



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Medir la capacidad antiinflamatoria de aceites y extractos existentes en el laboratorio mediante el método de estabilización de membrana de glóbulos rojos (HRBC).

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Autor: Armijos Jara, Mercedes Maribel

Director: Cartuche Flores, Luis Emilio

LOJA

2024



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2024

Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 14 de octubre del 2024

Magíster

Claudia Teresa Cruz Erazo

Director de la carrera de Bioquímica y Farmacia

Ciudad. -

De mi consideración:

Me permito comunicar que, en calidad de director del presente Trabajo de Titulación denominado: **Medir la capacidad antiinflamatoria de aceites y extractos existentes en el laboratorio mediante el método de estabilización de membrana de glóbulos rojos (HRBC)** realizado por Mercedes Maribel Armijos Jara, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, así mismo ha sido verificado a través de la herramienta de similitud académica institucional, y cuenta con un porcentaje de coincidencia aceptable. En virtud de ello, y por considerar que el mismo cumple con todos los parámetros establecidos por la Universidad, doy mi aprobación a fin de continuar con el proceso académico correspondiente.

Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Director: Luis Emilio Cartuche Flores Ph.D.

C.I.: 1103767362

Correo electrónico: lecartuche@utpl.edu.ec

Declaración de autoría y cesión de derechos

Yo, Mercedes Maribel Armijos Jara, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

Ser autor (a) del Trabajo de Titulación denominado: **Medir la capacidad antiinflamatoria de aceites y extractos existentes en el laboratorio mediante el método de estabilización de membrana de glóbulos rojos (HRBC)**, de la carrera de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Capítulo uno. Marco teórico; Capítulo dos. Materiales y métodos; Capítulo tres. Resultados y Capítulo cuatro discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo el Dr. Luis Emilio Cartuche Flores, director del presente trabajo; también declaro que la presente investigación no vulnera derechos de terceros ni utiliza fraudulentamente obras preexistentes. Además, ratifico que las ideas, criterios, opiniones, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual de este trabajo.

Que la presente obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: "Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad", en tal virtud, cedo a favor de la Universidad Técnica Particular de Loja la titularidad de los derechos patrimoniales que me corresponden en calidad de autor/a, de forma incondicional, completa, exclusiva y por todo el tiempo de su vigencia.

La Universidad Técnica Particular de Loja queda facultada para ingresar el presente trabajo al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

.....

Autora: Mercedes Maribel Armijos Jara

C.I.:1104499429

Correo electrónico: mmarmijos3@utpl.edu.ec

Dedicatoria

Dedico este logro a Dios, mi fortaleza y refugio, por concederme la sabiduría y salud necesaria para culminar esta etapa.

A mi mami Nancita y a mi mami Deisy, mis pilares fundamentales, quienes me han enseñado a valorar las pequeñas cosas. Han estado a mi lado en cada momento de mi vida, brindándome el aliento necesario para alcanzar mis metas. Gracias por todo lo que soy: mis valores, principios, carácter, perseverancia y el coraje para seguir adelante se lo debo a ustedes. A mi tía Albita por su inmenso amor y consejos, siempre sabios y oportunos.

A mis hermanos, Carlos, Vane y Paul, quienes son mi mayor fuente de inspiración y superación. Su apoyo incondicional, sus valiosos consejos y el amor que me han brindado me han motivado siempre a seguir adelante. A mis queridas princesas Isa y Ale, por ser la alegría de mi vida.

A mi esposo Jimmy, por creer en mi cuando incluso yo dudaba, por tu paciencia infinita en mis momentos de frustración, y por tu amor que ha sido mi refugio en cada etapa de este viaje. Tu apoyo constante ha sido la fuerza que me ha impulsado a alcanzar mis sueños y a superar cada obstáculo. A mi ángel Sophi, mi estrella en el cielo, tu luz sigue guiando mi camino, tu recuerdo ha sido mi inspiración, recordándome que siempre hay esperanza, este trabajo es un tributo a tu memoria y al amor eterno que nos une más allá de cualquier frontera y a mi pequeñita Martina, mi razón de ser, llegaste a nuestras vidas como un regalo del cielo, dándole un nuevo sentido a mi existencia. Eres el motor que me impulsa a ser mejor cada día, a superarme y luchar por un futuro brillante.

Tu apoyo incondicional y tus palabras de aliento han sido fundamentales en mi vida, gracias Mafer por siempre estar presente, por tus consejos y por la fuerza que me has brindado en los momentos más difíciles.

A ustedes, dedico no solo esta tesis, sino cada esfuerzo y logro en mi vida. Son el corazón de mis motivaciones, la fuerza de mi perseverancia y la alegría de mis días. Gracias por ser mi familia, mi apoyo y mi razón para nunca rendirme.

Agradecimiento

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia por su amor incondicional y su apoyo contante a lo largo de este trayecto. Su fe en mí ha sido el motor que me ha impulsado a alcanzar este sueño; sin su respaldo y motivación, este logro no habría sido posible.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la titulación de Bioquímica y Farmacia, especialmente a mi tutor Dr. Luis Cartuche. Su confianza en mí y la oportunidad de realizar este trabajo de titulación han sido fundamentales en mi formación. Agradezco también su paciencia, comprensión y por todos los conocimientos impartidos.

A mi querida amiga Anita, quien ha estado a mi lado en los momentos de estrés y alegrías a lo largo de este desafiante camino. Su apoyo incondicional, su confianza y cariño sincero ha sido fundamental en mi vida. Gracias por ser una amiga excepcional.

Sin lugar a duda, cada uno de ustedes ha dejado una huella imborrable en mi vida y en mi desarrollo profesional.

Índice de contenido

Carátula	I
Aprobación del director del Trabajo de Titulación	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de contenido	VII
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo uno.....	5
Marco Teórico	5
1.1 La inflamación.....	5
1.2 Mediadores de respuesta inflamatoria	5
1.3 Factores de la inflamación	7
1.4 Medicamentos antiinflamatorios.....	8
1.4.1. <i>AINES no selectivos</i>	8
1.4.2. <i>AINES selectivos</i>	9
1.5 La riqueza vegetal como una fuente de agentes antiinflamatorios	11
1.5.1. <i>Importancia económica y medicinal de la diversidad vegetal</i>	11
1.5.1.1. Sector Farmacéutico.....	11
1.5.1.2. Sectores Agrícola, Alimentario, Cosmético y Textil.....	11
1.5.1.3. Beneficios ambientales.	12
1.5.2. <i>Agentes antiinflamatorios derivados de especies vegetales</i>	12
1.6 Modelos de evaluación de actividad antiinflamatoria	15
1.6.1. <i>Modelos in vivo de actividad antiinflamatoria</i>	16
1.6.2. <i>Modelos in vitro de actividad antiinflamatoria</i>	17
Capítulo dos	19

Materiales y métodos.....	19
2.1 Preparación de reactivos.....	19
2.2 Extracción de muestra sanguínea	19
2.3 Preparación de la muestra sanguínea	20
2.4 Preparación de matrices naturales a ensayar.....	20
2.5 Matrices naturales a evaluar para valorar el potencial antiinflamatorio mediante el ensayo de hemólisis de glóbulos rojos (HRBC)	20
2.6 Preparación de controles y ensayo	21
2.7 Condiciones del ensayo y medición espectrofotométrica	22
2.8 Análisis de resultados	23
Capítulo tres.....	25
Resultados	25
3.1 Controles de validación del ensayo.....	25
3.2 Actividad estabilizadora con el control positivo Diclofenaco.....	27
3.3 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de <i>Piper ecuadorensis</i>	28
3.4 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de <i>Mansoa alliacea</i>	29
3.5 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de <i>Punica granatum</i>	30
3.6 Validación del poder protector de <i>Punica granatum</i> sobre eritrocitos bajo el microscopio	31
3.7 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de <i>Punica granatum</i> ajustada a pH 4.0	33
3.8 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de <i>Punica granatum</i> ajustada a pH 5.0	34
3.9 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de <i>Punica granatum</i> ajustada a pH 6.4	35
3.10 Análisis bromatológico de <i>Punica granatum</i>	36
3.11 Actividad estabilizadora con el aceite esencial de <i>Lepechinia betonicifolia</i> ...	37
3.12 Actividad estabilizadora con los extractos y aceites esenciales remanentes.	38

3.13	Cálculo de los porcentajes de hemólisis y estabilización de membrana, del control positivo Diclofenaco y de las muestras de <i>Piper ecuadorensis</i>, <i>Mansoa Alliacea</i> y <i>Lepechinia betonicifolia</i>	38
3.14	Cálculo de los porcentajes de hemólisis y estabilización de membrana, del extracto de <i>Punica granatum</i> y sus tratamientos de pH	40
	Capítulo cuatro.....	42
	Discusión.....	42
	Conclusiones	46
	Recomendaciones	47
	Referencias	48

Índice de tablas

Tabla 1	Tipos de mediadores químicos involucrados en la RIA	6
Tabla 2	Clasificación de los AINEs según selectividad por COX1 y COX2	9
Tabla 3	Modelos in vivo de actividad antiinflamatoria	17
Tabla 4	Tipo de matrices empleados en el ensayo HRBC	21
Tabla 5	Matriz de distribución de soluciones para el ensayo HRBC con sus respectivos controles y prueba de agentes estabilizadores (matriz natural/ agente antiinflamatorio)	21
Tabla 6	Parámetros bromatológicos básicos de la pulpa y semilla de <i>Punica granatum</i>.....	36
Tabla 7	Valores de porcentajes de hemólisis obtenidos para cada concentración.....	39
Tabla 8	Porcentajes de hemólisis y estabilización de membrana eritrocitaria a diferentes dosis del extracto de <i>Punica granatum</i> y diferentes tratamientos de pH.....	40

Índice de figuras

Figura 1	Agentes antiinflamatorios en estudios clínicos derivados de especies vegetales .	14
Figura 2	Microplaca de 96 pocillos con soluciones control	22
Figura 3	Espectro de absorción de la hemoglobina oxigenada.....	23

Figura 4 Validación de la prueba mediante controles negativos y positivos para la liberación de hemoglobina	25
Figura 5 Controles de liberación de hemoglobina para la prueba. Izq. Hb100%, centro. control hiposalina y Der. control isosalina	26
Figura 6 Valoración espectrofotométrica de la liberación de la hemoglobina frente a cuatro dosis de Diclofenaco	27
Figura 7 Valoración espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina frente a cuatro dosis de Piper ecuadoreño	28
Figura 8 Valoración espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina frente a cuatro dosis de Piper ecuadoreño	29
Figura 9 Valoración espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina frente a cuatro dosis de <i>Punica granatum</i>	30
Figura 10 Morfología y recuento eritrocitario dosis GRA1 (izquierda versus control eritrocitos en solución isotónica (derecha)).....	31
Figura 11 Degradación eritrocitaria y de hemoglobina con el tratamiento GRA 1 y GRA2 producto de la acidez de la muestra.....	32
Figura 12 Efecto estabilizador de diluciones decrecientes de <i>Punica granatum</i> ajustado a pH 4.0 sobre la membrana eritrocitaria	33
Figura 13 Efecto estabilizador de diluciones de <i>Punica granatum</i> ajustado a pH 5.0 sobre la membrana eritrocitaria	34
Figura 14 Efecto estabilizador de diluciones decrecientes de <i>Punica granatum</i> ajustado a pH 6.4, sobre la membrana eritrocitaria.....	35
Figura 15 Valoración espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina frente a cuatro dosis de <i>Lepechinia betonicifolia</i>	37

Resumen

La implementación de ensayos *in vitro* ha permitido evaluar un sinnúmero de sustancias y permitido evidenciar las propiedades beneficiosas de las plantas. Este trabajo se centró en estandarizar un método para evaluar la actividad antiinflamatoria en matrices naturales, mediante la utilización de un método de estabilización de la membrana de eritrocitos (HRBC). Se modificaron modelos existentes, obteniendo un protocolo fiable que reduce falsos positivos y negativos. Dentro de las matrices naturales ensayadas, destacaron, el aceite esencial de *Lepechinia betonicifolia* con un CI_{50} de 4.51 mg/mL y el extracto de *Piper ecuadorensis* con 28.42 mg/mL, mientras que, el extracto de *Mansoa alliacea* mostró un efecto menor con una CI_{50} de 177.05 mg/mL. Para el extracto de *Punica granatum*, los valores de IC_{50} oscilaron entre 18.20 y 27.42 mg/mL, ajustándose el pH debido a su alta acidez. Los resultados nos permitieron valorar la idoneidad del método como una medida indirecta de actividad antiinflamatoria, sin embargo, en algunas matrices vegetales, se debe ajustar ciertas condiciones como pH o solubilidad y se debe considerar la citotoxicidad natural de algunas sustancias para no interpretar falsos resultados.

Palabras clave: HRBC, antiinflamatorio, CI_{50} , *Piper ecuadorensis*, *Lepechinia betonicifolia*, *Punica granatum*, *Mansoa alliacea*.

Abstract

The implementation of in vitro assays has enabled the evaluation of countless substances and allowed for the demonstration of the beneficial properties of plants. This work focused on standardizing a method to assess anti-inflammatory activity in natural matrices through the use of the Human Red Blood Cell (HRBC) membrane stabilization method. Existing models were modified, resulting in a reliable protocol that reduces false positives and negatives. Among the tested natural matrices, *Lepechinia betonicifolia* essential oil stood out with an IC_{50} of 4.51 mg/mL, and the extract of *Piper ecuadorensis* with 28.42 mg/mL, while the extract of *Mansoa alliacea* showed a lesser effect with an IC_{50} of 177.05 mg/mL. For the extract of *Punica granatum*, IC_{50} values ranged between 18.20 and 27.42 mg/mL, with pH adjustments due to its high acidity. The results allowed us to assess the suitability of the method as an indirect measure of anti-inflammatory activity. However, in some plant matrices, conditions such as pH or solubility need to be adjusted, and the natural cytotoxicity of certain substances must be considered to avoid misinterpreting results.

Keywords: HRBC, antiinflammatory activity, CI_{50} , *Piper ecuadorensis*, *Lepechinia betonicifolia*, *Punica granatum*, *Mansoa alliacea*

Introducción

En la actualidad, se ha estudiado muchas especies vegetales por sus diversas propiedades medicinales que han demostrado a lo largo de los años. Sin embargo, propiedades como antioxidantes, antibacterianas y antiinflamatorias en ensayos *in vitro*, no se ha logrado estudiarlo a fondo. Para que estos estudios tomen relevancia, primero se han realizado estudios *in vivo*, pero su replicación en modelos animales ha traído mucha controversia. Es por esta razón que se ha intentado replicar estos modelos, pero en ensayos *in vitro* para semejar lo que ocurre en un organismo vivo, pero bajo condiciones que sean menos invasivas.

El daño que se genera a nivel celular es causado por diferentes mecanismos, entre ellos, el estrés oxidativo provocado principalmente por un desequilibrio que tiene efecto tóxico y se da durante la reducción del oxígeno molecular en organismos aerobios. Cuando un grupo de átomos o uno solo tienen un electrón desapareado se los denomina radicales libres; mismos que son la consecuencia de que se genere daños en tejidos y células (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2011).

Las plantas tienen varios componentes fitoquímicos presentes que ayudan a disminuir los efectos del estrés oxidativo y la inflamación crónica; se han descrito que los principales compuestos con propiedades antiinflamatorias son flavonas, flavonoides, fenoles y dihidroflavononas (Us-Medina, 2020).

Bajo estos antecedentes, el presente trabajo de investigación se centró en estandarizar un método *in vitro* para la determinación de actividad antiinflamatoria mediante el método de estabilización de la membrana de glóbulos rojos (HRBC) y así poder evaluar si muestras de origen vegetal o alimentario son capaces de evitar el estrés oxidativo y finalmente, que este protocolo quede como base para posteriores ensayos para el laboratorio de Bioensayos de la Universidad Técnica Particular de Loja.

