



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA

EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

TESIS

**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIINFLAMATORIA Y ANTIARTRÍTICA DE
COMPUESTOS FENÓLICOS DE FRUTOS DE *Potentilla indica* (FALSA FRESA)**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

QUE PRESENTA:

IBQ. LUIS ALFONSO SERENO VILLASEÑOR

luisalfonsosereno@gmail.com

Director de Tesis

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Morelia, Michoacán

Marzo de 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis padres, quienes desde siempre me han brindado su apoyo incondicional para llegar a donde estoy y poder alcanzar mis objetivos y metas. De igual forma, a mis hermanos, los cuales han sido y son parte fundamental de mi crecimiento como persona.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y en particular, al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas, por permitirme el ingreso a este posgrado y brindarme las herramientas necesarias para realizar mis estudios.

Al CONACYT, por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de la maestría.

Al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por la oportunidad de permitirme realizar la tesis bajo su dirección y por haber compartido sus enseñanzas y experiencias durante estos dos años.

A los profesores miembros de mi comité sinodal (Dra. Patricia Ríos Chávez, Dra. Esperanza Meléndez Herrera, Dr. Héctor Eduardo Martínez Flores y Dr. Alfredo Saavedra Molina) por sus valiosas aportaciones y conocimientos, además por dedicar parte de su tiempo para revisar y rectificar mi tesis.

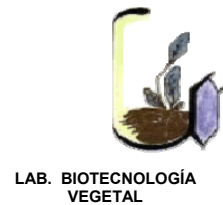
A la M.C. Alejandra Hernández García, responsable técnica del laboratorio de Biotecnología Vegetal, por sus comentarios y observaciones.

A todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Vegetal por su amistad, y en especial, al Dr. Rafael Torres Martínez por su ayuda en el parte experimental.

Y por último, pero no menos importante, a todos mis amigos y compañeros, tanto los que conocí en esta nueva etapa, como a los que he conocido a lo largo de mi vida.

¡Gracias a todos!

**LA PRESENTE INVESTIGACIÓN
FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL DEL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA
DIRECCIÓN Y ASESORÍA DEL DR. RAFAEL
SALGADO GARCIGLIA. ES PARTE DEL
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN APOYADO
POR LA COORDINACIÓN DE LA
INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA (CIC 2.10 RSG
2018-2020).**



ÍNDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN	4
2.2. ARTRITIS REUMATOIDE	6
2.3. AGENTES ANTIOXIDANTES, ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIARTRÍTICOS	9
2.3.1. Antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal	10
2.3.2. Antiartríticos de origen vegetal.....	12
2.4. COMPUESTOS FENÓLICOS.....	12
2.4.1. Mecanismos de acción de compuestos fenólicos de origen vegetal	15
2.5. ANTECEDENTES DIRECTOS	15
2.5.1. <i>Potentilla indica</i> (Andr.) Focke	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
5.1. OBJETIVO GENERAL	21
5.1.1. Objetivos específicos	21
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
7. RESULTADOS	23
7.1. CAPÍTULO I.....	23
7.2. CAPÍTULO II.....	42
7.3. CAPÍTULO III.....	64
8. DISCUSIÓN GENERAL	79
9. CONCLUSIÓN GENERAL.....	85
10. LITERATURA CITADA GENERAL.....	87
11. ANEXOS	95

ABREVIATURAS

ABTS: Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolín-6-sulfonato
ADN: Ácido desoxirribonucleico
BHT: Butilhidroxitolueno
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidracilo
COX-1: Ciclooxygenasa 1
COX-2: Ciclooxygenasa 2
ERO: Especies reactivas de oxígeno
ERN: Especies reactivas de nitrógeno
FC: Fragmento de región cristizable
FR: Factor reumatoide
FRAP: Poder antioxidante reductor del hierro
GPX: Glutación peroxidasa
GSH: Glutación reducido
GSR: Glutación reductasa
GSSG: Glutación oxidado
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
IC₅₀: Concentración media inhibitoria
ICAM-1: Molécula de adhesión
IgG: La inmunoglobulina G
IgM: La inmunoglobulina M
IL-1: Interleucina 1
IL-1 β : Interleucina 1 β
IL-2: Interleucina 2
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-13: Interleucina 13
IL-17: Interleucina 17
iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible
LOX: Lipooxygenasa
LPS: Lipopolisacáridos
MAP: Proteína mitógeno activada
Mo: Molibdeno
NF- κ B: Factor de transcripción nuclear kappa B
Nrf2: Factor nuclear eritroide 2
pH: Potencial de Hidrógeno
RT1: Sistema mayor de histocompatibilidad de Ratas
SOD: Superóxido dismutasa
SKOV-3: línea celular
TAC: Capacidad antioxidante total
TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa
TPA: 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
TROLOX: Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ejemplos de plantas con actividad antioxidante y antiinflamatoria.....	11
Cuadro 2. Ejemplos de plantas con actividad antiartrítica.....	13
Cuadro 3. Ejemplos de compuestos fenólicos derivados de plantas con actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica.....	14
Cuadro 4. Grupos de ratas Wistar utilizados.....	47
Cuadro 5. Compuestos fenólicos de la solución de mezcla de estándares, analizados por HPLC.....	57
Cuadro 6. Contenido de compuestos fenólicos identificados y cuantificados por HPLC del extracto metanólico y fracción clorofórmica de frutos de <i>Potentilla indica</i>	59
Cuadro 7. Índice artrítico en artritis inducida con adyuvante incompleto de Freund y colágeno de pollo tipo II en ratas Wistar.....	68
Cuadro 8. Grupos de ratas Wistar macho utilizados para la determinación del efecto antiartrítico con administración oral por 28 días del extracto metanólico y fracción clorofórmica de frutos de <i>Potentilla indica</i>	68
Cuadro 9. Índices artríticos en ratas artríticas Wistar macho con la administración del extracto metanólico y la fracción clorofórmica de frutos de <i>Potentilla indica</i>	70
Cuadro 10. Marcadores bioquímicos e inmunológicos en suero de ratas Wistar macho artríticas, tratadas con el extracto metanólico y la fracción clorofórmica de los frutos de <i>Potentilla indica</i>	74
Cuadro 11. Valores de referencia de parámetros bioquímicos en suero de ratas....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismo de acción de los compuestos fenólicos en procesos inflamatorios.....	16
Figura 2. <i>Potentilla indica</i> : A) Frutos, B) parte aérea, C) flor.....	17
Figura 3. Porcentajes de la actividad antioxidante del extracto metanólico de los frutos de <i>Potentilla indica</i> y las fracciones metanólica y clorofórmica, determinados por los métodos: A) TAC, B) DPPH y C) ABTS.....	32
Figura 4. Ácidos fenólicos totales (A), flavonoides totales (B) y antocianinas totales (C) del extracto metanólico de los frutos de <i>Potentilla indica</i> y las fracciones metanólica y clorofórmica.....	36
Figura 5. Porcentaje de actividad antiinflamatoria tópica del extracto metanólico de los frutos de <i>Potentilla indica</i> en las dosis de 0.1 (A), 1 (B) y 10 (C) mg/kg.....	51
Figura 6. Porcentaje de actividad antiinflamatoria tópica de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de los frutos de <i>Potentilla indica</i>	52
Figura 7. Porcentaje de actividad antiinflamatoria por administración oral del extracto metanólico (A) y la fracción clorofórmica (B) de los frutos de <i>Potentilla indica</i> en la dosis de 10 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente....	54
Figura 8. Cromatograma de la solución mezcla estándar de compuestos fenólicos analizado por HPLC. Picos: 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido vanílico; 4, ácido cafeico; 5, epicatequina; 6, ácido p-cumárico; 7, rutina; 8, ácido elágico; 9, quercetina.....	57
Figura 9. Fotografías representativas de signos desde el inicio de la inducción de la artritis reumatoide experimental en ratas Wistar macho, hasta la máxima inflamación y síntomas representativos de la enfermedad.....	71
Figura 10. Mecanismo de acción de procesos inflamatorios.....	84

