M.S. Ahmad, M.A. AL-Yahya, M. Tariq Saudi (1989). Folk medicine: phytochemical and antimicrobial screening Pakistan J. Pharm. Sci.2(1): 29- 34,
- KARIOTI Anastasia, Claudia Furlan, Franco Francesco Vincieri, Anna Rita Bilia. (2011). Analysis of the constituents and quality control of *Viola odorata* aqueous preparations by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem* 399(4):1715-23.
- KORHONEN, Riku, Aleksi Lahti, Hannu Kankaanranta, Eeva Moilanen. (2005). Nitric Oxide Production and Signaling in Inflammation. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy* 4: 471-479.
- KORWAR, Prakash G., Arun Kumar Beknal, Basawaraj S. Patil, M. A. Halkai, Upendra Kulkarni, Hariprasanna R. C., Srinivas R. Soodam. (2010). A study on phytochemical investigation of *Drynaria quercifolia* Linn. Rhizome. *IJPSR* 1 (12): 148-158
- KUBO Isao, Noriyoshi Masuoka, Tae Joung Ha, Kazuo Tsujimoto (2006). Antioxidant activity of anacardic acids. *Food Chemistry* 99: 555–562
- KUSKOSKI, M.; Asuero, A.G.; García-Parilla, M; Troncoso, A.M.; Fett, R. (2004) Antioxidant Activity of Anthocyanin Pigments. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 24(4): 691-693
- KHATIBI A., A.H. Shah, A.M. Ageel, M.S. Ahmad, M.A. Al-Yahya and M. Tariq (1989).

8. Bibliografía

- Saudi folk medicine: phytochemical and antimicrobial screening. *Pakistan J. Pharm. Sci.* 2(1): 29- 34.
- LEE Sung Jae, Won-Hwan Park, Hyung-In Moon (2009) Bioassay-guided isolation of antiplasmodial anacardic acids derivatives from the whole plants of *Viola websteri*. *Hemsl Parasitol Res* 104:463–466.
- MINGA O. Danilo, Montesinos C. Mónica, (2009), “Puesta en Valor del Qhapaqñan—Red vial Prehispanica Zonas 3 Cañar, 4 Azuay y 5 Loja: Informe de Etnobotánica y cultivos de la Zona 3: Cañar”, Ministerio Coordinador del Patrimonio Cultural y Natural, Instituto Nacional de Patrimonio Cultural, Facultad de Ciencias de la Hospitalidad de la Universidad de Cuenca.
- <http://www.vivetupatrimonio.gob.ec/qn/?p=digitallibrary/digitalcontent&id=203>
Recuperado en Octubre del 2011
- MOON Hyung-In, Ji Eun Kim, Joongku Lee, Ok-Pyo Zee, Jin Ho Chung. (2005). Matrix Metalloproteinase-1 Inhibitor from the Aerial Parts of *Viola ibukiana* Makino *Bull. Korean Chem. Soc.* 26(3): 451-453.
- MOON Hyung-In, Jae-Chul Jung, Joongku Lee (2007) Antiplasmodial activity of triterpenoid isolated from whole plants of *Viola* genus from South Korea *Parasitol. Res.* 100: 641–644.
- MOSMMAN T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applications to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.
- MUÑOZ JÁUREGUI, A.M.; Ramos-Escudero, F.; Alvarado-Ortiz, C.; Castañeda Castañeda, B. (2007) Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev Soc Quím Perú.*, 73(3): 142-149
- MURPHY COWAN Marjorie (1999) Plant Products as Antimicrobial Agents *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 564-582
- NEIRA GONZÁLEZ, Adriana M. (2009) Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antioxidante del extracto clorofórmico de la orquídea comestible *Prosthechea michuacana*. Tesis de Maestría (Instituto Politécnico Nacional, México)