El trabajo está organizado en cuatro capítulos principales el primero es una revisión bibliográfica acerca de la inflamación, mediadores de respuesta inflamatoria, medicamentos antiinflamatorios, riqueza vegetal como fuente de agentes antiinflamatorios y modelos de

evaluación de actividad antiinflamatoria, en el capítulo dos aborda sobre la metodología aplicada, en el tercer capítulo se describen resultados obtenidos y en el cuarto último capítulo se presenta la discusión de los resultados obtenidos en comparación con otros estudios relevantes y de las mismas características. Finalmente, como cierre del trabajo de investigación se presentaron las conclusiones y recomendaciones.

Capítulo uno

Marco Teórico

1.1 La inflamación

La inflamación es una respuesta reparadora del sistema inmunológico frente a un daño celular, este mecanismo inflamatorio ocasiona un gasto energético metabólico que puede producir una respuesta de fase aguda el cual es caracterizado por manifestaciones clínicas como malestar corporal, fiebre y alteración del perfil proteico y de leucocitos circulantes. Una inflamación aguda local, puede provocar reacciones orgánicas generalizadas las cuales son reacciones que no tienen control y se conocen como inflamación maligna, la misma que va a conducir al daño multiorgánico y provocar la muerte de la persona (García, 2008).

El proceso de inflamación es muy complejo ya que debe adaptar al organismo a circunstancias anormales mediante un mecanismo de homeostasis, mientras que, la respuesta inflamatoria se desencadena a causa de infecciones bacterianas, virales o fúngicas, así como, a una variedad de estímulos generadores de lesiones tisulares tanto traumáticos, autoinmunes, tóxicos, isquémicos, entre otros (Vega, 2008).

Cuando un agente causal provoca una agresión, se libera el proceso inflamatorio el mismo que es mediado tanto por factores celulares como humorales para así restringir y frenar la lesión producida. Como defensa del organismo existen tres elementos; sistemas inespecíficos, respuestas antígeno-específicas y la barrera externa. Una respuesta inicial rápida y controlada tanto humoral como celular en donde la vía de complemento, cininas, coagulación y cascada fibrinolítica es desencadena por la activación conjunta de las células endoteliales y de los fagocitos. Siendo una respuesta útil para mantener el equilibrio entre células y mediadores (García de Lorenzo y Mateos et al., 2000).

1.2 Mediadores de respuesta inflamatoria

Con lo que respecta a los moduladores de la respuesta inflamatoria aguda (RIA), actúan de forma inmediata después de la agresión, produciendo cambios en el flujo sanguíneo y también en el calibre de los vasos, originando primero una alteración en la

permeabilidad vascular, seguido de la extravasación leucocitaria y de plasma (León et al., 2015). En la tabla 1 se describen los principales mediadores químicos frente a la respuesta inflamatoria aguda.

Tabla 1

Tipos de mediadores químicos involucrados en la RIA

Mediador químico	Acción
Óxido nítrico	Citotoxicidad, Incremento de la permeabilidad, vasodilatación
Metabolitos del oxígeno	Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular
Histamina y serotonina	Incremento de la permeabilidad
Prostaglandinas	Vasodilatación, activa a otros mediadores, dolor, fiebre
Factor activador de plaquetas (PAF)	Incremento de la permeabilidad, cebado de leucocitos, broncoconstricción
Bradicinina	Incremento de la permeabilidad, dolor
Leucotrieno B4	Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Leucotrieno C4, D4, E4	Incremento de la permeabilidad, vasoconstricción, broncoconstricción
C3a	Incremento de la permeabilidad opsonina
C5a	Incremento de la permeabilidad, activación leucocitaria, quimiotaxis y adhesión
Citocinas (IL-1 y TNF)	Quimiotaxis, reacciones de fase aguda, activación endotelial

Nota. Adaptado de León et al., 2015. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares

Según García-Carrasco (2016), durante el proceso de inflamación los mediadores químicos van a generar principalmente cuatro mecanismos importantes que se pueden evidenciar de manera clínica:

- **Alteración del calibre vascular:** la respuesta es mediada por la epinefrina y genera una vasoconstricción local. Posteriormente, se produce dilatación arterial por efecto de la histamina.

- **Alteración del flujo sanguíneo:** la primera alteración se da en el aumento de la velocidad del flujo dado por la dilatación arteriolar. Este fenómeno va a provocar que las vénulas no puedan drenar la sangre con la misma velocidad que con la que inicia.
- **Alteración de la permeabilidad:** es incrementada directamente por el agente causal y por la acción de mediadores químicos secundarios principalmente actúan las prostaglandinas y leucotrienos.
- **Formación del exudado:** este se forma por la salida de agua y electrolitos produciendo espacios intracelulares a causa de la salida de fibrina y otro tipo de proteínas. Existen diferentes tipos de exudados y van a depender del proceso inflamatorio que estén cursando.

1.3 Factores de la inflamación

La respuesta inflamatoria es un proceso biológico complejo y esencial del sistema inmunológico que se activa en respuesta a infecciones, lesiones o irritaciones. Este proceso es crucial para la defensa del organismo y la reparación de tejidos, y está mediado por una serie de factores y mediadores químicos (Abbas y Lichtman, 2017). A continuación, se presentan los principales factores involucrados en la respuesta inflamatoria:

- **Células inmunitarias;** dentro de este tipo de células van a estar presentes tres tipos principales: los neutrófilos quienes son los primeros en llegar al sitio de la inflamación en donde cumple la función de fagocitar patógenos y restos celulares. Luego están los macrófagos, que son derivados de los monocitos y tienen como papel principal la liberación de mediadores inflamatorios y finalmente los linfocitos que participan en la respuesta inmunitaria adaptativa y ayudan a mantener la inflamación crónica si es necesario (Medzhitov, 2008).
- **Mediadores químicos;** estos mediadores comprenden a citocinas como interleucinas (IL-1, IL-6), factor de necrosis tumoral (TNF- α) mismos que regulan la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria (Nathan, 2002), quimiocinas quienes dirigen la migración células inmunitarias al sitio de

inflamación y las prostaglandinas y leucotrienos que son derivados del ácido araquidónico modulando la permeabilidad vascular, el dolor y la fiebre (Serhan, Chiang y Van Dyke, 2008).

- **Factores vasoactivos;** entre ellos la histamina liberada por monocitos y basófilos, este aminoácido aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos y contribuye a la formación del edema y el óxido nítrico que es un vasodilatador que tiene propiedades antimicrobianas (Quezada, Pozo y Martínez, 2018).
- **Proteínas del complemento;** se da por la formación de un sistema de proteínas plasmáticas que cuando se activan van a destruir los patógenos directamente o marcar a las células para la fagocitosis (Alarcón, 2020).
- **Factores de coagulación;** los mismos que participan en la formación de coágulos de sangre para limitar la pérdida de sangre y la diseminación de patógenos (Guerrero y López, 2015).

1.4 Medicamentos antiinflamatorios

Un medicamento antiinflamatorio es un fármaco que se utiliza para disminuir la inflamación de los tejidos, sin embargo, estos medicamentos surgen en los años cincuenta y toman el nombre de antiinflamatorios no esteroides (AINEs), los cuales son un grupo de fármacos químicos heterogéneo que también tienen efectos analgésicos aliviando el dolor, efectos antiinflamatorios y efectos antipiréticos disminuyendo la fiebre (Divins, 2014).

Los AINEs tienen un mecanismo de inhibición sobre cierto tipo de enzimas como son las ciclooxigenasas (COX). Estas enzimas tienen una acción catalizadora sobre la síntesis de prostaglandinas (PGs) a partir de ácido araquidónico (AA) y de otros ácidos grasos precursores. Estos AINEs se pueden clasificar de manera general en selectivos y no selectivos, dependiendo de si inhiben a la Ciclooxigenasa 2 (COX-2), o si inhiben indiferentemente a la Ciclooxigenasa 1 (COX-1) o COX-2 Ghlichloo y Gerriets (2023).

1.4.1. AINES no selectivos

Dentro de este grupo se incluyen generalmente medicamentos comúnmente disponibles sin prescripción médica como la aspirina, ibuprofeno o naproxeno, así como

muchas drogas de prescripción que son empleados para el tratamiento del dolor y la inflamación. Estos medicamentos son efectivos para el manejo de diversas condiciones inflamatorias y dolorosas, pero su uso debe ser supervisado por un médico debido a los posibles efectos secundarios, como riesgo de úlceras gástricas, sangrado gastrointestinal y/o daño renal (Moreno y Navarro, 2024).

1.4.2. *AINES selectivos*

También denominados inhibidores COX-2, son tan efectivos en aliviar el dolor y la inflamación como los AINEs no selectivos y menos probables de causar daño gastrointestinal. Entre los principios activos más reconocidos está el celecoxib, etoricoxib y lumiracoxib. Aunque el lumiracoxib se vendía en Ecuador bajo el nombre comercial de Prexige®, a finales del año 2007 se emitió restricciones por parte de la FDA para su comercialización (Burton B., 2007), y lo calificó como un medicamento de riesgo, por presentarse problemas de falla hepática, (requiriendo en algunos casos trasplante hepático). Este medicamento nunca fue aprobado en los Estados Unidos para su comercialización. En diciembre de 2008 finalmente la Agencia de Medicamentos Europeos (EMA, 2007) emitió un comunicado de prensa para el retiro de todas las formas comerciales del medicamento.

A continuación, en la tabla 2 se mencionan algunos de los AINEs no selectivos y selectivos más conocidos que requieren o no prescripción médica:

Tabla 2

Clasificación de los AINEs según selectividad por COX1 y COX2

Tipo Ciclooxygenasa	Fármaco	Indicación terapéutica
Inhibidores COX1	Ibuprofeno	Inflamación, dolor y fiebre
	Diclofenaco	artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante
	Indometacina	artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante y la gota aguda
	Meloxicam	Aliviar la inflamación, dolor y sensibilidad
	Diflunisal	Osteoartritis, artritis reumatoide
	Naproxeno	duración de acción más prolongada. artritis, la tendinitis, la bursitis y el dolor menstrual

	Etodolaco	Aliviar inflamación e hinchazón
	Tolmetin	Artritis, artritis idiopática juvenil, trastornos osteomusculares, espondilitis anquilosante
	Fenoprofeno	Empleado en dolor leve o moderado Indicado en tratamiento odontológicos
	Piroxicam	artritis reumatoide y la osteoartritis
	Ketorolaco	Alivio a corto plazo del dolor moderadamente intenso
	Flurbiprofeno	Aliviar dolor de garganta agudo e irritación
	Ketoprofeno	Cólicos menstruales, fiebre, artritis, inflamación y rigidez
Inhibidores COX2	Parecoxib	Analgésico preventivo
	Celecoxib	Aliviar síntomas de artrosis y artritis reumatoide
	Valdecoxib	Medicamento retirado del mercado por incremento de ataque cardiaco
	Lumiracoxib	Medicamento retirado del mercado por daño hepático
	Rofecoxib	Medicamento retirado del mercado por incremento de ataque cardiaco
	Etoricoxib	Dolor articular, muscular, artrosis, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante y gota

Nota. Adaptado de Keb (2022). Mecanismo de los AINES y antiinflamatorios derivados para el control del dolor y la inflamación. Uso de antiinflamatorios en odontología

Los AINEs en su mayoría, los que actúan en la COX 1 también han presentado tener acciones de protección, a nivel renal, función de constrictor del ovario y útero, dolor, inflamación hemostasia y actúan a nivel del hipotálamo como regulador de la temperatura corporal. Sin embargo, en personas que padecen de enfermedades gastrointestinales no es recomendable prescribir este tipo de medicamentos ya que pueden causar irritabilidad gástrica (Keb, 2022).

Las personas con enfermedad arteria coronaria (ej. Historial de ataque al corazón, angina, historial de ataque cerebro vascular o estenosis intracraneal) así como personas que tienen una alta probabilidad de riesgo para estas enfermedades, deberían evitar su consumo (Carbajal et al., 2013).

1.5 La riqueza vegetal como una fuente de agentes antiinflamatorios

El planeta Tierra alberga una asombrosa diversidad de vida vegetal, con un estimado de más de 390.000 especies de plantas vasculares (Plants of the World Online, 2024). Esta riqueza botánica no solo es una maravilla natural, sino que también representa una fuente invaluable de recursos para la humanidad. Las plantas han sido utilizadas durante miles de años como fuente de alimento, medicina, materiales y otros productos esenciales. En la actualidad, la diversidad vegetal sigue desempeñando un papel fundamental en la economía global y en la salud humana.

1.5.1. *Importancia económica y medicinal de la diversidad vegetal*

Las especies vegetales y particularmente las medicinales y aromáticas han sido empleadas con diferentes fines, sobre todo en el sector farmacéutico, agroalimentario, cosmético o por generar beneficios ambientales (Cupido, De Nova y Cilia-López, 2024).

1.5.1.1. Sector Farmacéutico. La industria farmacéutica depende en gran medida de las plantas como fuente de materia prima para la elaboración de medicamentos. Se estima que alrededor del 25% de los medicamentos modernos tienen su origen en plantas o en compuestos derivados de ellas (World Health Organization, 2021). Un ejemplo notable es la aspirina, derivada del sauce blanco (*Salix alba*), que se utiliza para aliviar el dolor y la fiebre (Aggarwal y Harikumar, 2009). La digoxina, obtenida de la dedalera (*Digitalis purpurea*), se utiliza para tratar la insuficiencia cardíaca (Pervaiz y Rizvi, 2015).

1.5.1.2. Sectores Agrícola, Alimentario, Cosmético y Textil. La diversidad vegetal también tiene una gran importancia económica en sectores como la agricultura, la alimentación, la cosmética y la industria textil. La agricultura depende en gran medida de las plantas para la producción de alimentos, forraje y otros productos agrícolas. La industria alimentaria utiliza las plantas para la elaboración de una amplia gama de productos, desde aceites y especias hasta bebidas y productos procesados. La cosmética se beneficia de los compuestos bioactivos de las

plantas para la elaboración de cremas, lociones y otros productos de belleza. La industria textil utiliza las fibras naturales de las plantas, como el algodón y el lino, para la fabricación de ropa y otros productos textiles (Smith 2023).

1.5.1.3. Beneficios ambientales. La diversidad vegetal también juega un papel crucial en la preservación del medio ambiente. Las plantas contribuyen a la regulación del clima, la purificación del aire y el agua, la prevención de la erosión del suelo y la conservación de la biodiversidad. Además, las plantas son una fuente de energía renovable y pueden utilizarse para la producción de biocombustibles y otros productos biodegradables (León, 2016).

1.5.2. Agentes antiinflamatorios derivados de especies vegetales

La diversidad vegetal ha permitido una exploración química ampliada y se conocen un sinnúmero de compuestos, los cuales se han agrupado en familias de acuerdo con su origen biosintético. Según Montes-Belmont (2009) se ha calculado que se conoce la estructura química de aproximadamente 100 mil metabolitos secundarios que han presentado propiedades biológicas como mecanismos de defensa.

Estos compuestos han presentado una diversidad de aplicaciones farmacológicas, y en el campo de la actividad antiinflamatoria, podemos encontrar compuestos de naturaleza flavonoidea como la curcumina, quercetina, glabridina, luteolina, kaempferol, entre otras. De naturaleza terpénica, se ha reportado al stigmasterol, β -sitosterol, ácido oleanólico, ácido maslínico; en la familia de los lignanos son pocos los agentes antiinflamatorios y tenemos a la Gomisina H, Angeloilgomisina, Rubschisandrina. También se conocen compuestos fenólicos como el ácido 4-hidroxibenzoico, ferúlico, salicina, cis y trans mellitosido, mientras que de origen alcaloideo los más representativos son la colchicina y la capsaicina. De naturaleza terpénica pero aislado de aceites esenciales, se han reportado como bioactivos al eugenol, β -pinene, α -pinene, camphor, linalool, etc (Gonfa et al, 2023).