RESUMEN

Potentilla indica es una planta de la familia Rosaceae, originaria de Asia, que en forma completa (raíces, tallos y hojas) ha mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, citotóxica e inmunomoduladora. No obstante, los frutos de esta planta han sido poco estudiados. En esta investigación se analizó la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica de los frutos maduros de *P. indica*, relacionando estas propiedades con el contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas totales). Se obtuvo un extracto metanólico crudo a partir de los frutos maduros de *P. indica* por maceración, del cual se obtuvieron a su vez dos fracciones (metanólica y clorofórmica) por extracción líquido-líquido. La actividad antioxidante se evaluó por métodos espectrofotométricos, mientras que la cuantificación de compuestos se hizo tanto por métodos espectrofotométricos como por HPLC. La actividad antiinflamatoria y la actividad antiartrítica se evaluaron en modelos *in vivo* de ratas Wistar, utilizando el modelo de edema en pata inducido por carragenina con administración tópica y oral, y la inducción de artritis con adyuvante incompleto de Freund y colágeno tipo II, mediante la administración oral, respectivamente. La fracción clorofórmica presentó la actividad antioxidante más alta por los tres métodos empleados, con 67.90%, 67.25% y 44.51% para TAC, DPPH y ABTS, respectivamente; así como el contenido más alto de ácidos fenólicos (0.615 μ moles Eq. Ácido gálico/g peso fresco) y antocianinas totales (0.0028 mg Eq. Cianidina/mg de extracto), identificando por HPLC un contenido alto de ácido elágico (44.37 μ g/mL), quercetina (27.2 μ g/mL) y rutina (18.7 μ g/mL). Estos resultados se relacionan directamente con la alta actividad antiinflamatoria aguda, mostrando un 77.8% cuando la administración fue tópica y de un 72% con la vía de administración oral, ambas a una concentración de 1 mg/kg. Por otro lado, el extracto metanólico crudo presentó el contenido más alto de flavonoides totales (con 14.525 μ moles Eq. Quercetina/g peso fresco), identificándose un contenido alto de ácido gálico (37.4 μ g/mL) y de ácido p-cumárico (21.1 μ g/mL), que presentó un efecto antiartrítico, por retrasar los síntomas de la artritis experimental hasta por 18 días cuando fue administrado de manera oral en dosis de 10 mg/kg.

Palabras clave: Antiartrítico, antiinflamatorio, antioxidante, compuestos fenólicos, *Potentilla indica*.

ABSTRACT

Potentilla indica is a plant of the family Rosaceae, native to Asia, which in complete plant (roots, stems and leaves) has shown antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic and immunomodulatory activity. However, the fruits of this plant have been poorly studied. This research analyzed the antioxidant, anti-inflammatory and antiarthritic activity of mature fruits of *P. indica*, relating these properties to the content of phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids and total anthocyanins). A crude methanolic extract was obtained from the ripe fruits of *P. indica* by maceration, from which two fractions (methanolic and chloroformic) were obtained by liquid-liquid extraction. Antioxidant activity was evaluated by spectrophotometric methods, while compounds quantification was done by both spectrophotometric methods and HPLC. Anti-inflammatory activity and antiarthritic activity were evaluated by *in vivo* models of Wistar rats, using the carrageenan-induced rat paw edema model with topical and oral administration of extract and fraction at different doses, and the induction of arthritis with Freund's incomplete adjuvant and collagen type II with oral administration of extract and fraction, respectively. The highest antioxidant activity was found in the chloroformic fraction in the three methods used, with 67.90%, 67.25% and 44.51% for TAC, DPPH and ABTS, respectively; as well as the highest phenolic acid content (0.615 μ moles Eq. Gallic acid/g fresh weight) and total anthocyanins (0.0028 mg Eq. Cyanidine/mg extract), identifying by HPLC a high content of ellagic acid (44.37 μ g/mL), quercetin (27.2 μ g/mL) and rutin (18.7 μ g/mL) were detected. These results are directly related to high anti-inflammatory activity, showing 77.8% when administration was topical and 72% with oral administration, both at a concentration of 1 mg/kg. On the other hand, the methanolic extract presented the highest content of total flavonoids (14,525 μ moles Eq. Quercetin/g fresh weight), identifying a high content of gallic acid (37.4 μ g/mL) and p-cumaric acid (21.1 μ g/mL), which exhibited an antiarthritic effect, by delaying symptoms of experimental arthritis for up to 18 days when was administered orally at doses of 10 mg/kg.

Keywords: Antiarthritic, anti-inflammatory, antioxidant, phenolic compounds, *Potentilla indica*.

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El oxígeno es esencial para la supervivencia de los seres vivos, sin embargo, durante la respiración celular existen fugas donde se generan los radicales libres; estos radicales libres atacan moléculas biológicas claves, causando lipoperoxidación y oxidando el ADN y las proteínas, contribuyendo a generar daños en el organismo (Hangun-Balkir y McKenney, 2012). El metabolismo aeróbico cuenta con sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) como defensa al ataque de los radicales libres, no obstante, un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes genera el proceso de estrés oxidante. Éste, es clave en el desarrollo de enfermedades crónicas tales como cáncer, arteriosclerosis, artritis reumatoide, algunas formas de anemia, diabetes, entre otras, que generalmente cursan con procesos de inflamación, por lo que hay investigaciones que se realizan encaminadas hacia el estudio de la relación entre las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que poseen ciertos compuestos de origen vegetal (Tapia *et al.*, 2004; Çelik *et al.*, 2010).

En la búsqueda de nuevos agentes, principalmente como antioxidantes, antiinflamatorios y antiartríticos, así como en investigaciones dirigidas a la caracterización fitoquímica y medicinal de plantas o algunas de sus partes como los frutos, se realizan ensayos en modelos experimentales *in vitro* (células, tejidos, órganos) e *in vivo* (animales), con los que se han estudiado las propiedades medicinales de diferentes frutos de consumo común. Sin embargo, es de gran importancia mencionar que en diferentes regiones del mundo, incluyendo nuestro país, existen especies o variedades de plantas cuyo cultivo no es tan extensivo y que por sus características poseen un alto potencial como alimentos funcionales o nutraceuticos (Calixto *et al.*, 2003).

Entre los métodos de evaluación *in vitro* de antioxidantes, se han utilizado el de DPPH, el ABTS, FRAP y el de actividad antioxidante total (TAC), entre otros (Miguel, 2010). Para determinar la actividad antiinflamatoria, los ensayos más comunes son

el ensayo de edema en pata de rata inducida por carragenina y la medición de la inflamación en oreja de rata inducida por tetradecanoil forbol acetato (TPA) (Winter *et al.*, 1962; Young y De Young, 1989). La actividad antiartrítica se evalúa mayormente con la aplicación de extractos o compuestos de origen vegetal, en ratas artríticas inducidas con adyuvante de Freund (CFA), determinando la inhibición de la inflamación (Kumar *et al.*, 2015).

Además, tanto el estrés oxidante como los procesos de inflamación y artritis pueden ser evaluados por medio de biomarcadores cuantificables en fluidos biológicos (Vasconcelos *et al.*, 2007). Algunos de estos marcadores tanto para el estrés oxidativo, inflamación y artritis, están la proteína C reactiva, el factor reumatoide, el factor de transcripción nuclear κB (NF- κB) y citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, tales como TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Rossi *et al.*, 2016).