8. Bibliografía

- NICOLAOU K. C., Jason S. Chen, David J. Edmonds, Anthony A. Estrada (2009). Recent Advances in the Chemistry and Biology of Naturally Occurring Antibiotics. *Angew Chem Int Ed Engl.* 48(4): 660–719
- PALADINI, A. (1996). ¿Cómo se Descubre o Inventa un Medicamento? *Ciencia Hoy* 6 (34) <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy34/medic01.htm>. Recuperado en Noviembre de 2011.
- PHAM-HUY, Lien Ai, Hua He, Chuong Pham-Huy. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4 (2): 89-96
- POURAHMAD Jalal (2002). Identification of Intracellular Sources Responsible for Endogenous Reactive Oxygen Species Formation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 1: 21-29
- PRANTING, Maria, Camilla Loov, Robert Burman, Ulf Goransson, Dan I. Andersson. (2010) The cyclotide cycloviolacin O2 from *Viola odorata* has potent bactericidal activity against Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 65: 1964–1971
- QU X W, R A Rozenfeld, W Huang, G B Bulkley, W Hsueh (1999). The role of xanthine oxidase in platelet activating factor induced intestinal injury in the rat. *Gut.* 44: 203–211.
- RE, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231-1237
- REUTER, Simone, Subash C. Gupta, Byoungduck Park, Ajay Goel, Bharat B. Aggarwal, (2011) Epigenetic changes induced by curcumin and other natural compounds. *Genes Nutr* 6: 93–108 .
- REY R. PLAN, Manuel, Ivana Saska, Arsenia G. Caguan, David J. Craik. (2008). Backbone Cyclised Peptides from Plants Show Molluscicidal Activity against the Rice Pest *Pomacea canaliculata* (Golden Apple Snail). *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 5237–5241
- RIMKIENĖ Silvija, Ona Ragapinskienė, Nijolė Savickienė (2003) The cumulation of Wild pansy (*Viola tricolor L.*) accessions: the possibility of species preservation and

8. Bibliografía

- usage in medicine. *MEDICINA* 39 (4): 411-416.
- RIOS, Monserrat, Koziol Michael, Borgtoft Pedersen Henrik, Granda Gabriela, (2007). Plantas Útiles del Ecuador. Editoriales: Universidad Católica del Ecuador, SAMAI, Abya-Yala/UPS Publicaciones, CODEMPE, UICN Conservación Internacional, Quito,
- RODRIGO-GARCÍA, J.; Álvarez-Parrilla, J.; de la Rosa, L.A.; Mercado Mercado, G.; Herrera Duene, B. (2006). Valoración de la capacidad antioxidante y actividad polifenol oxidasa en duraznos de diferentes áreas de producción. *I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados*, San Pedro, SP Brazil,
- ROJANO Benjamin A., Carlos A. Gaviria, Maritza A. Gil., Jairo A. Saez, Guillermo Schinella, Horacio Tournier. (2008). Actividad antioxidante del isoespintanol en diferentes medios antioxidant activity of the isoespintanol in different media. *Vitae* 15 (1): 173-181.
- SALISBURY, E. (1927). On the causes and ecological significance of stomatal frequency with special reference to the woodland flora. *Philosophical Transaction Royal Society of London Ser B* 216: 1-65.
- SAMRA Bibi, Ghulam Dastagir, Farrukh Hussain, Parveen Sanaullah. (2006). Elemental composition of *Viola odorata* Linn. *Pak. J. Pl. Sci.*, 12 (2): 141-143.
- SARVAJEET Singh Gill, Narendra Tuteja (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930
- SASKA Ivana, Amanda D. Gillon, Noriyuki Hatsugai, Ralf G. Dietzgen, Ikuko Hara-Nishimura. (2007) An Asparaginy Endopeptidase Mediates *in Vivo* Protein Backbone Cyclization. *The journal of biological chemistry* 282 (40): 29721–29728.
- SEYDEL, Peter, Heike Dornenburg. (2006). Establishment of *in vitro* plants, cell and tissue cultures from *Oldenlandia affinis* for the production of cyclic peptides. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 85: 247–255
- STEFANOWICZ Piotr (2001) Detection and sequencing of new cyclic peptides from linseed by electrospray ionization mass spectrometry. *Acta bioquimica polonica* 48 (4): 1125–1129.