A pesar de los extensos estudios *in vitro*, existen pocos estudios *in vivo*, y a pesar de ello, aún permanece esquivo el uso de agentes derivados de especies medicinales por la falta de información a nivel clínico. En la actualidad, 6 compuestos antiinflamatorios se han

probado en humanos recientemente, entre ellos: curcumina, colchicina, resveratrol, capsaicina, epigallocatequina-3-galato (EGCG) y quercetina. De la curcumina, se han realizado 77 estudios clínicos, de los cuales, 50 han finalizado; en el caso de la colchicina, a pesar de ser un producto aprobado, recientemente se están efectuando estudios clínicos como agente antiinflamatorio, con 14 estudios en fase de reclutamiento. Resveratrol ha demostrado una plétora de efectos, sin embargo, aún no se ha demostrado su eficacia como droga en el campo de los antiinflamatorios, no habiendo un medicamento aprobado. Para la Capsaicina se enlistan 14 estudios clínicos en diferentes fases sobre todo como adyuvante para el dolor. Los estudios sobre EGCG en cambio son bastante escasos, y se han enfocado indirectamente en enfermedades relacionadas con 17 estudios clínicos abiertos. Por otro lado, la quercetina, ha demostrado una variedad de efectos antiinflamatorios *in vitro*, sin embargo, quercetina solo se analizará en dos estudios de fase 1 y 2, evaluando sobre todo su seguridad (Fürst y Zündorf, 2014).

Curcumina (Hydrocurc®), administrado a una dosis de 500 mg, dos veces al día por 4 semanas, a 32 pacientes previamente diagnosticados con COVID 19, demostró una disminución significativa de niveles de interleucina 6 (IL-6) y proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1), comparado al placebo, demostrando un prometedor efecto antiinflamatorio, como suplemento profiláctico (Fessler, 2023).

Mucha de la investigación realizada sobre el resveratrol (RV), figura 1, se ha enfocado en sus efectos sobre patologías relacionadas a estrés oxidativo, biomarcadores inflamatorios, diabetes tipo 2 (DT2), enfermedades cardiovasculares y neurológicas. La investigación más reciente revela una clara tendencia a identificar RV en plasma, demostrando su seguridad como suplemento y que su biodisponibilidad dependerá de muchos factores como la matriz asociada, dosis, tiempo de consumo, etc., aunque, a pesar de la clara evidencia, no existe aún consenso para una dosificación adecuada para alguna patología en particular (Ramírez et al, 2018).

La capsaicina (figura 1C) por otro lado ha demostrado actividad antiinflamatoria en macrófagos extraídos de ratones, vía MAPK y NF-κB. De manera general la capsaicina redujo

la secreción de citoquinas inflamatorias, interleucinas, factor de necrosis tumoral TNF- α y NO, inhibiendo la ruta del factor NF- κ B (Li et al. 2021). En un estudio reciente conducido por Mózsik Gyula (2014) se llegó a la conclusión de la aplicabilidad de la capsaicina de manera oral, como un agente gastroprotector a sujetos sanos y en sujetos con daños de mucosa inducido por químicos o bacterias como *Helicobacter pylori*, y en otras enfermedades relacionadas que requieran el uso de AINEs.

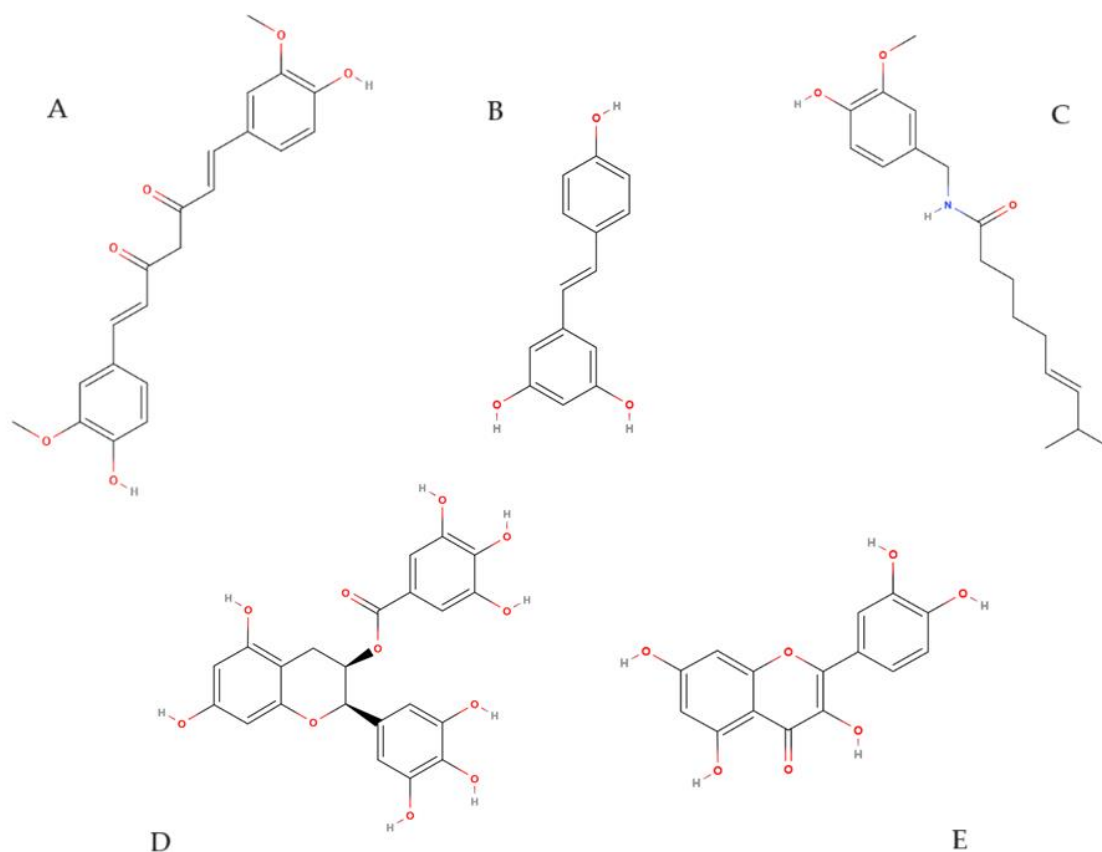
Epigallocatequin-3-galato (figura 1D) encontró aplicación según Schnur et al (2023) como medicina complementaria para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal, en un modelo *in vitro* que emula esta condición y comparó su eficacia contra cuatro ingredientes farmacéuticos activos comúnmente aplicados. EGCG disminuyó significativamente la liberación de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8.

La Quercetina (figura 1E) un flavonol encontrado ampliamente en muchos alimentos como el té verde, manzanas, cebollas, espárragos, etc., presenta propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, cardioprotectoras, antivirales y antibacterianas. Algunos ensayos clínicos buscan validar su potencial terapéutico y a pesar de que es utilizado como un nutraceutico, su uso clínico se ha restringido debido a su pobre solubilidad en agua y baja biodisponibilidad. En un ensayo clínico de 10 semanas sobre 72 mujeres a una dosis de 500 mg diarios, la quercetina disminuyó significativamente la expresión de factores proinflamatorios como TNF- α , IL-6 y HDL-C y disminuyó la presión sistólica (Mirza et al, 2023).

En la figura 1 se puede observar la estructura química de los principales metabolitos secundarios actualmente siendo sujetos de estudios clínicos para su aplicación como agentes antiinflamatorios.

Figura 1

Agentes antiinflamatorios en estudios clínicos derivados de especies vegetales



1.6 Modelos de evaluación de actividad antiinflamatoria

Los modelos *in vitro* de la capacidad antiinflamatoria han ayudado en la investigación de los compuestos antiinflamatorios en donde actúan como estabilizadores de la membrana del eritrocito el cual va a inducir la hemólisis con una solución salina hipotónica o calor y así evaluar si los extractos de plantas, líquenes u hongos tienen capacidad para evitar la hemólisis causada y simular el efecto de esta actividad que se da a nivel de la membrana lisosomal (Salazar-López, Villanueva-Lendecky, García-Hernández y Soto-Ojeda, 2018).

Los modelos *in vivo* e *in vitro* han sido ensayos ampliamente utilizados ya que son esenciales en la investigación tanto en los campos farmacológicos como biomédicos para evaluar la actividad deseada en animales, líneas celulares, tejidos, organismos vivos, órganos, células o enzimas. Estos ensayos van a predecir cuantitativa y cualitativamente propiedades farmacológicas, efectividad de terapias, toxicología, daño hepático entre otros efectos (Galeano, Campuzano-Bublitz y Kennedy, 2021).

Diferentes biomoléculas como enzimas degradadoras de la matriz, citoquinas proinflamatorias y los componentes de cascadas de señalización son los blancos terapéuticos más prometedores en enfermedades de inflamación crónica. La regulación de la expresión genética para la producción de sustancias pro-inflamatorias es la clave de los fitoconstituyentes durante un proceso inflamatorio. Algunos de los principales blancos que podrían afectar los fitoconstituyentes son la fosfolipasa C, fosfolipasa A2, ciclooxigenasas, radicales libres, inhibidores de la proteincinasa C (PKC), inhibidores de: citoquinas, factores de transcripción o de proteín cinasas (Patil et al, 2019).

1.6.1. Modelos *in vivo* de actividad antiinflamatoria

Los modelos *in vivo* para la determinación de actividad antiinflamatoria son muy específicos para determinar si el extracto o muestra de materia vegetal tiene compuestos químicos que permitan observar los mecanismos de la inflamación en modelos animales como ratones, ratas, conejos o peces ya que por ser organismos completos comparten una fisiología muy parecida a la del ser humano (Bonilla, 2021).

Estos modelos *in vivo* son de vital importancia para la identificación de efectos secundarios que tiene un fármaco o una terapia sobre el organismo y determinar los posibles efectos adversos. Uno de los modelos más empleado es la inducción de inflamación aguda en la pata de ratas al inyectar carragenina y a la vez, donde se puede medir la capacidad de un compuesto para disminuir el edema causado mediante la migración de células y mediadores inflamatorios como la histamina, citocinas, prostaglandinas, óxido nítrico y cininas (Torres et al. 2016).

Estos modelos han sido empleados específicamente para encontrar compuestos químicos en la naturaleza y posterior a esta experimentación estudiar su mecanismo de acción y, dependiendo de las condiciones con las que se va a realizar el estudio. Así también, nos permiten evaluar la actividad y mecanismos de inflamación mediante la práctica con animales y modelos bioquímicos de inflamación (Gómez et al, 2011).

Sin embargo, de acuerdo con Patil et al (2019), se han descrito otros modelos *in vivo* para la determinación de actividad antiinflamatoria los cuales se describen a continuación en la tabla 3.

Tabla 3

Modelos *in vivo* de actividad antiinflamatoria

Modelos <i>in vivo</i> para determinación de actividad antiinflamatoria	Principal aplicación
Edema de pata inducido por carragenina	La inflamación inducida por carragenina es aguda, no inmunológica y reproducible.
Edema de pata inducido por 5-HT/Histamina	Como modelo secundario para autorizar los resultados del modelo de carragenina
Edema de pata inducido por bradicinina	Modelo de inflamación aguda
Edema inducido por dextrano	Adecuado para valorar el efecto antiinflamatorio de antihistamínicos o drogas anti-serotonina
Edema de pata inducido por lipopolisacáridos	Adecuado para el reconocimiento de agentes antiinflamatorios que actúan a través de modulación de citoquinas
Edema de pata inducido por ácido araquidónico	Modelo válido de inflamación aguda tópica
Edema de oreja inducido por TPA/aceite de <i>Croton</i>	Adecuado para la valoración de drogas esteroideas y no esteroideas
Edema de oreja inducido por Oxazolona	Inflamación inmunitaria (reacción de hipersensibilidad retardada)
Permeabilidad vascular inducida por ácido acético	Modelo apropiado para valorar el efecto antiinflamatorio agudo
Test de pleuresía/pleuritis	Para medir actividad antiinflamatoria aguda
Modelo de bolsa de granuloma	Inflamación subaguda
Granuloma inducido por pellet de algodón	Irritación crónica e inflamación
Edema de pata inducido por formalina	Inflamación crónica que emula artritis humana
Artritis inducida por adjuvante de Freund	Inflamación crónica y alteraciones de artritis

Nota. Adaptado de Patil et al (2019). Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs.

1.6.2. Modelos *in vitro* de actividad antiinflamatoria

Para la evaluación de capacidad antiinflamatoria existen diferentes métodos *in vitro* para muestras naturales, en donde la utilización de enzimas sirve como marcadores del

contenido de neutrófilos para así obtener una respuesta semicuantitativa con respecto a si existe o no una migración celular como una respuesta inflamatoria (Carbajal et al., 2013).

Dentro de los métodos o modelos *in vitro* para la determinación de la actividad o potencial antiinflamatorio según Eze et al (2019), encontramos:

- Ensayo de inhibición de fosfolipasa A2, enzima involucrada en la liberación de ácido araquidónico (AA) y producción de prostaglandinas proinflamatorias.
- Ensayo de la actividad de la enzima prostaglandina sintasa, involucrada en la conversión de AA a prostaglandina H2, un intermediario en la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos.
- Electroforesis por desplazamiento de movilidad, es uno de los métodos más caros que evalúa la habilidad de sustancias de prueba, de inhibir al factor NF- κ B y está basado en una separación electroforética de una mezcla de ADN-proteína o ARN-proteína.
- Inhibición de la hialuronidasa, la enzima responsable de la degradación de ácido hialurónico e involucrada en la respuesta inflamatoria.
- Células RAW 264.7 estimuladas con Lipopolisacárido (LPS), es un ensayo de citotoxicidad empleado para medir la producción de NO como respuesta a un proceso inflamatorio.
- Estabilización de la membrana de glóbulos rojos humanos (HRBC), un ensayo basado en la inhibición de la hemólisis de glóbulos rojos inducida por calor o hipotonicidad, como indicador de propiedades antiinflamatorias.

Capítulo dos

Materiales y métodos

La actividad antiinflamatoria *in vitro* se midió de acuerdo a la metodología de Shinde et al, 1999, con algunas modificaciones para el laboratorio de Bioensayos de la Universidad Técnica Particular de Loja. Se siguió el método de estabilización de la membrana del eritrocito (HRBC por sus siglas en inglés) en una solución hipotónica, el cual actuó como agente hemolítico y si, en presencia de sustancias existentes en matrices naturales como extractos o aceites esenciales, esta hemólisis se ve reducida (sin afectar la naturaleza de los hematíes), se presume de actividad estabilizadora de membrana (efecto antiinflamatorio).

2.1 Preparación de reactivos

La preparación de reactivos para el ensayo se realizó de acuerdo con la metodología de Burboa et al 2014 en donde se preparó en un balón de aforo de una solución Alsever estéril que contuvo glucosa al 2%, citrato de sodio al 0,8%, ácido cítrico 0,05% y cloruro de sodio 0,42%.

Así mismo se preparó una solución hiposalina 0,36% de cloruro de sodio (HPS) y una solución isosalina al 0,85% (ISO).

Finalmente se preparó un buffer de tapón fosfato PBS de pH 7,4 en donde se diluyó una tableta SIGMA P4417 en 200 mL de agua ultrapura (H₂O_{dd}).

2.2 Extracción de muestra sanguínea

Para una correcta toma de muestra se siguió el protocolo descrito por Kneip Fleury 2019, en donde muy meticulosamente se aplicó el torniquete sin exceder del minuto, se le examinó la fosa ante cubital y se observó las venas cefálica, cubita y media y se procedió hacer la punción en la vena más prominente. Como se empleó tubo con aditivo se homogenizó de inmediato la muestra y se la almacenó adecuadamente para su posterior uso.