Con estos ensayos, se han estudiado las propiedades medicinales de varios tipos de frutos de consumo común como diversos cítricos, guayaba, tomate, pepino, berenjena y cultivares comerciales de chiles (Bhardwaj *et al.*, 2014; Maji y Banerji, 2016; Alu'Datt *et al.*, 2017), los cuales presentan un alto potencial de mostrar actividad biológica importante para el tratamiento de enfermedades que cursan con estrés oxidante e inflamación.

Las frutillas o frutos rojos como fresa, zarzamora, arándano y frambuesa, son considerados como alimentos funcionales y nutraceuticos debido a su alta actividad antioxidante, lo cual se ha relacionado principalmente con el contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos libres, flavonoides, taninos y antocianinas) (Cheel *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2012). El contenido de estos compuestos se ha relacionado con un efecto antiinflamatorio (Bowen-Forbes *et al.*, 2010; Azab *et al.*, 2016) y en menor medida con un efecto antiartrítico (Li *et al.*, 2015). Por lo que es de gran importancia estudiar frutos o plantas con potencial para ser usados como agentes terapéuticos.

Tal es el caso de los frutos de la fresa silvestre o falsa fresa (*Potentilla indica*) que pertenece a la familia Rosaceae, que poco se ha estudiado y son escasas las investigaciones encaminadas a determinar sus propiedades medicinales y los compuestos bioactivos. Los frutos de esta planta y especies afines, se han utilizado en la medicina tradicional de Asia para el tratamiento de la lepra, fiebre congénita, la inflamación del tejido, hematemesis y el cáncer, entre otros usos. Sus extractos han mostrado un efecto citotóxico moderado contra varias líneas de células cancerosas y actividad inhibidora limitada contra el crecimiento celular normal (Peng *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009).

En la presente investigación se determinó la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica del extracto metanólico de los frutos de *P. indica* para relacionar su efectividad con el contenido de los principales compuestos fenólicos.

2. ANTECEDENTES

2.1. ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN

El estrés oxidante se refiere a la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo, entre otras) en las células y tejidos, y al debilitamiento de sistemas antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, entre otras) y no enzimáticos como el glutatión, α -tocoferol, ácido ascórbico y carotenoides, lo cual conduce al daño de biomoléculas como ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos. El estrés oxidante está estrechamente relacionado con enfermedades crónicas tales como Parkinson, Alzheimer, cáncer, diabetes, artritis reumatoide, entre otras (Birben *et al.*, 2012; Ambriz-Pérez *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que estas especies reactivas de oxígeno se producen de manera natural dentro de las células, y en cantidades limitadas cumplen funciones esenciales en el mantenimiento de la homeostasis celular e intervienen en procesos de señalización celular y expresión de genes. Existen fuentes endógenas y exógenas de especies reactivas de oxígeno, entre las primeras se encuentra el humo de cigarro, la radiación ionizante y la contaminación; por otro lado, las principales fuentes exógenas son el metabolismo oxidativo mitocondrial, el estallido respiratorio de los fagocitos, el metabolismo del ácido araquidónico y la inflamación (Birben *et al.*, 2012; Ambriz-Pérez *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2016).

La relación entre el estrés oxidante y la inflamación ha sido bien documentada, ya que se ha reportado que el estrés oxidante tiene un papel patogénico en enfermedades inflamatorias crónicas, y a su vez, la inflamación en sí produce especies reactivas que aumentan el estrés oxidante (Hussain *et al.*, 2016).

La inflamación es la respuesta fisiológica de defensa del organismo a estímulos nocivos como patógenos, células dañadas, infecciones virales, exposición a

alérgenos, enfermedades autoinmunes y crónicas, traumas físicos o irritantes, y que viene acompañada por hinchazón, aumento de la permeabilidad vascular, dolor y enrojecimiento; se trata de un proceso complejo que involucra la acción coordinada de múltiples células y proteínas plasmáticas que provienen de los vasos sanguíneos y entran en los tejidos afectados. Es un mecanismo que concentra los recursos defensivos del cuerpo en el lugar necesario; las células fagocíticas reconocen, atrapan y destruyen al patógeno o molécula extraña, para lo cual primero llegan al sitio infectado o dañado como respuesta a sustancias (químio-atrayentes) liberadas previamente en dicho sitio (Karp, 2011; Hussain *et al.*, 2016).

Durante la inflamación, algunas células, principalmente los macrófagos y neutrófilos, son activados a través de receptores de reconocimiento de patrones, lo cual desencadena una vía de señalización que liberará al factor de transcripción nuclear β (NF- κ B), el factor transcripcional más importante de los procesos inflamatorios, que promueve la expresión de genes de mediadores inflamatorios tales como las citocinas, las especies reactivas de oxígeno, las enzimas inflamatorias, el óxido nítrico, moléculas de adhesión, prostaglandinas y leucotrienos (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016).

Las citocinas son proteínas extracelulares, hidrosolubles, con un peso molecular de entre 8 y 30 kDa que desempeñan funciones claves iniciando, manteniendo y propagando el proceso inflamatorio. Entre las proinflamatorias están las interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 y IL-17) y el TNF- α (factor de necrosis tumoral α), mientras que las antiinflamatorias son las interleucinas IL-4, IL-10, IL-13 y el factor transformador de crecimiento β . Las citocinas son producidas por una gran variedad de células (por ejemplo células del sistema inmune y células endoteliales) e influyen principalmente en la actividad, diferenciación y proliferación de células inmunológicas (macrófagos, neutrófilos, linfocitos, entre otras), así como también regulan la producción y actividad de otras citocinas, por lo que pueden aumentar o atenuar la inflamación, son por lo tanto, los mediadores necesarios para

conducir la respuesta inflamatoria hacia las regiones de infección y lesión (De Oliveira *et al.*, 2011).

Se presentan dos fases de inflamación bien diferenciadas, la aguda y la crónica. La aguda tiene una evolución muy breve (desde unos minutos hasta varias horas); entre sus características esta la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas (edema) y la migración de leucocitos (principalmente neutrófilos) en los tejidos afectados o dañados. La crónica tiene una mayor duración (la inflamación permanece semanas, meses o incluso años) y se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular, además de una producción excesiva de mediadores inflamatorios que puede conducir a la aparición de enfermedades crónicas severas (León *et al.*, 2015).

Debido a lo anterior, disminuir la inflamación es muy importante, y con este propósito se usan generalmente antiinflamatorios no esteroideos, sin embargo, éstos tienen efectos secundarios adversos como problemas gastrointestinales y de hipersensibilidad. Como una alternativa se ha encontrado que compuestos de origen vegetal pueden ser usados en tratamientos al no presentar efectos adversos (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016).

2.2. ARTRITIS REUMATOIDE

Algunas de las enfermedades crónicas se relacionan con el estrés oxidante, siendo la artritis reumatoide una de ellas, ya que es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune y con predisposición genética ocasionada en las articulaciones (de la rodilla, muñeca, codo, pies, etc.), que sin tratamiento efectivo lleva a daño estructural del sistema músculo-esquelético, produciendo tanto limitación parcial como total en los pacientes y dolor. La artritis reumatoide afecta aproximadamente al 1% de la población mundial y el riesgo de padecerla aumenta con la edad. La etiología es desconocida, sin embargo, los estudios sugieren que tanto factores genéticos como ambientales son responsables de su iniciación. Entre los factores

externos que pueden propiciar la adquisición de la enfermedad, están el tabaquismo, el consumo de alcohol, la falta de frutas y verduras en la dieta, la vida sedentaria y la obesidad, ya que todos ellos han demostrado producir una inflamación de bajo grado. Actualmente es considerada una enfermedad incurable (Yen, 2001; Caballero y Pinzón, 2006; Watson y Preedy, 2013).