8. Bibliografia

- SUKSAMRARN Sunit, Narisara Suwannapoch, Natthachai Aunchai, Mayuso Kuno, Pinit Ratananukul, Rachada Haritakun, Chawewan Jansakul, Somsak Ruchirawat (2005). Ziziphine N, O, P and Q, new antiplasmodial cyclopeptide alkaloids from *Ziziphus oenoplia* var. *brunoniana*. *Tetrahedron* 61: 1175–1180
- RIMKIENĖ Silvija, Ona Ragapinskienė, Nijolė Savickienė (2003). The cumulation of Wild pansy (*Viola tricolor* L.) accessions: the possibility of species preservation and usage in medicine. *MEDICINA* 39(4): 411-416.
- TAN Ning-Hua, Jun Zhou (2006) Plant Cyclopeptides. *Chem. Rev.* 106: 840-895
- TANGA, Jun, Conan K. Wang, Xulin Pana, He Yana, Guangzhi Zeng, Wenyan Xua, Wenjun Hea, Norelle L. Daly, David J. Craik, Ninghua Tana. (2010) Isolation and characterization of cytotoxic cyclotides from *Viola tricolor*. *Peptides* 31: 1434–1440
- TENE, Vicente; Malagon, Omar; Vita Finzi, Paola; Vidari, Giovanni; Armijos Chabaco Tomás. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology* 111(1): 63-81.
- TOBEY Robert A., David J. Orlicky, Larry L. Deaven (1978). Effects of Bouvardin (NSC 259968), a Cyclic Hexapeptide from *Bouvardia ternifolia*, on the Progression Capacity of Cultured Chinese Hamster Cells. *Cancer. Res.* 38:4415-4421.
- TOIU, ANCA, Edward Muntean, Iliora Oniga. (2009). Pharmacognostic research on *Viola declinata* Waldst. Et Kit. (Violaceae). *MIRCEA TĂMAȘ FARMACIA* 57(2): 218-222
- TRABI, Manuela, David J. Craik. (2004). Tissue-Specific Expression of Head-to-Tail Cyclized Miniproteins in Violaceae and Structure Determination of the Root Cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide. *The Plant Cell*. 16: 2204–2216
- VANE, John, Regina Botting. (1987). Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEBJ.* 1: 89-96.
- VUKICS Viktoria, Agnes Kery, Guenther K. Bonn, Andras Guttman (2008). Major flavonoid components of heartsease (*Viola tricolor* L.) and their antioxidant activities. *Anal Bioanal Chem* 390:1917–1925
- WALKER Gaby, Josef Pfeilschifter, Dieter Kunz. Mechanisms of Suppression of Inducible Nitric-oxide Synthase (iNOS). Expression in Interferon (IFN)-g-

8. Bibliografia

- stimulated RAW 264.7 Cells by Dexamethasone. *The journal of biological chemistry*
- WAGNER, H.; S. Bladt (1996). *Plant Drug Analysis*. 2nd Edition. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York
- WITKOWSKA-BANASZCZAK E, Bylka W, Matławska I, Goślińska O, Muszyński Z (2005) "Antimicrobial activity of *Viola tricolor* herb" . *Fitoterapia*. 76(5):458-61
- XIE Chen, Nigel C. Veitch, Peter J. Houghton, Monique S. J. Simmonds. (2003) Flavone C-Glycosides from *Viola yedoensis* MAKINO. *Chem. Pharm. Bull.* 51(10) 1204—1207
- XU WenYan, Tang Jun, Ji ChangJiu, He WenJun, Tan NingHua. (2008) Application of a TLC chemical method to detection of cyclotides in plants. *Chinese Science Bulletin* 53(11): 1671-1674.
- YANG, Eun-Jin, Sang-Suk Kim, Tae-Heon Oh, Jong Seok Baik, Nam Ho Lee, Chang-Gu Hyun. (2009). Essential Oil of Citrus Fruit Waste Attenuates LPS-induced Nitric Oxide Production and Inhibits the Growth of Skin Pathogens. *Int. J. Agric. Biol.* 11(6): 791-794
- YUAN Gaofeng, Mark L Wahlqvist, Guoqing He, Min Yang MD, Duo Li, (2006) Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr.* 15 (2): 143-152.
- ZORNING H., G. Weiss. (1925). Beiträge zur Anatomie des Laubblattes officineller und pharmäzeutisch gebräuchlicher Compositen-Drogen. *Archiv für Pharmakologie Berlin* 263: 451-470