Se extrajeron 5 mL de sangre mediante punción venosa y se recolectó en tubo de tapa verde que contuvo aditivo de heparina. Estas muestras se tomaron de pacientes sanos que no hayan tomado AINEs o cualquier tipo de medicamentos con propiedad antiinflamatoria 15

días previos o que a su vez no tengan alteraciones hormonales, ni mujeres que estén tomando anticonceptivos (García, Pariona y Londoño, 2017).

2.3 Preparación de la muestra sanguínea

Una vez que la muestra sanguínea fue recolectada se procedió a pasar a otro tubo y se le añadió el mismo volumen de solución Alsever y se la centrifugó a 3000 rpm por un tiempo de 10 minutos. Pasado esto, se descartó el sobrenadante, se tomó 1 mL del pellet eritrocitario y se suspendió con 9 mL de solución isosalina (ISOB). Se homogeneizó la muestra sanguínea y se la dejó reposar hasta su utilización.

2.4 Preparación de matrices naturales a ensayar

Para extractos crudos se pesaron un total de 380 mg y se disolvieron en un volumen de 2 mL de metanol grado HPLC, mientras que para aceites esenciales se utilizó un volumen máximo de 80 μ L en 920 μ L de MeOH.

A partir de estas soluciones se prepararon de 6 a 8 diluciones, a través del proceso de dilución doble seriada con un volumen mínimo de 1200 μ L de disolución final.

Para extractos se alcanzaron dosis finales en el ensayo desde 40 hasta 0.3125 mg/mL. Por otro lado, para aceites esenciales, el rango de dosis alcanzado fue desde 10 hasta 0.078 mg/mL. No se emplearon concentraciones más altas de los aceites esenciales ya que en las pruebas preliminares se observó toxicidad celular.

2.5 Matrices naturales a evaluar para valorar el potencial antiinflamatorio mediante el ensayo de hemólisis de glóbulos rojos (HRBC)

Se emplearon dos tipos de matrices naturales para la evaluación de la actividad antiinflamatoria, como son: aceites esenciales y extractos crudos de especies vegetales y frutos, que se encontraban almacenados o fueron ensayados previamente en el laboratorio de bioensayos por cualquier ensayo de rutina.

En la tabla 4 se describen los tipos de extractos, aceites y especies empleadas en el presente estudio.

Tabla 4

Tipo de matrices empleados en el ensayo HRBC

Nombre especie	Tipo de extracto	Método extracción	Parte empleada	Código
<i>Piper ecuadorensis</i>	Metanólico	Maceración dinámica	Hojas	PEM
<i>Mansoa alliacea</i>	Metanólico	Maceración dinámica	Hojas	MAM
<i>Pernettya prostrata</i>	Etanólico	Maceración dinámica	Hojas	PPE
<i>Pernettya prostrata</i>	Etanol: agua 1:1 Liofilizado	Maceración dinámica	Fruto (Pulpa)	PPF
<i>Lepechinia betonicifolia</i>	Aceite esencial	Arrastre de vapor	Hojas	LBA
<i>Eugenia valvata</i>	Aceite esencial	Arrastre de vapor	Hojas	EVA
<i>Melaleuca viridiflora</i>	Aceite esencial	Arrastre de vapor	Hojas	MVA
<i>Citrus aurantifolia</i>	Aceite esencial	Arrastre de vapor	Frutos	CAA
<i>Punica granatum</i>	Etanol: agua 1:1 Liofilizado	Maceración dinámica	Fruto (Pulpa)	PGF

2.6 Preparación de controles y ensayo

Para la realización de los controles, blancos y muestras se siguió el protocolo de Sikder et al 2011 pero adaptado a los recursos y características del laboratorio, en donde se agregaron los reactivos de acuerdo con la tabla 5 descrita a continuación, para un volumen final de 2 mL.

Tabla 5

Matriz de distribución de soluciones para el ensayo HRBC con sus respectivos controles y prueba de agentes estabilizadores (matriz natural/ agente antiinflamatorio)

Control/Ensayo	Matriz natural/Agente antiinflamatorio	H ₂ O _{dd}	H ₂ O _d	Sol. Isosalina	Sol. Hiposalina	Sol. PBS	Sol. ISOB
	Volumen en µL						
Hb	-	1500	-	-	-	250	250
HPS	-	-	-	250	1250	250	250

GR	-		250	1500	-	-	250
CPOS	250	-	-	-	1250	250	250
ENS	250	-	-	-	1250	250	250

Hb: Control de hemólisis al 100%. Liberación instantánea de hemoglobina (Hb)

HPS: Control de hemólisis ~ 100%. Liberación de hemoglobina controlada

GR: Control de no hemólisis ~ 0%. No Liberación de hemoglobina por estabilización de glóbulos rojos (GR) en solución isotónica.

CPOS: Control de no hemólisis en presencia de un agente comercial antiinflamatorio como Diclofenaco

ENS: Prueba para medir estabilización de membrana de glóbulos rojos en presencia de distintas soluciones de extractos o aceites esenciales.

2.7 Condiciones del ensayo y medición espectrofotométrica

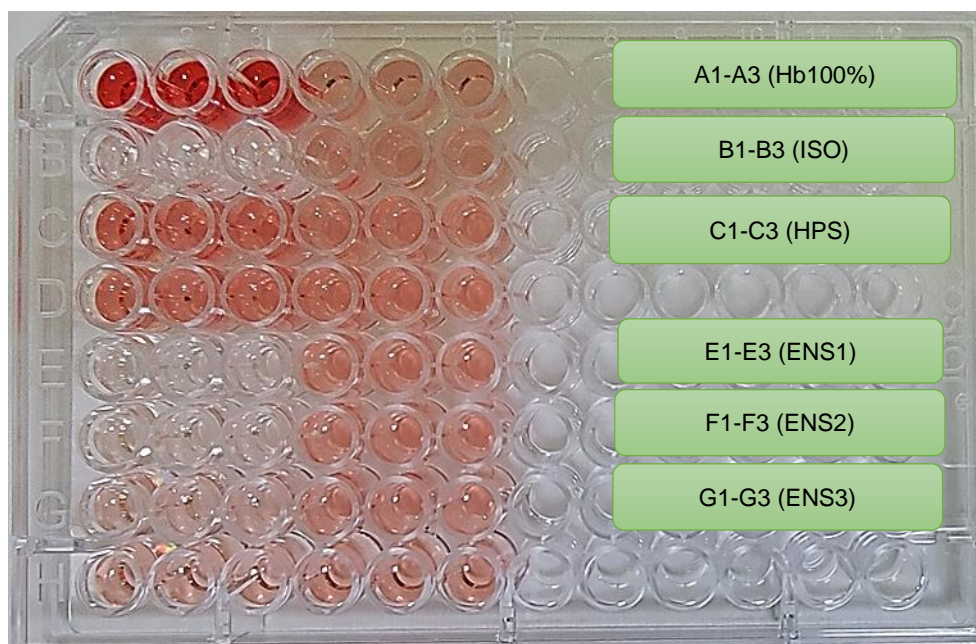
Una vez generados cada uno de los tubos de reacción para medir la actividad estabilizadora de membrana (tabla 6), se procedió a homogenizarlos mediante vórtex e incubarlos durante un período mínimo de 30 a 45 minutos a una temperatura de 37°C. Pasado el tiempo de incubación, los tubos se sometieron a centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm, para separar el sobrenadante de los glóbulos rojos (pellet).

Una vez realizada la centrifugación, se verificó que los controles de hemólisis (Hb y HPS) y no hemólisis (GR) tengan las características adecuadas como son: en los controles de hemólisis se evidenció la liberación de hemoglobina como una coloración rojo carmín en el sobrenadante y ausencia de pellet; mientras que en el control de no hemólisis se evidenció la ausencia de coloración en el sobrenadante y presencia del pellet eritrocitario (ver figura 2, sección 3.1).

Se procedió al llenado de la microplaca de 96 pocillos con las soluciones control y ensayo con un volumen de 300 µL y se distribuyó como se muestra en la figura 2.

Figura 2

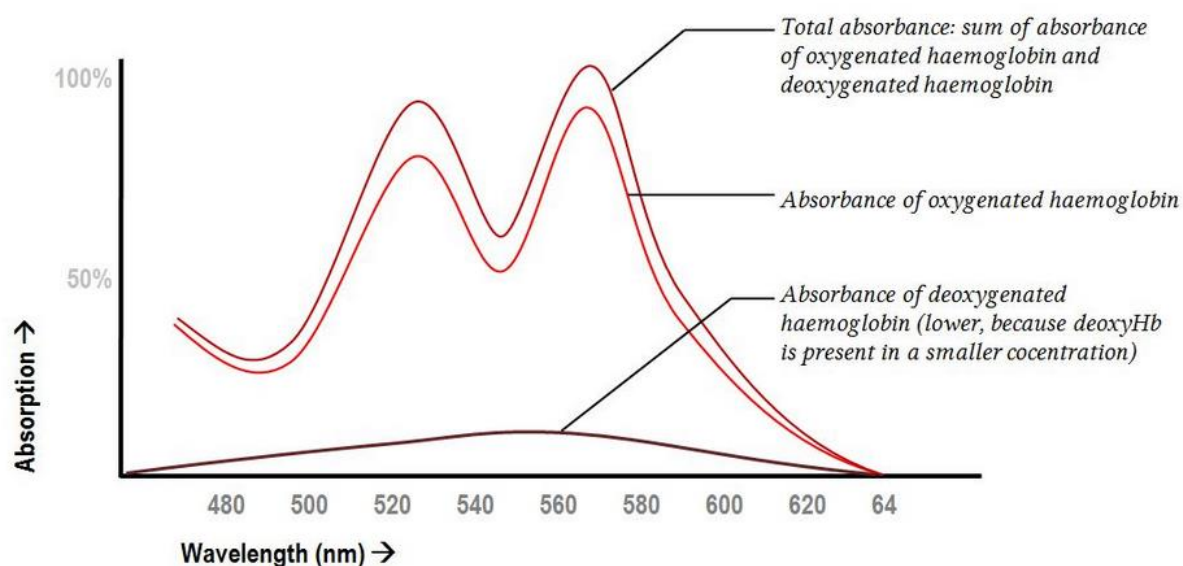
Microplaca de 96 pocillos con soluciones control



La placa se leyó a una longitud de onda de 420 y 560 nm y, adicionalmente, se realizó un barrido espectral en el rango de 500 a 650 nm para identificar las bandas típicas de absorción de la oxyhemoglobina en el espectro visible tal y como lo evidencia Yartsev 2015.

Figura 3

Espectro de absorción de la hemoglobina oxigenada



Nota. Tomado de Yartsey (2015). Absorption spectroscopy of haemoglobin species.

2.8 Análisis de resultados

Se calcularon los porcentajes de hemólisis y protección o estabilización de membrana, de acuerdo con las fórmulas propuestas por Salazar-López, et al. (2018):

$$\% Hem = \left(\frac{Abs Muestra}{Abs Control} \right) \times 100$$

$$\% Est = 100 - \% hem$$

Donde:

- **%Hem** = porcentaje de hemólisis
- **Abs** = absorbancia a 560 nm de la muestra ensayada (CPOS o ENS)
- **Control** = absorbancia a 560 nm del control de hemoglobina (Hb) al 100%
- **% Est**= porcentaje de estabilización de membrana o protección de hemólisis

Para el cálculo de la CI_{50} se realizó mediante un modelo de ajuste de la curva, a partir de los datos de % de estabilidad y las dosis de cada agente ensayado.

Luego se realizó la validación de la presencia de las dos bandas de absorción de la oxihemoglobina en el rango de 500 a 650 nm y se construyen gráficas comparativas entre las distintas dosis de los agentes antiinflamatorios de prueba.

Capítulo tres

Resultados

3.1 Controles de validación del ensayo

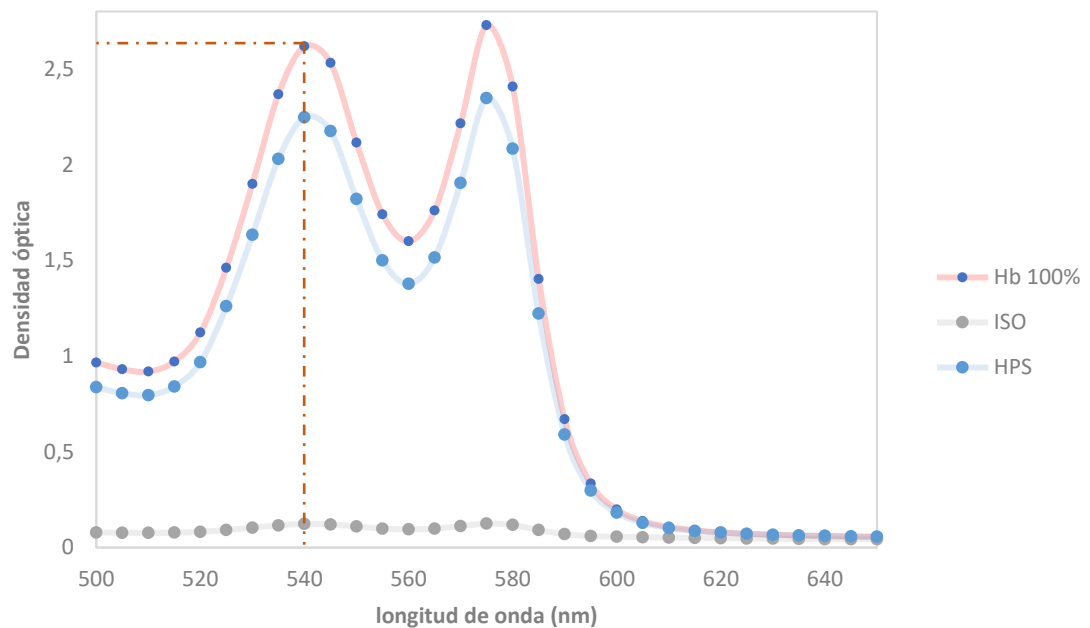
Luego de la interacción de los glóbulos rojos con un elevado volumen de una solución hipotónica (agua ultrapura), por ósmosis, libera el contenido de hemoglobina de manera inmediata, y su presencia en el espectro visible se mide mediante un barrido espectral en el rango de 500 a 650 nm, tal y como se ilustra en la figura 4 representado como Hb 100% (Hemoglobina al 100%).

De la misma manera, podemos observar en la figura 4, dos controles adicionales que se incluyeron para evitar la presencia de falsos negativos y falsos positivos. Un control de glóbulos rojos en solución isotónica, denominado "ISO" en la gráfica y un control de glóbulos rojos, en solución hipotónica, denominado "HPS" en la gráfica. Los volúmenes y soluciones empleadas en la solución HPS, son los mismos que los empleados en la prueba de antiinflamatorios, para poder contrastar los resultados.

Figura 4

Validación de la prueba mediante controles negativos y positivos para la liberación de hemoglobina

Controles ensayo



En la figura 5 se puede observar los controles de glóbulos rojos en solución hipotónica (Hb100% y HPS) y en solución isotónica (ISO) empleados en la prueba, donde se puede apreciar la elevada coloración rojiza en el control HB y HPS, debido a la liberación de hemoglobina al entorno acuoso, mientras que en el control de eritrocitos con solución isosalina, la hemólisis es mínima o puede considerarse nula y su valoración se hace espectrofotométricamente como se aprecia en la figura 5 (Controles ensayo). Es también apreciable en los controles HPS e ISO, la presencia de un pellet de glóbulos rojos, sobre todo en el control ISO.