En las articulaciones normales, la membrana que recubre la cavidad sinovial sólo tiene una capa de grosor. En las personas que padecen esta enfermedad, esta membrana se inflama y engrandece por la infiltración de células inmunitarias autorreactivas y auto anticuerpos. Con el paso del tiempo, el cartílago se sustituye por tejido fibroso, causando inmovilización de la articulación, además de la destrucción progresiva del hueso subyacente (Karp, 2011).

El fibroblasto sinovial es el componente celular residente más importante de la membrana sinovial articular, en donde su función es contribuir a la homeostasis de la articulación, produciendo los componentes de la matriz extracelular y del líquido sinovial. Éstos tienen una participación relevante en la patogenia de la artritis reumatoide, y por lo tanto, en la membrana sinovial reumatoide ya que aumentan en número (hiperplasia) y presentan un fenotipo alterado, desempeñando un papel fundamental en la destrucción del cartílago y hueso articular, sintetizando enzimas extracelulares (proteasas) y actuando como inductores de la diferenciación y activación de los osteoclastos, además de bloquear los mecanismos de reparación ósea. Los fibroblastos sinoviales reumatoides participan activamente en el reclutamiento y retención de las células del infiltrado inflamatorio mediante la secreción de citocinas y quimiocinas y, por último, contribuyen a la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) (Izquierdo y Pablos, 2013).

Varias vías dentro de la cascada inflamatoria se activan en la artritis reumatoide, resultando en un aumento de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17, IL-12), de macrófagos, neutrófilos, linfocitos (T, B y NK), moléculas de adhesión y factores de coagulación. La importancia clave del TNF- α , la IL-1 β , la IL-6 y la IL-12

ha sido demostrada debido a que su bloqueo mediante anticuerpos monoclonales resulta en una mejoría substancial de la enfermedad. La IL-6 es esencial para la diferenciación de linfocitos Th17, los cuales son clave en la patogenia de la artritis reumatoide al secretar la IL-17, la cual participa en la activación de los fibroblastos sinoviales y osteoclastos, contribuyendo a la destrucción de la articulación y el hueso. Por otro lado, la IL-12 participa en la diferenciación de linfocitos Th1 a partir de linfocitos Th0, los cuales tienen un papel fundamental al activar a los macrófagos en la membrana sinovial y promover por lo tanto, la generación de más citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Debido a lo anterior, existe un aumento en la activación del NF- κ B tanto en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide como en el líquido sinovial de modelos experimentales de artritis, y su inhibición contribuye a reducir la inflamación en dicha enfermedad (Yue *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2011; Watson y Preedy, 2013; Robert y Miossec, 2019).

La inmunidad humoral es también muy importante. La sinovitis reumatoide se caracteriza por la infiltración de linfocitos B y células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los dos principales auto anticuerpos son el factor reumatoide (FR) y el anti péptido citrulinado cíclico. El factor reumatoide se dirige contra epítopes localizados en el fragmento Fc de la IgG (Watson y Preedy, 2013). En el curso de la enfermedad, las especies reactivas de oxígeno, liberadas durante la fagocitosis por neutrófilos, monocitos y macrófagos, causan estrés oxidante, mediando la destrucción del cartílago y contribuyendo a la sinovitis proliferativa (Sansaricq *et al.*, 2015). Entre los biomarcadores más utilizados en artritis reumatoide están los auto anticuerpos: factor reumatoide (FR), anti-péptidos citrulinados y anti-colágeno tipo II (López *et al.*, 2002; Sanmartí y Gómez, 2011).

Hasta ahora, los tratamientos con antiinflamatorios no esteroideos y con otros medicamentos antiinflamatorios, han sido el único escape que los pacientes con artritis reumatoide han encontrado para aliviar su dolor. Pero todos estos medicamentos tienen efectos secundarios adversos, por lo que hay una constante búsqueda de compuestos que contribuyan a aliviar los síntomas de la enfermedad,

sin que ocasionen estos efectos secundarios dañinos para el organismo (Watson y Preedy, 2013).

2.3. AGENTES ANTIOXIDANTES, ANTIINFLAMATORIOS Y ANTIARTRÍTICOS

Existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante, cada uno de ellos teniendo ventajas y desventajas, por lo que generalmente se hace uso de dos o más métodos para complementar la investigación. Algunos de estos procedimientos utilizan radicales sintéticos, mientras que otros utilizan radicales fisiológicos, siendo probados estos últimos en células animales o vegetales. Algunos tienen un alcance más amplio, mientras que otros son más limitados, pero requieren de menos instrumentación y tiempo para ser realizados. En los últimos años se han utilizado métodos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante *in vitro* en alimentos y extractos, siendo los más utilizados el ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil) y TAC (capacidad antioxidante total). Ambos, el DPPH y el ABTS se basan en mecanismos de aceptación de hidrógenos y electrones para estabilizar al radical sintético, teniendo la diferencia de que ABTS cuantifica moléculas lipofílicas e hidrofílicas, mientras que DPPH cuantifica mayormente moléculas lipofílicas (Floegel *et al.*, 2011; Carocho y Ferreira, 2013), mientras que TAC se basa en la reducción del Mo (VI) a Mo (V), causada por un agente reductor, con la subsecuente formación de un complejo verde de fosfato/Mo(V) a pH ácido, y al igual que ABTS cuantifica moléculas tanto lipofílicas como hidrofílicas (Prieto *et al.*, 1999).

Por otro lado, la actividad antiinflamatoria de los extractos o las sustancias se determina utilizando varios métodos como el edema plantar inducido por carragenina y el edema auricular inducido por TPA (tetradecanoil forbol acetato), que son modelos de inflamación aguda. El más utilizado es el edema inducido por carragenina, debido a que este modelo en la pata de la rata presenta un perfil bifásico durante la reacción inflamatoria, que alcanza rápidamente su nivel máximo en pocas horas (1-3 h) y mantiene este nivel hasta por 6 h. En intervalos de 2 a 6 h,

las prostaglandinas son los principales mediadores de la inflamación. La respuesta vascular se hace máxima y estable entre las 4 y 8 h, periodo adecuado para el ensayo de agentes antiinflamatorios (Sugishita *et al.*, 1981; Young y De Young, 1989).

Finalmente, de entre los métodos para evaluar la capacidad antiartrítica de los extractos vegetales u otras sustancias, se ha demostrado que la artritis inducida por colágeno tipo II, un modelo experimental de artritis autoinmune en ratas, exhibe características histológicas, inmunológicas y clínicas, además de un vínculo genético, muy similares con la artritis reumatoide humana. El daño en las articulaciones en este modelo se caracteriza por sinovitis inflamatoria, generación de auto anticuerpos, formación de pannus y erosión de los cartílagos y los huesos (Song *et al.*, 2015; Uotsu *et al.*, 2016).

La respuesta inmune ocasionada por el colágeno tipo II y el subsecuente desarrollo de la artritis está relacionado con el RT1, localizado en el complejo mayor de histocompatibilidad de la rata. Se pueden utilizar diferentes tipos de colágeno tipo II, siendo los de porcino, bovino y pollo los más comunes. Para la inducción de artritis el colágeno se inyecta en conjunto con el adyuvante de Freund, ya sea el incompleto o el completo, este último diferenciándose del primero por contener *Mycobacterium* y teniendo la desventaja de poder producir severas infecciones indeseables en los animales durante el experimento (Song *et al.*, 2015).