Figura 5

Controles de liberación de hemoglobina para la prueba. Izq. Hb100%, centro. control hiposalina y Der. control isosalina



3.2 Actividad estabilizadora con el control positivo Diclofenaco

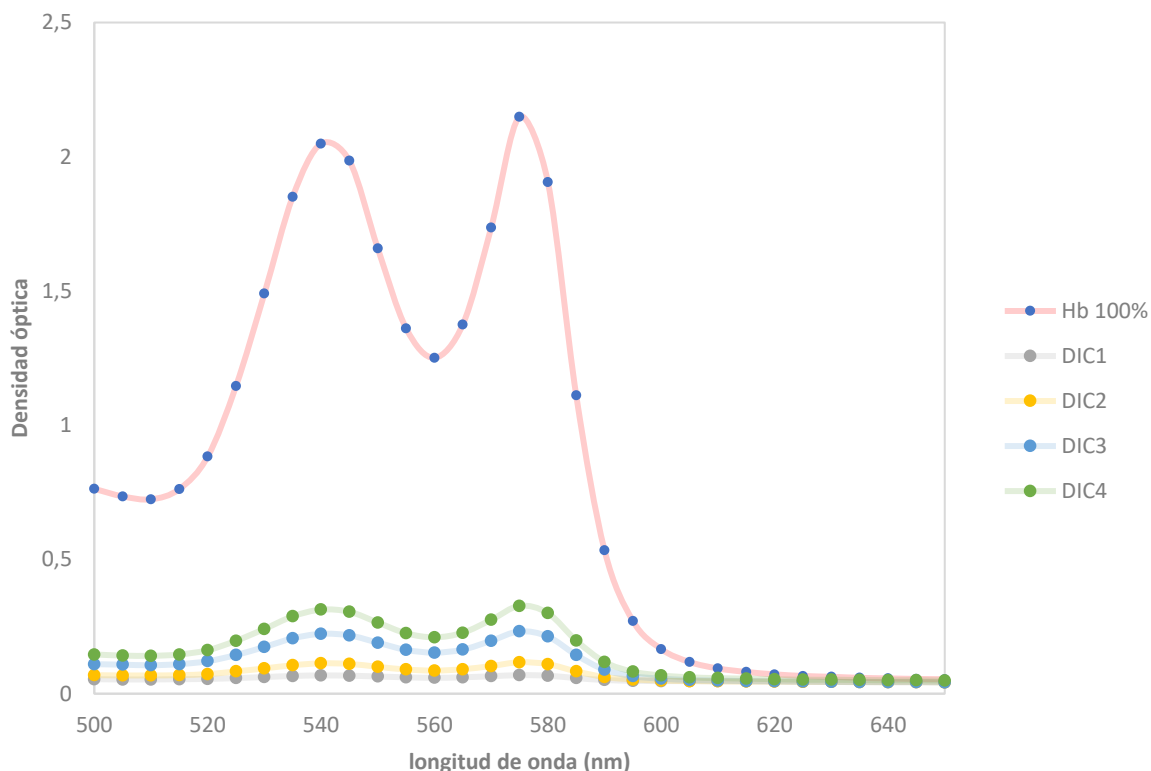
Se empleó una solución comercial de Diclofenaco inyectable de 75mg/3mL de la marca Genfar. A partir de esta solución se emplearon diluciones dobles seriadas en agua destilada hasta obtener concentraciones finales en el ensayo desde 3125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 48,83 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

En la figura 6 se puede observar el efecto de la reducción en la hemólisis bajo las 4 primeras dosis empleadas del agente antiinflamatorio, demostrándose un efecto estabilizador de la membrana al no haber una pronunciada hemólisis.

Figura 6

Valoración espectrofotométrica de la liberación de la hemoglobina frente a cuatro dosis de Diclofenaco

DICLOFENACO



Nota. DIC1, ..2, ...3, ...4 indican el rango de dosis empleado siendo 1, la dosis más alta probada

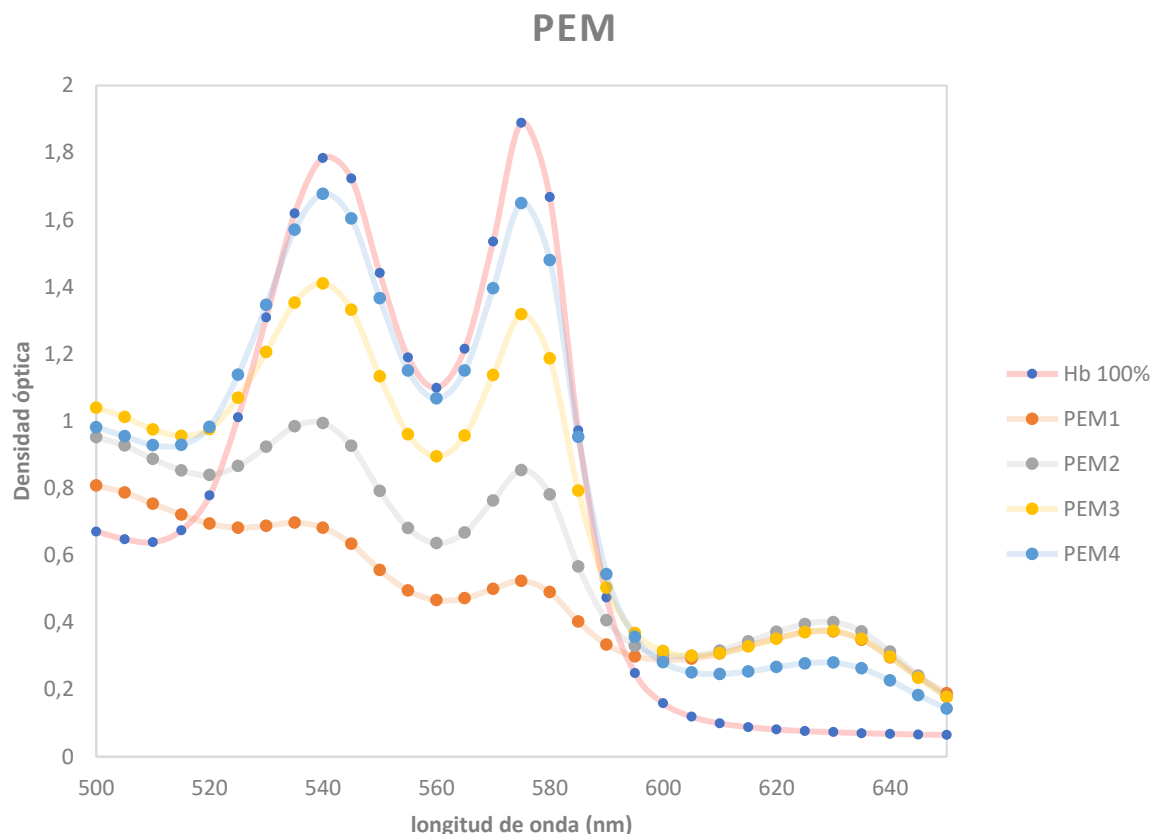
3.3 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de *Piper ecuadorensis*

Se pesaron 380 mg del extracto crudo y disolvieron en 2 mL de metanol grado HPLC. De esta solución se realizaron diluciones dobles seriadas en un volumen final de 1000 μ L de agua, para obtener concentraciones finales en el ensayo desde 40.00 mg/mL hasta 2.50 mg/mL

En la figura 7 se puede observar el efecto de la reducción en la hemólisis bajo las 4 primeras dosis empleadas del extracto, demostrándose inicialmente un efecto protector de las sustancias presentes en el extracto. La figura está elaborada sin corrección de línea base.

Figura 7

Valoración espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina frente a cuatro dosis de Piper ecuadorensis



Nota. PEM1, ...2, ...3, ...4 indican el rango de dosis empleado siendo 1, la dosis más alta probada

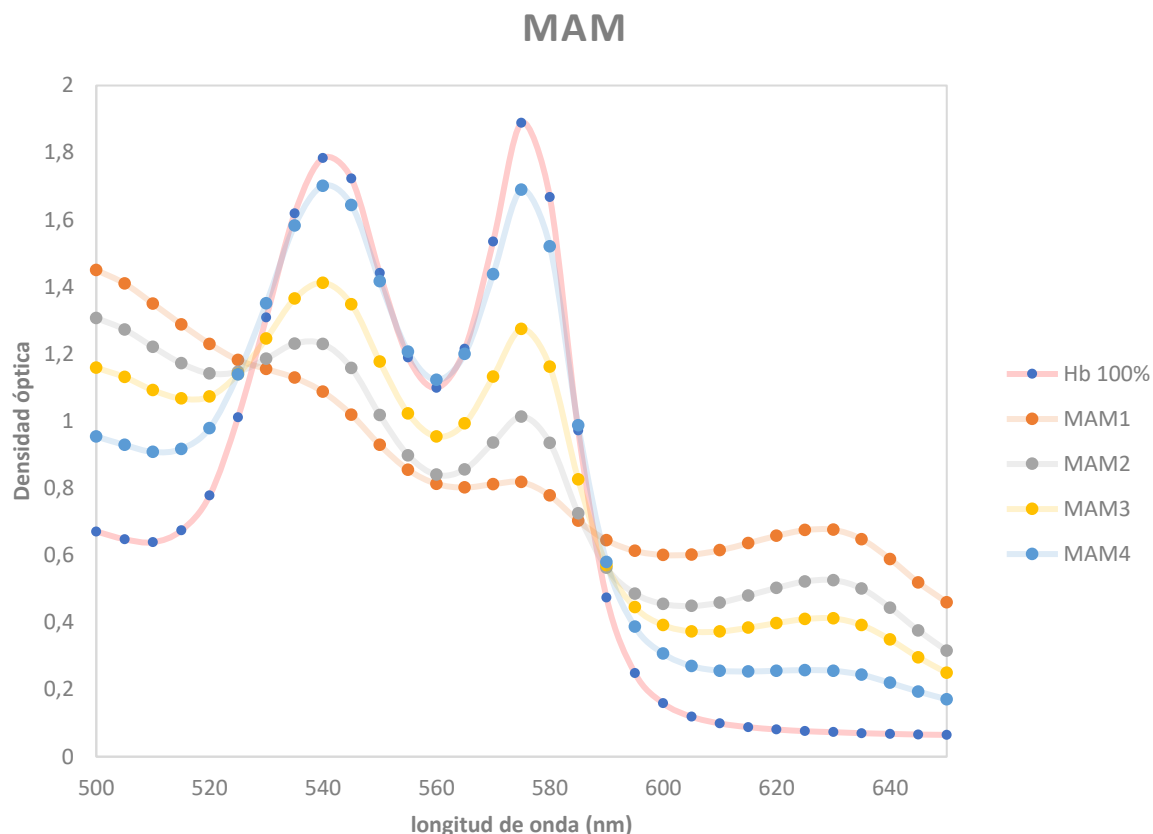
3.4 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de *Mansoa alliacea*

Se pesaron 380 mg del extracto crudo y disolvieron en 2 mL de metanol grado HPLC. De esta solución se realizaron diluciones dobles seriadas en un volumen final de 1000 μ L de agua, para obtener concentraciones finales en el ensayo desde 40.00 mg/mL hasta 2.50 mg/mL

En la figura 8 se puede observar el efecto de la reducción en la hemólisis bajo las 4 primeras dosis empleadas del extracto, demostrándose inicialmente un efecto protector de las sustancias presentes en el extracto a las dosis más altas probadas. La figura está elaborada sin corrección de línea base.

Figura 8

Valoración espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina frente a cuatro dosis de *Mansoa alliacea*



Nota. MAM1, ..2, ...3, ...4 indican el rango de dosis empleado siendo 1, la dosis más alta probada

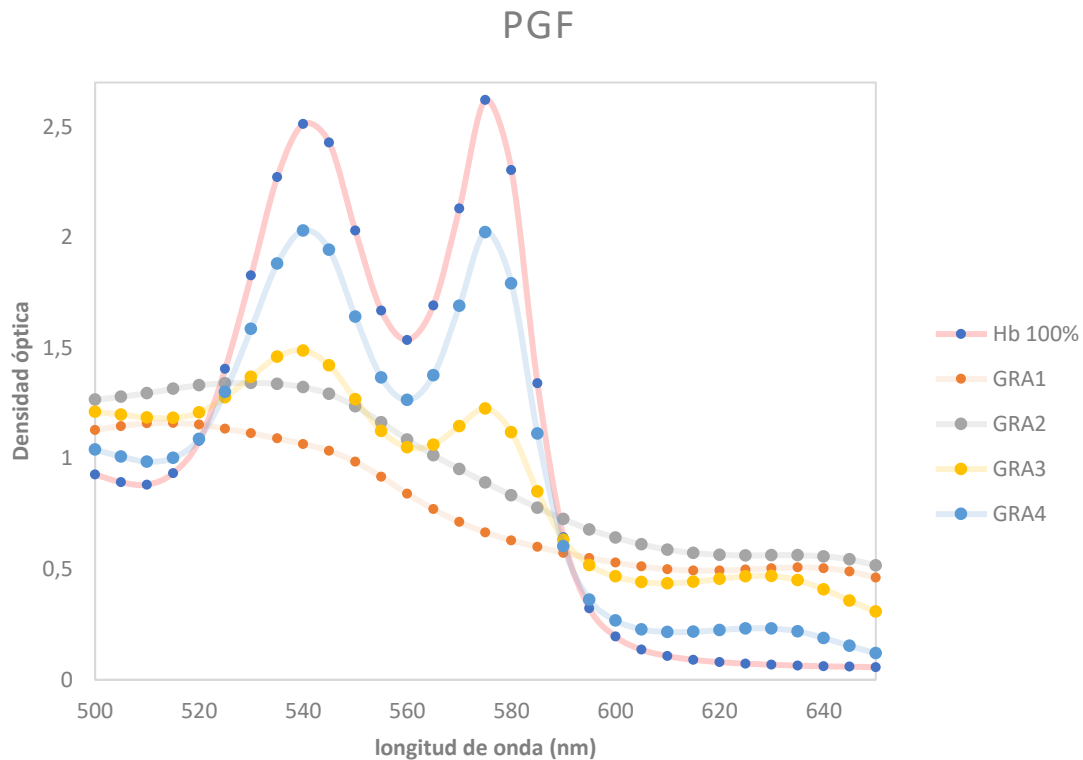
3.5 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de *Punica granatum*

Se pesaron 380 mg del extracto crudo y disolvieron en 2 mL de agua destilada ultrapura. De esta solución se realizaron diluciones dobles seriadas en un volumen final de 1000 μ L de agua, para obtener concentraciones finales desde 40.00 mg/mL hasta 2.50 mg/mL

En la figura 9 se puede observar el efecto de reducción en la hemólisis bajo las 4 primeras dosis empleadas del extracto de granada, demostrándose inicialmente un efecto protector de las sustancias presentes en el extracto.

Figura 9

Valoración espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina frente a cuatro dosis de Punica granatum



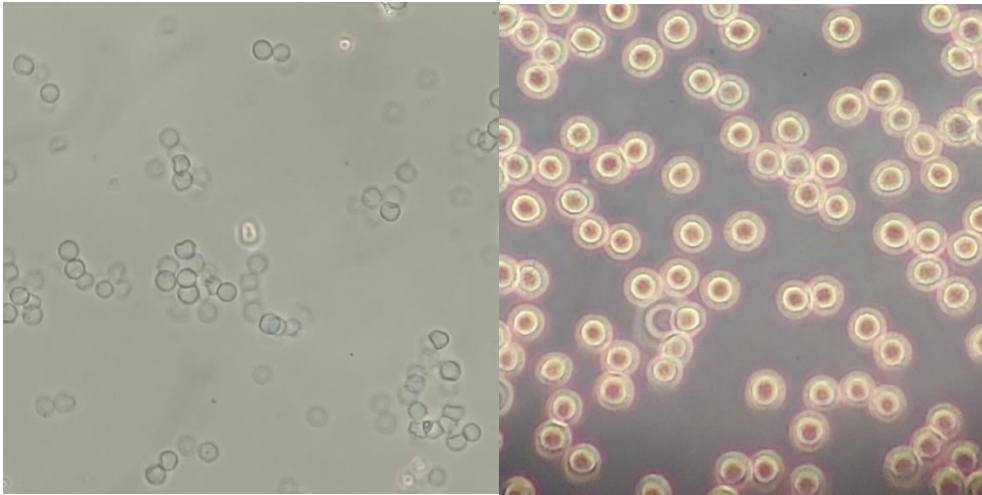
Nota. GRA1, ..2, ...3, ...4 indican el rango de dosis empleado siendo 1, la dosis más alta probada

3.6 Validación del poder protector de *Punica granatum* sobre eritrocitos bajo el microscopio

A pesar de que en el análisis espectral de las diferentes dosis de granada (figura 10) se mostró una reducción significativa de la liberación de hemoglobina en comparación al control Hb 100%, en las dosis más altas (PGF1y PGF2) se evidenció una curva sinusoidal no característica de la hemoglobina, sino probablemente debido a una degradación de la misma, por tal razón se procedió a revisar bajo el microscopio de contraste de fases, la morfología eritrocitaria y conteo por campo, observándose un descenso significativo en el recuento y cambios notables tanto en la morfología como en refringencia, para los tratamientos 1 y 2, en comparación al control "ISO" (Figura 10).