2.3.1. Antioxidantes y antiinflamatorios de origen vegetal

Los antioxidantes naturales se distribuyen ampliamente en alimentos y plantas medicinales tales como frutos, vegetales, cereales, especias, etc. Éstos, especialmente los polifenoles, los terpenos y las vitaminas exhiben una amplia gama de efectos biológicos incluyendo antiinflamatorios y anticancerígenos (Carocho y Ferreira, 2013; Xu *et al.*, 2017). Los compuestos de estos grupos químicos son producidos en plantas de diversas familias como la Lauraceae (Hsiang

et al., 2013), Rosaceae (Gasparrini et al., 2017), Rubiaceae (Aro et al., 2016), Clusiaceae (Dost et al., 2009), entre otras (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ejemplos de plantas con actividad antioxidante y antiinflamatoria.

Planta	Modelo Experimental	Resultados	Referencia
<i>Garcinia kola</i>	Colitis en ratas	Disminuye el daño en el colón y aumentó las enzimas antioxidantes	Dost et al., 2009
<i>Zingiber officinale</i>	Colitis en ratas	Disminuye la actividad de NF- κ B y de IL-1	Hsiang et al., 2013
<i>Psychotria capensis</i>	DPPH e inhibición de óxido nítrico en macrófagos activados por LPS	Disminuye en un 86% el óxido nítrico y tuvo un IC ₅₀ de 29.73 μ g/mL para DPPH	Aro et al., 2016
<i>Lycium barbarum</i>	DPPH y edema inducido por carragenina en ratas	Tuvo un valor de actividad antioxidante de 56.1% y disminuye en un 64% el edema	Nardi et al., 2016
<i>Fragaria x ananassa</i>	Macrófagos activados por LPS	Tiene efecto antioxidante y antiinflamatorio a través de la activación del Nrf2	Gasparrini et al., 2017
<i>Typha capensis</i>	Macrófagos activados por LPS y DPPH	Disminuye la lipooxigenasa con un valor de IC ₅₀ para DPPH de 7.11 μ g/mL	Ondua et al., 2019

2.3.2. Antiartríticos de origen vegetal

Dado los modestos resultados de la terapia farmacológica actual para tratar la artritis reumatoide, así como los efectos secundarios dañinos asociados, ha habido un creciente interés en el uso de sustancias de origen vegetal para aliviar los síntomas de esta enfermedad. Ciertos metabolitos secundarios como los de tipo fenólico, terpénico, entre los principales, han mostrado actividad antiartrítica (Watson y Preedy, 2013). Se han reportado metabolitos de diversas familias de plantas como la Fabaceae (Suresh *et al.*, 2012), Zingiberaceae (Zheng *et al.*, 2015), Rosaceae (Schell *et al.*, 2017) y Lauraceae (Lee *et al.*, 2016), los que han sido probado con efecto terapéutico durante la artritis (Cuadro 2).

2.4. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y vegetales. Son una clase muy importante de metabolitos secundarios en las plantas, y en su mayoría son derivados de la fenilalanina y en menor medida de la tirosina, vía síntesis de la ruta del ácido shiquímico y fenilpropanoides. Se han identificado más de 8000 de estas biomoléculas, cuya estructura química consiste en un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo como sustituyentes, incluyendo a sus derivados funcionales (ésteres, glucósidos, etc.) (Ganesan y Xu, 2017).

Están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal (sabor, color y astringencia), además intervienen como antioxidantes naturales, cuya propiedad se debe a que presentan grupos hidroxilo unidos al anillo aromático, otorgándoles su capacidad para actuar como agentes reductores, como quelantes de metales (hierro y cobre), como donadores de hidrógeno e incluso como estabilizadores de radicales libres. Se ha observado que también pueden activar enzimas antioxidantes, inhibir oxidasas, mitigar el daño nitrosativo y elevar los niveles de ácido úrico (Carocho y Ferreira, 2013; Ganesan y Xu, 2017).

Cuadro 2. Ejemplos de plantas con actividad antiartrítica.

Planta	Modelo	Efecto	Referencia
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Artritis inducida por adyuvante de Freund en ratas	Disminuye significativamente el edema de la pata, además de mantener parámetros sanguíneos y niveles de enzimas antioxidantes casi normales. Redujo significativamente la presencia de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 y TNF- α .	Suresh <i>et al.</i> , 2012
<i>Curcuma longa</i>	Artritis inducida por adyuvante de Freund en ratas	Bloquea la activación de NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , e IL-6 en el líquido sinovial e inhibe síntesis de prostaglandinas	Zheng <i>et al.</i> , 2015
<i>Fragaria</i> $\times$ <i>ananassa</i>	Pacientes con osteoartritis de rodilla establecida.	El consumo de fresa disminuye significativamente la inflamación y la degradación del cartílago, además de reducir los niveles de IL-6, IL-1 β y de metaloproteinasas de matriz.	Schell <i>et al.</i> , 2017
<i>Cinnamomum cassia</i>	Artritis inducida por adyuvante de Freund en ratas.	Reduce significativamente la inflamación, así como los niveles de IL-1 β y TNF- α	Sharma <i>et al.</i> , 2018

Además, este tipo de compuestos tienen diversas propiedades biológicas como la actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antiartrítica. Hay compuestos que tienen esta actividad por su capacidad para inhibir enzimas como la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa, por reducir los niveles de citocinas proinflamatorias, por disminuir la infiltración de neutrófilos y macrófagos, y por inactivar al NF- κ B en fibroblastos

sinoviales (Bowen-Forbes *et al.*, 2010; Watson y Preedy, 2013; Li *et al.*, 2015; Azab *et al.*, 2016; Hughes *et al.*, 2017). Los polifenoles se dividen en cuatro categorías basadas en la presencia de grupos fenólicos y elementos estructurales: flavonoides, estilbenos, lignanos y ácidos fenólicos (Ganesan y Xu, 2017). En el cuadro 3, se muestran diversos ejemplos de compuestos fenólicos derivados de plantas con actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica.

Cuadro 3. Ejemplos de compuestos fenólicos derivados de plantas con actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica.

Compuesto fenólico	Actividad biológica	Modelo	Resultado	Referencia
Naringenina	Antioxidante y antiinflamatoria	Macrófagos activados por LPS	Disminuye los niveles de óxido nítrico y actividad de COX-2	Chao <i>et al.</i> , 2010
Resveratrol	Antiinflamatoria y antiartrítica	Fibroblastos sinoviales reumatoides	Inhibe citocinas proinflamatorias y disminuye la generación de metaloproteinasas	Tian <i>et al.</i> , 2013
Curcumina	Antiinflamatoria y antiartrítica	Artritis inducida por adyuvante	Reduce los niveles de citocinas proinflamatorias en suero	Zheng <i>et al.</i> , 2015
Ácido ferúlico	Antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica	Artritis inducida por cristales de urato mono sódico	Aumenta la actividad de enzimas antioxidantes y disminuye el edema	Doss <i>et al.</i> , 2016

2.4.1. Mecanismos de acción de compuestos fenólicos de origen vegetal

Sustancias derivadas de plantas con actividad antioxidante que pueden modular la inflamación tienen gran potencial para ser usadas como agentes terapéuticos en la artritis reumatoide. De entre ellos, en la literatura se ha reportado el mecanismo de acción de los compuestos fenólicos. Éstos pueden actuar directamente secuestrando especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno o aumentando indirectamente la expresión de genes de moléculas antioxidantes como glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa, catalasa, entre otras. Esto último lo logran al activar al factor nuclear eritroide 2 (Nrf2), el cual es un factor de transcripción nuclear que tiene un papel muy importante en la respuesta antioxidante y en la regulación de la inflamación (Watson y Preedy, 2013).

Se ha demostrado que casi todos los mediadores inflamatorios relacionados con la artritis, son regulados por NF-kB, reportándose además en diversas investigaciones que los compuestos fenólicos pueden inhibir la activación y translocación en el núcleo de este factor transcripcional. Es importante mencionar también que otros elementos involucrados en procesos inflamatorios como el activador de la proteína 1, las proteínas STAT y varias cinasas han sido moduladas por varios polifenoles (Watson y Preedy, 2013) (Figura 1).