Figura 10

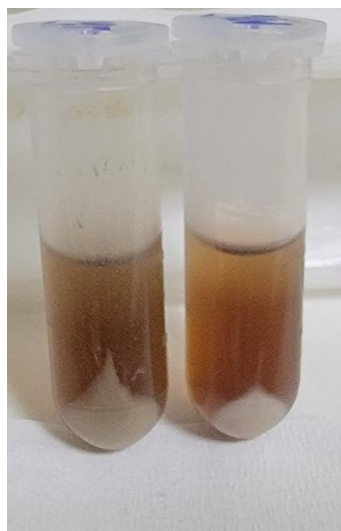
Morfología y recuento eritrocitario dosis GRA1 (izquierda versus control eritrocitos en solución isotónica (derecha)



En la figura 11 se puede observar el cambio de coloración tanto del sobrenadante como pérdida de morfología del pellet, producto de la degradación eritrocitaria y no del efecto protector del extracto, lo cual puede deberse al pH ácido del extracto de granada, como demostrado mediante su medición, dando un pH de 2.5.

Figura 11

Degradación eritrocitaria y de hemoglobina con el tratamiento GRA 1 y GRA2 producto de la acidez de la muestra



3.7 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de *Punica granatum* ajustada a pH

4.0

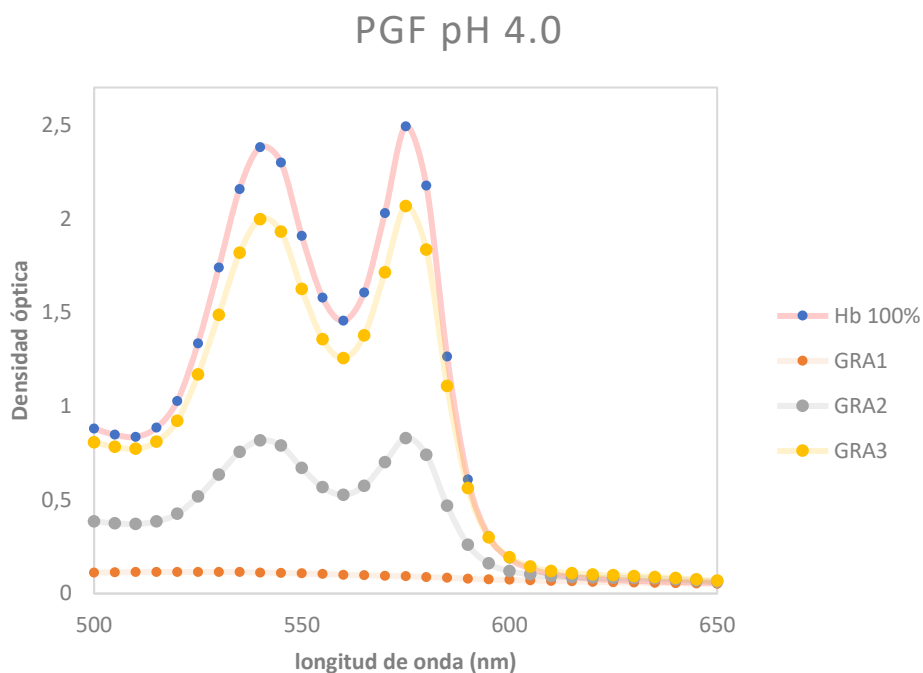
De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, y dada la elevada acidez de la muestra y falsos positivos evidenciados por microscopia, se decidió trabajar con soluciones de la muestra ajustando el pH. Se validó la presencia de eritrocitos y su integridad en todos los tratamientos efectuados, encontrándose que a pH desde 4 a 6.4, empleados en el presente trabajo, no hubo degradación celular y el efecto protector se evidenció adicionalmente en los análisis espectrales.

Se pesaron 380 mg del extracto crudo y disolvieron en 1800 μL de agua destilada ultrapura y se ajustó con una alícuota de 200 μL de NaOH 1N hasta obtener un pH de 4.0. De esta solución se realizaron diluciones dobles seriadas en un volumen final de 1000 μL , para obtener concentraciones desde 160 mg/mL hasta 2,5 mg/mL.

En la figura 12 se puede observar el efecto de las diluciones empleadas y la liberación reducida de hemoglobina, lo cual nos indicaría la capacidad protectora de esta solución.

Figura 12

Efecto estabilizador de diluciones decrecientes de Punica granatum ajustado a pH 4.0 sobre la membrana eritrocitaria



3.8 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de *Punica granatum* ajustada a pH

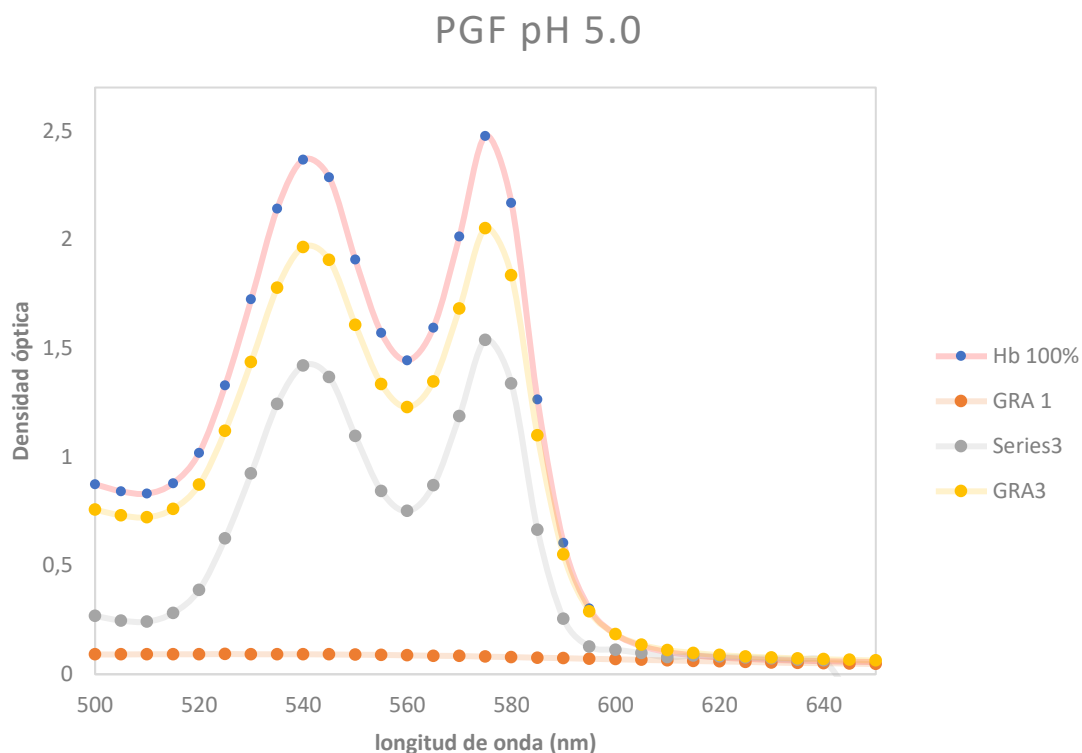
5.0

Se pesaron 380 mg del extracto crudo y disolvieron en 1700 μL de agua destilada ultrapura y se ajustó con una alícuota de 300 μL de NaOH 1N hasta obtener un pH de 5.0. De esta solución se realizaron diluciones dobles seriadas en un volumen final de 1000 μL , para obtener concentraciones desde 160 mg/mL hasta 2,5 mg/mL.

En la figura 13 se puede observar el efecto de las diluciones empleadas y la liberación reducida de hemoglobina, lo cual nos indicaría la capacidad protectora de esta solución.

Figura 13

Efecto estabilizador de diluciones de Punica granatum ajustado a pH 5.0 sobre la membrana eritrocitaria



3.9 Actividad estabilizadora con el extracto crudo de *Punica granatum* ajustada a pH

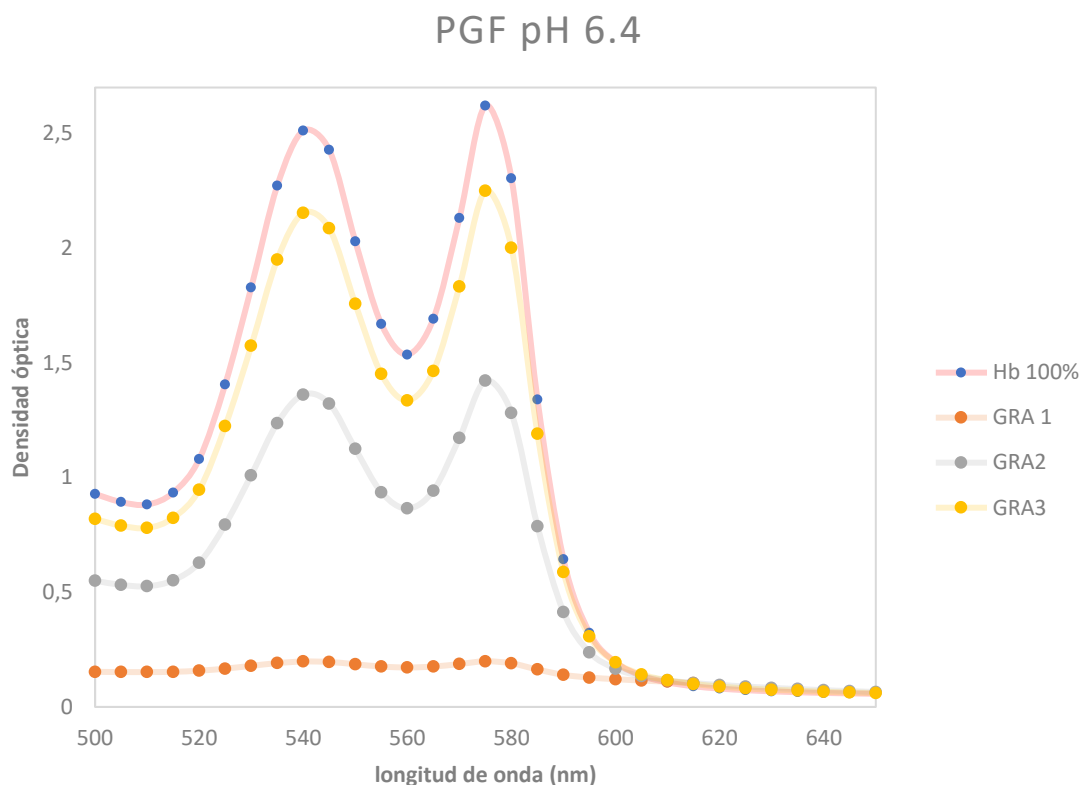
6.4

Se pesaron 380 mg del extracto crudo y disolvieron en 1600 μL de agua destilada ultrapura y se ajustó con una alícuota de 400 μL de NaOH 1N hasta obtener un pH de 6.4. De esta solución se realizaron diluciones dobles seriadas en un volumen final de 1000 μL , para obtener concentraciones desde 160 mg/mL hasta 2,5 mg/mL.

En la figura 14 se puede observar el efecto de las diluciones empleadas y la liberación reducida de hemoglobina, lo cual nos indicaría la capacidad protectora de esta solución.

Figura 14

Efecto estabilizador de diluciones decrecientes de Punica granatum ajustado a pH 6.4, sobre la membrana eritrocitaria



3.10 Análisis bromatológico de *Punica granatum*

Entre los parámetros fisicoquímicos medidos para la fruta desecada se realizaron contenido de humedad relativa, humedad residual, contenido de cenizas totales, proteínas totales y porcentaje de grasa, de acuerdo a la tabla descrita a continuación. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y una humedad relativa de 40%. Se realizaron tres experimentos por cada parámetro y los resultados están expresados como la media \pm 1 DS.

Tabla 6

Parámetros bromatológicos básicos de la pulpa y semilla de Punica granatum

Condiciones ambientales	Temperatura: 18 °C	Humedad: 40 %
Ítem de ensayo	Contenido (%)	Método de ensayo
Humedad relativa	78.22 \pm 0.16	Método gravimétrico
Humedad residual	2.30 \pm 0.05	AOAC 7003
Cenizas	2.90 \pm 0.07	AOAC 925.49
Proteína	2.02 \pm 0.04	AOAC 47.021
Grasa	3.94 \pm 0.02	AOAC 7.056
Carbohidratos totales	10.62 \pm 0.07	Nielsen S., 2017

El porcentaje de carbohidratos se calculó en base a la fórmula:

$$\%Carbohidratos = 100 - (\%Humedad + \% cenizas + \%proteínas + \% grasa)$$

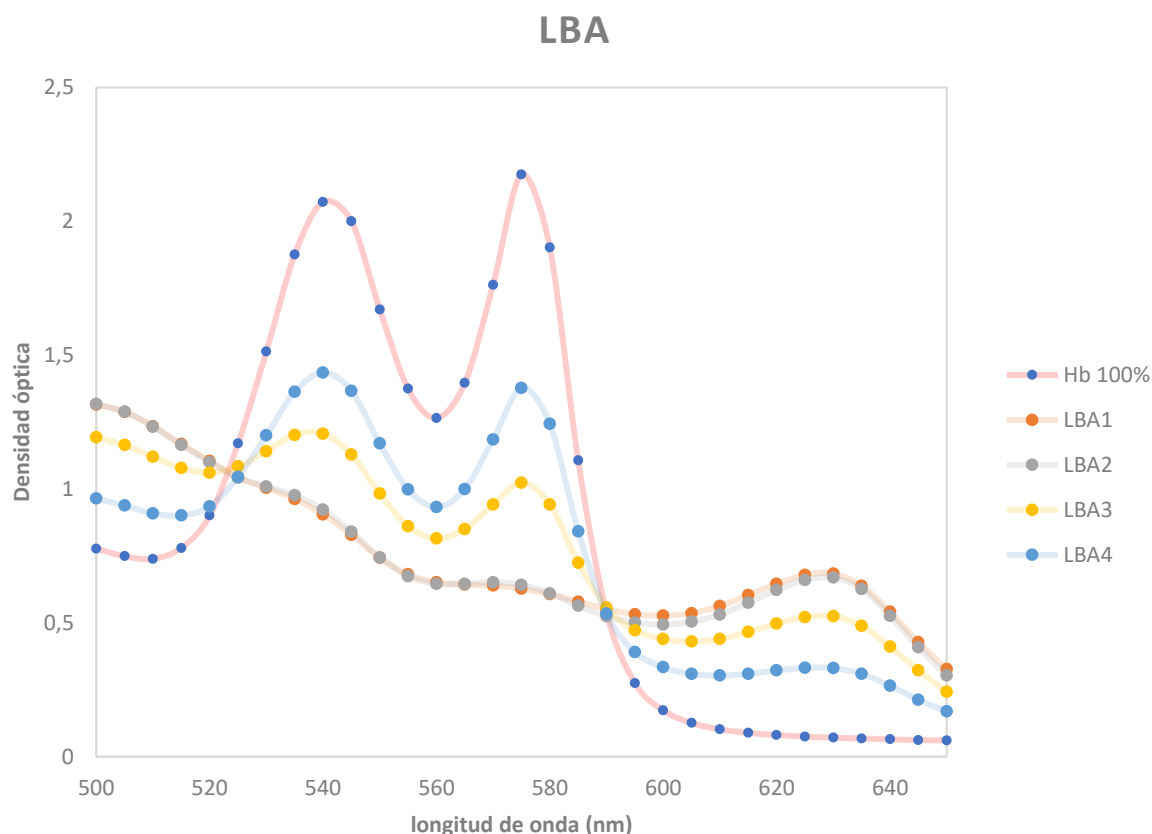
3.11 Actividad estabilizadora con el aceite esencial de *Lepechinia betonicifolia*

Se disolvieron 80 µL del aceite esencial de *L. betonicifolia* en 920 µL de metanol grado HPLC. De esta solución se realizaron diluciones dobles seriadas en un volumen final de 1200 µL de metanol, para obtener concentraciones finales en el ensayo desde 10.00 mg/mL hasta 0.078 mg/mL

En la figura 15 se puede observar el efecto de la reducción en la hemólisis bajo las 4 primeras dosis empleadas del aceite, demostrándose inicialmente un efecto protector de las sustancias presentes en el extracto a las dosis más altas probadas. La figura está elaborada sin corrección de línea base.