2.5. ANTECEDENTES DIRECTOS

El género *Potentilla* ha sido conocido desde tiempos antiguos por su valor decorativo y sus propiedades curativas. Extractos de las partes aéreas han sido utilizados por la medicina tradicional y han exhibido actividad antioxidante, hipoglucémica, antiinflamatoria, antitumoral y antidiabética. La mayoría de estos efectos biológicos pueden ser explicados por presentar gran cantidad de taninos hidrolizables, flavonoides y terpenos. Varios polifenoles han sido identificados como el ácido elágico y derivados glicosilados de flavonoles (Wang *et al.*, 2013).

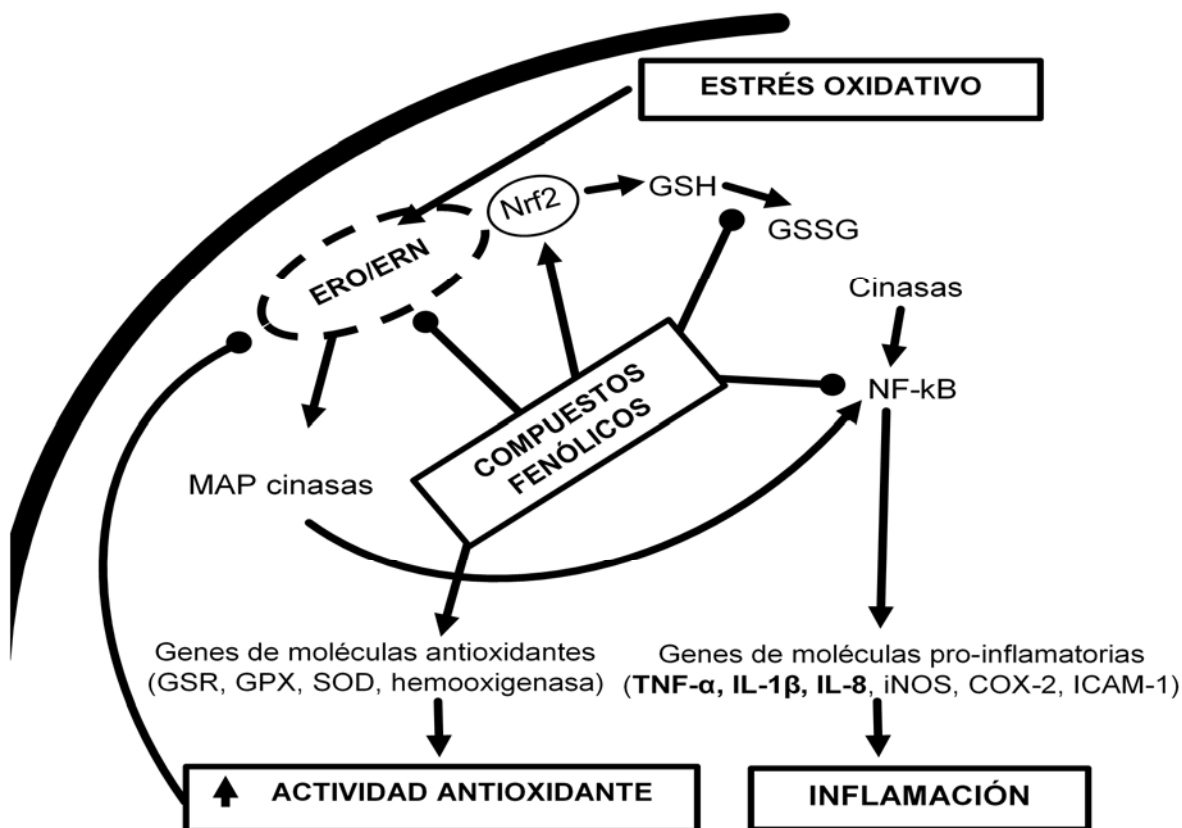


Figura 1. Mecanismo de acción de los compuestos fenólicos en procesos inflamatorios. Las flechas indican activación, mientras que los puntos indican inhibición (tomada y modificada de Watson y Preedy, 2013)

Las partes más estudiadas en las especies de *Potentilla* son las aéreas (hojas y tallos), siendo los frutos en específico muy poco estudiados. Los solventes más utilizados para la extracción de los compuestos bioactivos son el metanol, etanol, acetona y agua, extractos a los que se les ha probado su capacidad antioxidante *in vitro*, la cual ha sido dependiente de la concentración. En los extractos derivados de plantas de *P. fruticosa*, *P. glabra* y *P. parvifolia*, se han reportado valores de 16.87, 19.37 y 23.87 $\mu\text{g/mL}$ de IC_{50} , por el método de DPPH, indicativo de la alta actividad antioxidante. En ensayos de la actividad antiinflamatoria, las concentraciones y dosis utilizadas en los diferentes modelos depende de cada extracto o especie, los extractos de *P. recta* han sido probados en un modelo de inflamación aguda, en dosis tópica de 10 mg/oreja, teniendo un valor de actividad antiinflamatoria de 61.37% (Tomczyk *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Paduch *et al.*, 2015; Tomovic *et al.*, 2015).

Los extractos de estas plantas han mostrado ser seguros al no presentar efectos tóxicos sobre la salud de los seres humanos, sin embargo, son necesarios más estudios farmacológicos para confirmar la eficiencia y el potencial de estos extractos. Éstos pueden convertirse en fuentes importantes de medicamentos para distintas enfermedades (Tomczyk *et al.*, 2010).

2.5.1. *Potentilla indica* (Andr.) Focke

Potentilla indica es una planta perenne estolonífera (estolones delgados de aprox. 100 cm de largo) originaria de Asia perteneciente a la familia Rosaceae que presenta sinonimia con *Fragaria indica* Andr., su nombre común es “falsa fresa” (Figura 2). Se caracteriza por ser una planta verde, de hojas seríceas y estrigosas, con flores amarillas, hojas alternas estipuladas y frutos rojos, los cuales son ovoides o globosos de 1 a 1.5 cm de diámetro y de largo (Calderón de Rzedowski, 2001; Xiang-Hui *et al.*, 2012) (Figura 2).



Figura 2. *Potentilla indica*: A) Frutos, B) Parte aérea, C) Flor (foto de autoría propia).

Se ha demostrado que los extractos fenólicos de esta planta, pero provenientes de planta completa (tallo, raíces y hojas), inhiben significativamente la proliferación de células de cáncer de ovario SKOV-3 y de cáncer de cuello uterino (Peng *et al.*, 2008;

Peng *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que muestra actividad antioxidante (Kim *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011; Xiang-Hui *et al.*, 2012), inmunomoduladora (Ang *et al.*, 2014) y actividad antiinflamatoria (Yang *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2012), en particular ésta última, suprimiendo citocinas proinflamatorias y mediadores, al bloquear la activación del NF-kB (Zhao *et al.*, 2008). De estos extractos, se han aislado varios compuestos químicos como triterpenos, glucósidos triterpénicos, esteroides y polifenoles. Entre los polifenoles se han obtenidos ácidos fenólicos como el ácido elágico y flavonoides (Lee *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2015).

Particularmente en el fruto se han identificado antocianinas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de matriz de fotodiodos y espectrometría de masas (Qin *et al.*, 2009), sin embargo, no se han realizado estudios en los frutos de *P. indica* que relacionen el contenido de compuestos fenólicos con la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica.

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas producen una diversa cantidad de compuestos que pueden contribuir con la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica, por lo que es importante realizar estudios que confirmen estas propiedades, así como identificar los compuestos activos.