Figura 15

*Valoración espectrofotométrica de la liberación de hemoglobina frente a cuatro dosis de *Lepechinia betonicifolia**



Nota. LBA1, ...2, ...3, ...4 indican el rango de dosis empleado siendo 1, la dosis más alta probada

3.12 Actividad estabilizadora con los extractos y aceites esenciales remanentes

A pesar de usar concentraciones elevadas con los extractos de *Pernettya prostrata* (160 mg/mL) no se observó efecto estabilizador de la membrana eritrocitaria, ocurriendo hemólisis total. De igual manera con los aceites esenciales de CAA, EVA, MVA, se observó que a la dosis más alta probada de 10 mg/mL no hubo efecto estabilizador de membrana eritrocitaria, observándose hemólisis total o incluso destrucción de glóbulos rojos, similar a lo observado con el extracto de *P. granatum* a pH 2.5 (ver figura 10, sección 3.6).

3.13 Cálculo de los porcentajes de hemólisis y estabilización de membrana, del control positivo Diclofenaco y de las muestras de *Piper ecuadorensis*, *Mansoa Alliacea* y *Lepechinia betonicifolia*

Se calculan los porcentajes de hemólisis y protección o estabilización de membrana, de acuerdo con las fórmulas propuestas por Salazar-López, et al. (2018):

$$\% Hem = \left(\frac{Abs Muestra}{Abs Control} \right) \times 100$$

$$\%Est = 100 - \%hem$$

Donde:

%Hem = porcentaje de hemólisis

Abs = absorbancia a 560 nm

Control = absorbancia a 560 nm del control de hemoglobina al 100%

En la tabla 7 se describen los valores de % de hemólisis obtenidos para cada concentración de PEM y MAM. En función de estos datos y mediante ajuste de la curva, se realizaron los cálculos de concentración inhibitoria media (CI_{50}), que determina la concentración necesaria de extracto para reducir en un 50% la hemólisis.

Tabla 7

Valores de porcentajes de hemólisis obtenidos para cada concentración

Dosis mg/mL	Diclofenaco		
	% hemólisis	% Estabilización membrana	CI_{50} (mg/mL)
3.125	5.20 ± 0.05	94.80 ± 0.05	0.041 ± 0.01
1.562,5	7.51 ± 0.05	92.49 ± 0.05	
0.781	13.15 ± 0.23	86.85 ± 0.23	
0.390	18,38 ± 0.10	81.62 ± 0.10	
0.195	25,04 ± 0.39	74.96 ± 0.39	
<i>Piper ecuadorensis</i> metanólico			
40.00	41.23 ± 0.22	58.77 ± 0.22	28.42 ± 1.15
20.00	58.53 ± 1.59	41.47 ± 1.59	
10.00	78.81 ± 1.60	21.19 ± 1.60	
5.00	94.89 ± 2.29	5.11 ± 2.29	
<i>Mansoa alliacea</i> metanólico			
40.00	68.06 ± 2.47	31.94 ± 2.47	177.05 ± 2.10
20.00	75.39 ± 1.83	24.61 ± 1.83	
10.00	84.60 ± 1.31	15.40 ± 1.31	
5.00	99.85 ± 2.33	0.15 ± 2.33	
<i>Aceite esencial de Lepechinia betonicifolia</i>			
10.00	31.15 ± 3.73	68.85 ± 3.73	4.51 ± 0.75
5.00	46.96 ± 2.25	53.04 ± 2.25	
2.50	66.29 ± 2.56	33.71 ± 2.56	
1.25	78.58 ± 4.91	21.42 ± 4.91	

3.14 Cálculo de los porcentajes de hemólisis y estabilización de membrana, del extracto de *Punica granatum* y sus tratamientos de pH

Se empleó la misma fórmula descrita previamente para el cálculo de los porcentajes de hemólisis y humedad para cada uno de los tratamientos efectuados sobre el extracto de *Punica granatum*.

En la tabla 8 se describen los valores de % de hemólisis obtenidos para cada concentración de granada y de acuerdo con los tratamientos efectuados de modificación de pH. En función de estos datos y mediante análisis de regresión en el programa estadístico Graph Pad 8.0 se realizaron los cálculos de concentración inhibitoria media (CI₅₀), que determina la concentración necesaria de extracto para reducir en un 50% la hemólisis.

Tabla 8

Porcentajes de hemólisis y estabilización de membrana eritrocitaria a diferentes dosis del extracto de Punica granatum y diferentes tratamientos de pH

Dosis (mg/mL)	Granada pH 2.5 (sin ajuste)		CI ₅₀ (mg/mL)
	% hemólisis	% Estabilización membrana	
40	55.05 ± 0.17	44.95 ± 0.17	>40 mg/mL
20	74.42 ± 4.21	25.57 ± 4.21	
10	68.70 ± 0.25	31.30 ± 0.25	
5	84.08 ± 1.70	15.92 ± 1.70	
	Granada pH 4.0 (ajustada)		
	% hemólisis	% Estabilización membrana	
40	7.55 ± 0.69	92.44 ± 0.69	18.20 ± 2.15
20	37.92 ± 1.30	62.08 ± 1.30	
10	88.11 ± 1.95	11.89 ± 1.95	
5	87.68 ± 3.85	12.32 ± 3.85	
	Granada pH 5.0 (ajustada)		

	% hemólisis	% Estabilización membrana	
40	5.70 ± 0.08	94.30 ± 0.08	27.42 ± 1.05
20	76.10 ± 0.77	23.90 ± 0.77	
10	81.26 ± 1.04	18.74 ± 1.04	
5	77.20 ± 1.29	22.80 ± 1.29	
Granada pH 6.4 (ajustada)			
	% hemólisis	% Estabilización membrana	
40	11.87 ± 0.63	88.13 ± 0.63	24.32 ± 0.93
20	57.03 ± 0.53	42.97 ± 0.53	
10	88.48 ± 1.21	11.52 ± 1.21	
5	94.60 ± 0.77	5.40 ± 0.77	

Capítulo cuatro

Discusión

Piper ecuadorensis sodiro es un arbusto nativo de Ecuador y Colombia ampliamente distribuido en nuestro país desde los 0 hasta los 2500 m s.n.m. La planta es popularmente conocida como “matico de monte” y es usada como remedio tradicional por diferentes comunidades indígenas de Loja y Zamora, principalmente como infusión acuosa como desinfectante o cicatrizante de heridas. También se ha reportado su uso para el “mal de aire” una práctica común en curanderos (quechua: yurak hampiyachak) de la comunidad Saraguro, donde las partes aéreas de *Piper* se usan junto con otras plantas. La fitoquímica de la especie fue evaluada por Ramírez et al (2013) y se encontró la presencia de dos flavonoides con propiedades antifúngicas (Pinocembrin y Pinostrobin).

Según Valarezo et al (2021), el aceite esencial de *Piper ecuadorensis* presentó una fuerte actividad contra *Staphylococcus aureus* y un efecto aun mayor frente al hongo dermatofito *Trichophyton mentagrophytes*. De igual manera, en este estudio, se evidenció una moderada o casi nula actividad antioxidante y entre los componentes principales, biciclogermacreno, α -felandreno, (E)-nerolidol, δ -elemene y shiobunol.

De acuerdo con González, Soto y Gutiérrez (2022), Pinostrobin, uno de los flavanonas presentes en especies como *Piper ecuadorensis*, demostró un efecto antiinflamatorio sobre la dermis de ratones tratadas con TPA, sobre todo si su biodisponibilidad se aumentaba en complejos con beta ciclodextrina (β CD) e hidroxipropil beta ciclodextrina (HP β CD). Este tipo de compuestos que se ha demostrado su presencia en extractos totales de la especie, podría estar generando el efecto estabilizador de membrana, observado en nuestro estudio, donde el extracto total presentó una CI_{50} de 28.42 mg/mL.

Mansoa alliacea comúnmente conocida como saccha ajo se encuentra normalmente en bosques secos y húmedos de Brasil y ampliamente distribuida desde Argentina hasta el sur de México. La infusión de las partes aéreas se ha reportado como útil para el tratamiento de la fiebre y dolores reumáticos; también se ha usado para tratar resfríos, como condimento o como analgésico para dolores de cabeza (Patel et al., 2013).

Entre su composición química se ha encontrado la ocurrencia de flavonoides como apigenina, luteolina, scutellareina y sus correspondientes glucurónicos o compuestos glucosilados; así como también la presencia de aliina que le confiere ese olor característico a ajo fresco, entre otros compuestos de naturaleza terpénica (Jeurkar, M., Thawkar, M. & Chachda N. 2024).

Según Hamann et al (2019) el extracto de *M. alliacea* previno y revirtió el efecto inflamatorio en ratones, en un modelo algésico *in vivo* que presenta características similares a las causadas por la artritis. Particularmente, el tratamiento con el extracto revirtió la alodinia mecánica inducida por el adyuvante de Freund (CFA model in mice, por sus siglas en inglés) con una inhibición máxima de 90%, sin embargo, el edema producido por la administración de CFA no fue revertido. En este mismo estudio se demostró la presencia de ácidos fenólicos como el *p*-cumárico, ferúlico y clorogénico, así como los flavonoides apigenina y luteolina, probables responsables del efecto observado.

Probablemente la presencia de estos compuestos de naturaleza flavonoidea estén generando el efecto estabilizador observado en nuestro estudio, donde se evidenció una menor actividad antiinflamatoria con una CI_{50} de 177.05 mg/mL, comparado con el efecto observado para *P. ecuadorensis*.

Lepechinia betonicifolia, es un arbusto nativo de los Andes distribuido desde los 1000 a 3000 m s.n.m. sobre todo en las provincias de Azuay, Imbabura, Loja, Pichincha y Tungurahua (Jørgensen and León-Yáñez1999). Es comúnmente conocida como matico o salvia real y se ha usado para el tratamiento de moretones, inflamación e infecciones en heridas sobre todo empleando la planta entera, en infusiones o como baños de asientos (De la Torre et al. 2008). Existen pocos estudios fitoquímicos sobre la especie, sin embargo, Morocho y Ochoa (, reportan la presencia de dos diterpenos (ácido oleanólico y ursólico) y un flavonoide (salvigenina). Por otro lado, Calva et al (2022) reportó la obtención y caracterización química del aceite esencial de esta especie, encontrando como componentes mayoritarios a β -pinene, sabinene, α -pinene, β -phellandrene, E-caryophyllene (4.44%) y limoneno (3.84%). Adicionalmente, se encontró un fuerte efecto inhibidor sobre la enzima

colinesterasa del aceite esencial, sin embargo, la bibliografía es escasa en lo que concierne al estudio del efecto antiinflamatorio de esta especie.

De acuerdo con Salehi et al (2019), el monoterpeno (+)- α -pinene manifestó efecto antiinflamatorio, medido como una inhibición en la liberación de IL-1 β . De manera similar, también se demostró en modelos animales (macrófagos de peritoneo de ratas macho C57BL/6) la reducción en la producción de IL-6 y TNF- α . Por otro lado, en el estudio efectuado por Santos et al (2019), se comprobó que la administración oral de β -pineno generó una reducción considerable en la inducción de edema por carragenina en ratas diabéticas y, de igual manera, se comprobó sobre un modelo de peritonitis inducida por carragenina, una reducción en la migración leucocitaria, de linfocitos y monocitos comparados con el grupo control.

La presencia de los monoterpenos β y α -pinene en el aceite esencial de *Lepechinia betonicifolia* (30.45 y 4.97%, respectivamente) podrían explicar el efecto antiinflamatorio observado en nuestro estudio, donde se encontró una CI₅₀ de 4.51 mg/mL.

Por otra parte, *P. granatum* es una planta exótica del suelo sudafricano y dado su comportamiento adaptativo, puede crecer en cualquier región donde sea plantada. *P. granatum* es comúnmente conocido como Granada y es una planta del género *Punica* perteneciente a la familia Lythraceae (anteriormente conocida como Punicaceae) (Ge et al, 2021). Sus raíces, flores, frutos, cáscara, semillas y otras partes se pueden usar como material medicinal y se ha reportado un amplio abanico de actividades farmacológicas, incluyendo propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacteriana y antiviral; así como, jugar un papel principal en la regulación lipídica e inmunomodulación (Wang et al., 2010).

En el presente estudio se utilizó un extracto total obtenido a partir de las semillas y pulpa de la fruta y de acuerdo con la revisión efectuada por Maphetu et al., (2022), las semillas son ricas en una amplia variedad de fitoconstituyentes incluyendo antocianinas, taninos, ácidos grasos, flavonoides, ligandos y esteroides, siendo las semillas ampliamente utilizadas por sus propiedades antimicrobianas, anticancerosas y antioxidantes.

De acuerdo con el estudio realizado por Mastrogiovanni et al (2019), los extractos de subproductos como la cáscara de granada, demostraron significativos efectos antiinflamatorios in vitro sobre células humanas intestinales (Caco-2) y explantes in vivo de tejido colónico porcino, suprimiendo la expresión de CXCL8 una interleucina proinflamatoria a dosis de 2.5 a 25 µg/mL en células Caco-2 y de 5 a 25 µg/mL en explantes colónicos. Esta fuerte actividad antiinflamatoria se vio además reforzada mediante la supresión de IL1A, IL6 con una dosis de 5 µg/mL.

En nuestro estudio, sin embargo, se debió realizar un ajuste de pH para evitar la elevada acidez y citotoxicidad observados en los ensayos preliminares y con los ajustes a pH 4.0, 5.0 y 6.0 se pudo evidenciar un efecto estabilizador de membrana significativo, comparable al observado para *Piper ecuadorensis* pero inferior al de *Lepechinia betonicifolia*.

Todos estos resultados nos impulsan a proponer este método de estabilización de membrana de glóbulos rojos, como una alternativa accesible y económica, para continuar con la exploración de sustancias antiinflamatorias en matrices naturales dentro del laboratorio de bioensayos y, adicionalmente, sugerir la realización de estudios más avanzados con las muestras analizadas y que dieron resultados favorables, de manera que se les pueda encontrar alternativas de uso en los campos alimentarios y farmacéutico.

Conclusiones

Se estableció un protocolo adecuado, seguro y confiable para determinar actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante el método de estabilización de membrana de glóbulos rojos para el laboratorio de Bioensayos (HRBC, por sus siglas en inglés).