Los frutos y otras partes de la planta de *Potentilla indica* (falsa fresa) y otras especies cercanas, son utilizadas en la medicina tradicional de Asia, para el tratamiento de diversas enfermedades, algunas en las que intervienen procesos inflamatorios, sin embargo, son necesarias investigaciones que confirmen su actividad antiinflamatoria y relacionar ésta con la actividad antiartrítica. Es por ello, que se consideró realizar estudios de sus frutos, encaminados a determinar su actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica, relacionando estas propiedades con el contenido de compuestos fenólicos.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos de los extractos de frutos de *Potentilla indica* (falsa fresa) son los responsables de la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica.

5. OBJETIVOS

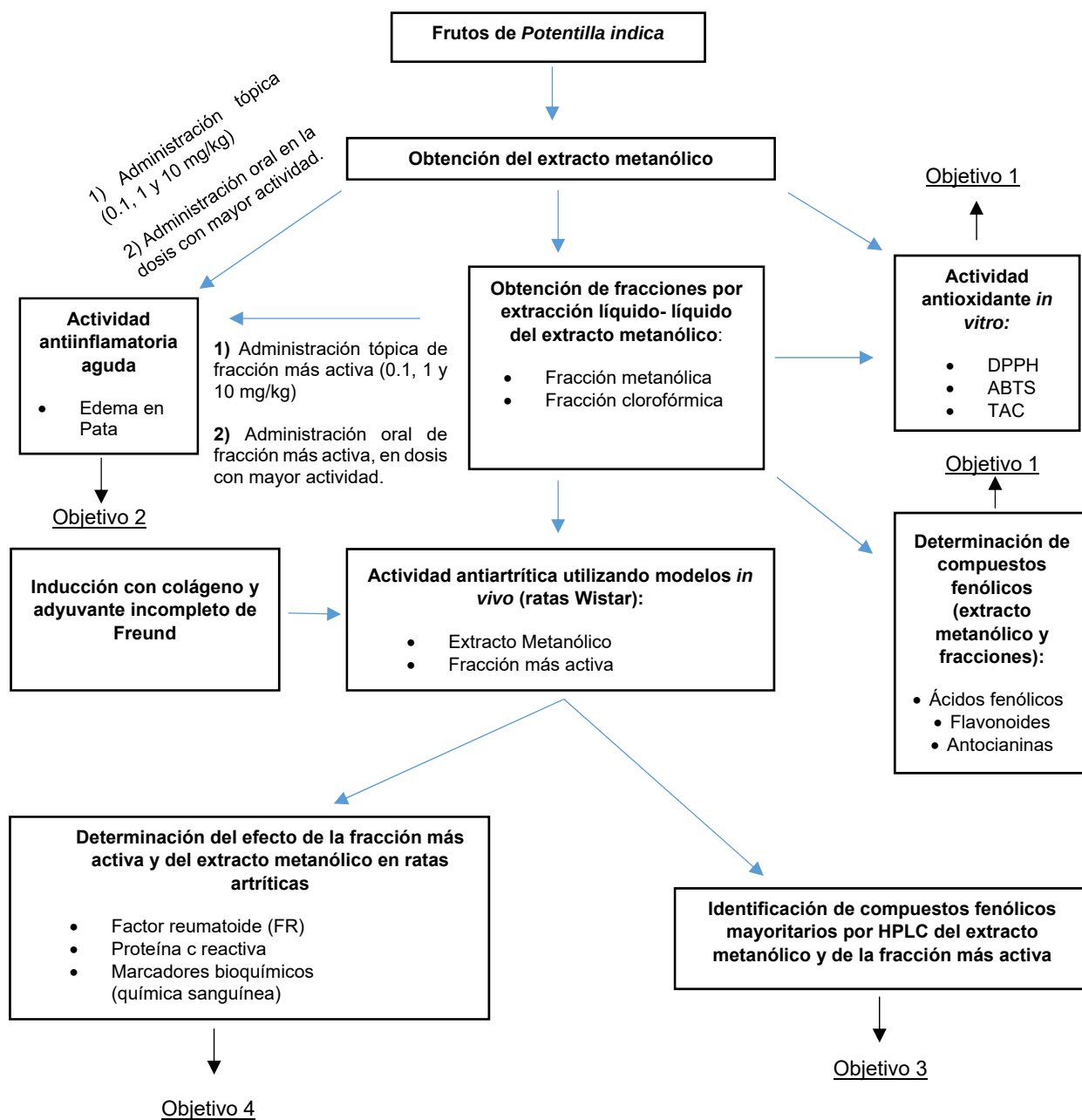
5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica de los frutos maduros de *Potentilla indica* (falsa fresa) y su relación con el contenido de compuestos fenólicos.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Evaluar la actividad antioxidante y determinar el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas totales en el extracto metanólico de frutos de falsa fresa (*P. indica*) y en las fracciones metanólica y clorofórmica.
2. Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de frutos de falsa fresa (*P. indica*) y de la fracción más activa.
3. Identificar los compuestos fenólicos mayoritarios del extracto metanólico y de la fracción más activa (tanto antioxidante como antiinflamatoria) de los frutos de falsa fresa.
4. Evaluar la actividad antiartrítica del extracto metanólico de frutos de falsa fresa (*P. indica*) y de la fracción más activa.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. CAPÍTULO I. Relación de la actividad antioxidante del extracto metanólico de frutos de “falsa fresa” (*Potentilla indica*) con el contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas.

RESUMEN

La planta completa (tallos, hojas y raíces) de *Potentilla indica* o “falsa fresa” ha sido usada en la medicina tradicional de Asia y exhibe actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica. Sin embargo, se desconocen estas propiedades en frutos y el contenido de los compuestos bioactivos presentes en los mismos. En este estudio se analizó la actividad antioxidante del extracto metanólico de los frutos de *P. indica* y dos de sus fracciones (fracción metanólica y fracción clorofórmica) con antioxidantes sintéticos, comparando ésta con el contenido total de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas, cuantificados por métodos espectrofotométricos. Aunque el extracto metanólico crudo presentó el contenido más alto de flavonoides totales con 14.525 μ moles Eq. Quercetina/g peso fresco, no mostró una alta actividad antioxidante. La fracción clorofórmica presentó la actividad antioxidante más alta por los tres métodos empleados, las cuales fueron de 67.90%, 67.25% y 44.51% para TAC, DPPH y ABTS, respectivamente. Los valores más altos de ácidos fenólicos totales (0.615 μ moles Eq. Ácido Gálico/g peso fresco) y antocianinas totales (0.0028 mg Eq. Cianidina/mg de extracto) se relacionan directamente con la actividad antioxidante.

Palabras clave: Actividad antioxidante, ácidos fenólicos, antocianinas, falsa fresa, flavonoides, *Potentilla indica*.

ABSTRACT

Whole plant (stems, leaves and roots) of *Potentilla indica* or “mock strawberry” has been used in traditional Asian medicine and exhibits antioxidant, antiinflammatory and cytotoxic activities, however, little is known about these properties and the content of bioactive compounds present in the fruit. This study analyzed the antioxidant activity *in vitro* of methanolic extract of *P. indica* fruits and two of its fractions (methanolic fraction and chloroformic fraction) and comparing the antioxidant activity with the total content of phenolic acids, flavonoids and anthocyanins, quantified by spectrophotometric methods. Although the methanol crude extract presented the highest content of total flavonoids with 14.525 micromol Eq. Quercetin/g weight fresh, it did not show a high antioxidant activity. The highest antioxidant activity was detected in the chloroform fraction in the three methods used, which were of 67.90%, 67.25% and 44.51% for TAC, DPPH and ABTS, respectively. The highest values of total phenolic acids (0.615 micromoles Eq. Acid

Gallic/g fresh weight) and total anthocyanins (0.0028 mg Eq. Cyanidin/mg of extract) are directly related to the antioxidant activity.