De las 9 matrices naturales evaluadas, dos extractos de hojas PEM, MAM, un extracto de frutos PGF y un aceite esencial LBA, resultaron ser efectivos durante el ensayo mostrando un efecto estabilizador de la membrana eritrocitaria sin causar toxicidad aparente.

De las matrices naturales evaluadas, el aceite esencial de *Lepechinia betonicifolia* resulto ser el más prominente con un valor de CI_{50} de 4.51, seguido del extracto de *Piper ecuadorensis* con 28.42 mg/mL.

El extracto de *Mansoa alliacea* demostró un poder antiinflamatorio menor a las restantes muestras con un valor de CI_{50} de 177.05 mg/mL.

El extracto del fruto de *Punica granatum* presento un efecto antiinflamatorio similar al observado para PEM con un rango de valores de CI_{50} entre 18.20 y 27.42 mg/mL, sin embargo, se requirió de tratamiento de ajuste de pH para evitar el efecto citotóxico del extracto puro, dada su elevada acidez.

No se observó efecto antiinflamatorio para las restantes cinco matrices naturales y en el caso de los aceites esenciales, aumentar la dosis significó evidenciar efecto citotóxico.

Recomendaciones

Continuar con el estudio de caracterización de los metabolitos presentes en el extracto crudo de la especie *Piper ecuadorensis*, mediante técnicas analíticas, espectrofotométricas y espectrométricas.

Continuar con el estudio químico de la especie *Lepechinia mutica* con el fin de establecer la utilidad del aceite esencial en el campo farmacéutico, como un posible agente antiinflamatorio

Validar el potencial antiinflamatorio del extracto de *Punica granatum* mediante estudios adicionales in vitro o in vivo.

Proponer alternativas farmacológicas a través del desarrollo de formas farmacéuticas como cápsulas o tabletas para el consumo humano, dada la procedencia inocua del extracto de *Punica granatum*.

Valorar la toxicidad de todos los extractos en modelos in vitro o in vivo, para asegurar la eficacia y utilidad de estas matrices naturales y su posible aplicación farmacológica.

Referencias

- Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. (2017). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System* (5th ed.). Elsevier.
- Agencia Europea de Medicamentos (EMA). (2007, 13 de diciembre). European Medicines Agency recommends withdrawal of the marketing authorisations for lumiracoxib-containing medicines. Recuperado 02 de julio de 2024 de: <https://bit.ly/4gP38uj>
- Aggarwal, B. B., & Harikumar, K. B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the major constituent of *Curcuma longa*. *The Indian journal of pharmacology*, 41(5), 557-565. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5664031/>
- Alarcón, José. (2020). *El Sistema del Complemento: Describiendo su historia, funciones y nomenclatura*. Universidad Autónoma de México. Recuperado el 16 de julio de 2024 de: <https://bit.ly/3XVK2d4>
- Atukorala, I., & Hunter, D. J. (2013). Valdecoxib : the rise and fall of a COX-2 inhibitor. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 14(8), 1077–1086. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.783568>
- Bonilla L. (2021). Modelos in vivo e in vitro empleados para la determinación de la actividad antiinflamatoria de flavonoides y la tendencia para su aplicación en Sistemas Terapéuticos Transdérmicos (STTs). Recuperado el 29 de julio de 2024, de: <https://bit.ly/4ePUqKn>
- Burton B. (2007). COX 2 inhibitor rejected in North America but retained in Europe. *BMJ* (Clinical research ed.), 335(7624), 791. <https://doi.org/10.1136/bmj.39370.401597.13>
- Carbajal, D, Molina, V. Ravelo, Y. Pérez, Y. Oyarzabal, A. Mas, R. (2013). Efectos del policosanol en los modelos de pleuresía inducida por carragenina y granuloma por algodón. *Revista Cubana de Farmacia* 2013;47(4): 492-501
- Cronquist, A. (1980). *The Anacardiaceae*. New York Botanical Garden.
- Cupido, Madeleyne, De-Nova, José Arturo, y Cilia-López, Virginia Gabriela. (2024). Aproximaciones evolutivas en etnobotánica de plantas medicinales y bioprospección.

Botanical Sciences, 102(1), 26-38. Epub 13 de febrero de 2024. <https://doi.org/10.17129/botsci.3325>

De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macia MJ, Balslev H. 2008. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador/Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus, Quito & Aarhus. p. 38

Dieppe, P. A., Ebrahim, S., Martin, R. M., & Jüni, P. (2004). Lessons from the withdrawal of rofecoxib. *BMJ (Clinical research ed.)*, 329(7471), 867–868. <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7471.867>

Eze, F. I., Uzor, P. F., Ikechukwu, P., Obi, B. C., Osadebe, P. O. (2019). In vitro and In vivo Models for Anti-inflammation: An Evaluative Review. *INNOSC Theranostics and Pharmacological Sciences*. 2(2), 755, <https://doi.org/10.36922/itps.v2i2.775>

Fessler, S.N.; Chang, Y.; Liu, L.; Johnston, C.S. Curcumin Confers Anti-Inflammatory Effects in Adults Who Recovered from COVID-19 and Were Subsequently Vaccinated: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* 2023, 15, 1548. <https://doi.org/10.3390/nu15071548>

G. A. (2018). Actividad antiinflamatoria in vitro de los extractos etanólico y hexánico de tallos de *Cuscuta jalapensis* Schlttdl. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 26(75), 20-27

Galeano, Antonia K., Campuzano-Bublitz, Miguel A., & Kennedy, Maria Luisa. (2021). Modelos in vitro utilizados para predecir hepatotoxicidad de medicamentos en la fase pre-clínica. *Revista CON-CIENCIA*, 9(2), 50-66. Epub 30 de noviembre de 2021. <https://doi.org/10.53287/jsxf4577cu36l>

García-Carrasco, Dionisio. (2016). Proceso Inflamatorio y los Antiinflamatorios. Recuperado 4 de agosto de 2024, de: <https://bit.ly/3Yb0ZSi>

Ge, S., Duo, L., Wang, J., Zhula G., Yang, J., Li, Z., Tu, Y. A unique understanding of traditional medicine of pomegranate, *Punica granatum* L. and its current research

- status. J. Ethnopharmacol., 271 (27) (2021), Article 113877, 10.1016/j.jep.2021.113877
- Ghlichloo I, Gerriets V. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Recuperado 29 junio 2024 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>
- Gonzalez, A. S., Soto, V. H., & Gutierrez D. M. (2022). Study of the dermal anti-inflammatory, antioxidant, and analgesic activity of pinostrobin. *Heliyon*, 8, e10413
- Goodman, L. S., & Gilman, A. (2011). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (12th ed.). McGraw-Hill.
- Graham, S. A., Pryer, J. D., & Stevens, P. F. (2003). Lythraceae. In: Kubitzki, K. (Ed.), The Families and Genera of Vascular Plants (Vol. IV). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Guerrero, Belsy, & López, Mercedes. (2015). Generalidades del sistema de la coagulación y pruebas para su estudio. *Investigación Clínica*, 56(4), 432-454. Recuperado en 03 de octubre de 2024, de: <https://bit.ly/4dEzs02>
- Hamann, F. R., Brusco, I., de Campos Severo, G., de Carvalho, L. M., Faccin, H., Gobo, L., Oliveira, S. M., & Rubin, M. A. (2019). Mansoa alliacea extract presents antinociceptive effect in a chronic inflammatory pain model in mice through opioid mechanisms. *Neurochemistry international*, 122, 157–169. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.017>
- Heywood, V. H. (1993). Flowering plants of the world. B. T. Batsford Ltd.
- Jeurkar, M., Thawkar, M. & Chachda N. (2024). Review on pharmacognosy and pharmacology of Mansoa alliacea. *Journal of advanced zoology*, 45, 1282 – 1287
- Jørgensen PM, Leon-Yanez S. 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. St. Louis: Missouri Botanical Garden. 75:p. 1–1182.
- Katzung, B. G., & Trevor, A. J. (2015). Basic and Clinical Pharmacology (13th ed.). McGraw-Hill.

- Keb CAF. Mecanismo de los AINES y antiinflamatorios derivados para el control del dolor y la inflamación. Uso de antiinflamatorios en odontología. Rev ADM. 2022; 79 (1): 38-47. <https://dx.doi.org/10.35366/103817>
- León, M. (2016). Medio ambiente, biodiversidad y seguridad. Revista de Pensamiento Estratégico y Seguridad CISDE, 1(2), 9-26
- Li, J., Wang, H., Zhang, L., An, N., Ni, W., Gao, Q. & Yu Y. (2021) Capsaicin affects macrophage anti-inflammatory activity via the MAPK and NF-κB signaling pathways. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 93 (4), <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000721>
- Maphetu, N., Unuofin, J. O., Masuku, N. P., Olisah, C., Lebelo, S. L. (2022). Medicinal uses, pharmacological activities, phytochemistry, and the molecular mechanisms of Punica granatum L. (pomegranate) plant extracts: A review. Biomedicine & Pharmacotherapy, 153, 113256, ISSN 0753-3322
- Mastrogiovanni, F., Mukhopadhyaya, A., Lacetera, N., Ryan, M. T., Romani, A., Bernini, R., & Sweeney, T. (2019). Anti-Inflammatory Effects of Pomegranate Peel Extracts on In Vitro Human Intestinal Caco-2 Cells and Ex Vivo Porcine Colonic Tissue Explants. Nutrients, 11(3), 548. <https://doi.org/10.3390/nu11030548>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. Nature, 454, 428-435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Mirza, M. A., Mahmood, S., Hilles, A. R., Ali, A., Khan, M. Z., Zaidi, S. A. A., Iqbal, Z., & Ge, Y. (2023). Quercetin as a Therapeutic Product: Evaluation of Its Pharmacological Action and Clinical Applications-A Review. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(11), 1631. <https://doi.org/10.3390/ph16111631>
- Montes-Belmont, Roberto. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología*, 29, 73-82. Recuperado en 04 de octubre de 2024, de: <https://bit.ly/3TSmfcY>
- Moreno, L. y Navarro, M. Farmacología básica del dolor (analgésicos). Recuperado el 18 de julio de 2024, de: <https://bit.ly/3YdhL3n>

- Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-852.
<https://doi.org/10.1038/nature01320>
- Nielsen, S. S. *Food Analysis Laboratory Manual*, 3rd ed. USA:Springer International Publishing, (2017). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5>
- Patel, I., Sipai, S., Rathod, D., Shrimali, G., Patel, A. & Rami E. (2013). Phytochemical studies on *Mansoa alliacea* (Lam.). *Int. J. Pharm. Res.* 4, 1823 – 1828
- Patil, K. R., Mahajan, U. B., Unger, B. S., Goyal, S. N., Belemkar, S., Surana, S. J., Ojha, S., & Patil, C. R. (2019). Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4367.
<https://doi.org/10.3390/ijms20184367>
- Peralta-Pérez, M. del R., & Volke-Sepúlveda, T.L.. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 75-88. Recuperado en 03 de octubre de 2024, de:
<https://bit.ly/3TX1MDY>
- Pervaiz, S., & Rizvi, S. I. (2015). Resveratrol: A review of its therapeutic potential. *Clinical and translational medicine*, 4(1), 26.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5630227/>
- Plants of the World Online. (2024). Plants of the World Online. Recuperado de
<https://powo.science.kew.org/>
- Quesada Guillén, Roberto Rosendo, Pozo Abreu, Silvia María, & Martínez Larrarte, José Pedro. (2018). Derrames pleurales trasudados y exudados: clasificación. *Revista Cubana de Reumatología*, 20(3), .
<https://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.1467775>
- Rainsford, K. D. (2007). Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Sub-Cellular Biochemistry*, 42, 3-27. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77571-8_1

- Ramírez, J., Cartuche, L., Morocho, V., Aguilar, S., & Malagón, O. (2013). Antifungal activity of raw extract and flavanols isolated from *Piper ecuadorensis* from Ecuador. *Rev. bras. farmacogn.* 23 (2), 370 – 373, <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000012>
- Ramírez-Garza, S. L., Laveriano-Santos, E. P., Marhuenda-Muñoz, M., Storniolo, C. E., Tresserra-Rimbau, A., Vallverdú-Queralt, A., & Lamuela-Raventós, R. M. (2018). Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. *Nutrients*, 10(12), 1892. <https://doi.org/10.3390/nu10121892>
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., & Henderson, G. (2012). *Rang and Dale's Pharmacology* (7th ed.). Elsevier.
- Salazar-López, J. A., Villanueva-Lendecky, M. A., García-Hernández, E., & Soto-Ojeda, Salehi, B., Upadhyay, S., Erdogan Orhan, I., Kumar Jugran, A., I D Jayaweera, S., A Dias, D., Sharopov, F., Taheri, Y., Martins, N., Baghalpour, N., Cho, W. C., & Sharifi-Rad, J. (2019). Therapeutic potential of α - and β -pinene: a miracle gift of nature. *Biomolecules*, 9(11), 738. <https://doi.org/10.3390/biom9110738>
- Santos, E. S., Abrantes Coelho, G. L., Saraiva Fontes Loula, Y. K., Saraiva Landim, B. L., Fernandes Lima, C. N., Tavares de Sousa Machado, S., Pereira Lopes, M. J., Soares Gomes, A. D., Martins da Costa, J. G., Alencar de Menezes, I. R., Coutinho, H. D. M., Kim, B., Bezerra Felipe, C. F., de Araújo Neves, S., & Kerntopf, M. R. (2022). Hypoglycemic, Hypolipidemic, and Anti-Inflammatory Effects of Beta-Pinene in Diabetic Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2022, 8173307. <https://doi.org/10.1155/2022/8173307>
- Serhan, C. N., Chiang, N., & Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*, 8(5), 349-361. <https://doi.org/10.1038/nri2294>
- Smith, J. (2023, 15 de marzo). La importancia de la diversidad vegetal para la economía global. <https://bit.ly/4h6kG5p>

- Torres, W., Mendoza, L., Vicci, H., Eblen-Zajjur, A., & Navarro, M. (2016). Evaluación de parámetros inflamatorios locales y sistémicos de quemadura periférica en un modelo animal. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33(4), 713-718.
- Us-Medina, Ulil, Millán-Linares, Maria del Carmen, Arana-Argaes, Víctor Ermilo, & Segura-Campos, Maira Rubi. (2020). Actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro de extractos de chaya (*Cnidoscolus aconitifolius* (Mill.) I.M. Johnst). *Nutrición Hospitalaria*, 37(1), 46-55. Epub 08 de junio de 2020. <https://dx.doi.org/10.20960/nh.02752>
- Valarezo, E., Flores-Maza, P., Cartuche, L., Ojeda-Riascos, S., & Ramírez, J. (2021). Phytochemical profile, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil extracted from Ecuadorian species *Piper ecuadorensis* sodiro. *Natural product research*, 35(24), 6014–6019. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1813138>
- Wang, R., Ding, Y., Liu, R., Xiang, L., Du, L. (2010). Pomegranate: constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit. Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 4 (2), 77 – 87
- World Health Organization. (2021). Traditional medicine. Recuperado de <https://bit.ly/4dxA3ki>
- Y.H. Gonfa, F.B. Tessema, A. Bachheti, N. Rai, M.G. Tadesse, A. Nasser Singab, K.K. Chaubey, R.K. Bachheti. Anti-inflammatory activity of phytochemicals from medicinal plants and their nanoparticles: a review. *Curr. Res. Biotechnol.*, 6 (2023), Article 100152, [10.1016/J.CRBIOT.2023.100152](https://doi.org/10.1016/J.CRBIOT.2023.100152)
- Yang, C. S., & Hong, S. H. (2016). A review of the effects of green tea catechins on human health: Focus on chronic degenerative diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 825687. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32143309/>
- Yartsev, Alex. (2015). Respiratory system. Recuperado 11 de agosto de 2024 de: <https://bit.ly/47RGT2A>