Keywords: Anthocyanins, antioxidant activity, flavonoids, phenolic acids, mock strawberry, *Potentilla indica*.

INTRODUCCIÓN

Las especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo causan daño a estructuras celulares y biomoléculas (lípidos, carbohidratos, proteínas y ADN), cuando son producidas de manera excesiva, lo que se conoce como estrés oxidante. Éste es disminuido por diferentes moléculas antioxidantes, que pueden ser endógenas y exógenas a nuestro organismo, entre éstas últimas están las de origen vegetal, que son altamente efectivas ya que actúan secuestrando y estabilizando especies reactivas de oxígeno (Cheung *et al.*, 2003). Los antioxidantes provenientes de frutos han sido utilizados como alternativa al uso de los antioxidantes sintéticos (BHT, TROLOX), los que tienen la desventaja de desencadenar efectos secundarios o detonantes de enfermedades como el cáncer (Goli *et al.*, 2005). Las frutillas o frutos rojos como la fresa, el arándano, las moras y la zarzamora, entre otras, son considerados como alimentos funcionales y nutracéuticos debido a una alta actividad antioxidante, lo cual se ha relacionado principalmente con el contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos libres, flavonoides, taninos y antocianinas) (Cheel *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2012). La actividad antioxidante de este grupo de compuestos se ha demostrado con métodos *in vitro* como el ABTS, DPPH, TAC y FRAP, utilizados por ser simples, precisos y rápidos, no obstante, tienen la limitación de que no usan radicales fisiológicos (Floegel *et al.*, 2011).

Aunque los compuestos fenólicos son obtenidos de fuentes vegetales por distintos disolventes, el rendimiento y la obtención de los diferentes grupos de fenoles dependen del contenido, de la polaridad y de la solubilidad de éstos. Los disolventes más utilizados son los de naturaleza polar o de polaridad intermedia como el agua, etanol, metanol, acetona, acetato de etilo y cloroformo (Sun y Ho, 2005; Goli *et al.*,

2005). Cabe resaltar que las extracciones múltiples y el fraccionamiento de extractos, ofrecen mayores rendimientos que una simple extracción. Es importante mencionar, además, que la solubilidad de los compuestos fenólicos no se define únicamente por su grado de polimerización, sino también por la naturaleza del disolvente y las interacciones de los polifenoles con otros constituyentes de la planta, que dan como resultado la formación de complejos insolubles (Saada *et al.*, 2018). En diversas investigaciones se ha comprobado que el agua es el mejor disolvente en la extracción de catequinas de té (*Camellia sinensis*), comparado con el metanol al 80% y el etanol al 70% (Khokhar y Magnusdottir, 2002). Así mismo, las fracciones de acetato de etilo y cloroformo de diversos extractos, han mostrado un mayor contenido de ácidos fenólicos totales y flavonoides totales que los extractos crudos, como los obtenidos en las fracciones del extracto etanólico de hojas de pistache (*Pistacia atlantica*) (Somayeh *et al.*, 2017).

Es por ello, que se han utilizado diferentes disolventes y métodos de extracción para el análisis de la composición y las propiedades antioxidantes de los frutos rojos, el más común es el metanol por maceración, que aunque es un proceso lento, es el que da un mayor rendimiento de compuestos antioxidantes y a bajo costo (Snoussi *et al.*, 2012).

Potentilla indica (Andr.), planta conocida como falsa fresa, es una planta perteneciente a la familia Rosaceae, utilizada en la medicina tradicional china, por sus propiedades antiinflamatorias, citotóxicas, antibióticas y antioxidantes (Hu *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2011). Es una especie de reciente introducción y distribución en México, por lo que las propiedades de sus frutos no han sido ampliamente estudiadas, principalmente se desconoce el contenido de compuestos fenólicos y su relación con la actividad antioxidante. No obstante, se sabe que tallos y hojas de algunas especies de *Potentilla*, poseen alta actividad antioxidante debido a su alto contenido de compuestos fenólicos (Qiao *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2015). Con el propósito de determinar las propiedades antioxidantes de este tipo de frutos y su relación con los componentes bioactivos, en la presente

investigación se determinó la actividad antioxidante *in vitro* de frutos maduros de *P. indica*, así como el contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas).

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos maduros de *P. indica*. Los frutos de *P. indica* se obtuvieron de plantas cultivadas en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Después de la colecta, fueron almacenados a -20°C.

Obtención del extracto. Los frutos de *P. indica* fueron pulverizados con nitrógeno líquido en licuadora comercial. La extracción se realizó por maceración con metanol en frío (4°C durante cinco días en oscuridad), por cada 100 g de frutos pulverizados, se añadieron 1000 mL de metanol frío. Para la obtención del extracto, el macerado se filtró en embudo con papel Whatman No.1, descartando el material vegetal, sometiendo el extracto a evaporación a sequedad en rotavapor (45°C) al vacío. El extracto fue disuelto en metanol a una concentración de 100 mg/mL, el cual fue almacenado en congelación y oscuridad hasta sus diferentes análisis.

Fraccionamiento. Las fracciones se obtuvieron por extracción líquido-líquido del extracto metanólico, separando dos fracciones: fracción clorofórmica (F.CHCl₃) y fracción metanólica (F.MetOH). Para la separación se utilizó un embudo de separación. Finalmente, las fracciones fueron evaporadas a sequedad en rotavapor (45°C) y disueltas en el disolvente correspondiente a una concentración de 100 mg/mL.

Determinación de actividad antioxidante. La actividad antioxidante del extracto metanólico y de las fracciones se determinó por los métodos DPPH, ABTS y Capacidad Antioxidante Total (TAC) a una concentración de 1 mg/mL, los que se describen a continuación:

Método DPPH. La actividad antioxidante se evaluó con base en la capacidad de eliminar el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de acuerdo al método descrito por Karamać *et al.* (2005). Las absorbancias se tomaron a una λ de 517 nm. Se mezclaron 50 μ L de cada muestra con 950 μ L de la solución de DPPH en metanol (0.5 mmol/L), posteriormente se dejaron incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 min, para finalmente obtener las absorbancias en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). El porcentaje de capacidad de eliminación de radicales libres se calculó mediante la ecuación 1. Donde A_{muestra} es la absorbancia del DPPH mezclado con la muestra y A_{blanco} es la absorbancia del DPPH en donde la muestra ha sido reemplazada con metanol.

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Método ABTS. Se evaluó la actividad antioxidante utilizando el método del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés) descrito por Arnao *et al.* (2001). Éste se basa en la reducción de la coloración verde/azul del radical (ABTS•+) debido a su reacción con el antioxidante presente en la muestra. La solución del radical ABTS se preparó mezclando ABTS (7.4 mM) y persulfato de potasio (2.6 mM), en una relación 1:1, dejando la mezcla durante 12 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se mezclaron 50 μ L de cada muestra con 950 μ L de la solución del radical ABTS, se dejaron incubar durante 7 min en oscuridad, y finalmente las absorbancias se tomaron a una λ de 737 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). El porcentaje de capacidad de eliminación de radicales libres se calculó mediante la ecuación 2. Donde A_{muestra} es la absorbancia del ABTS mezclado con la muestra y A_{blanco} es la absorbancia del ABTS sin la muestra.

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \frac{(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}} \times 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Método de Capacidad Antioxidante Total (TAC). La actividad antioxidante también fue determinada por el método de fosfomolibdeno, de acuerdo a lo descrito por Prieto *et al.* (1999). El ensayo se basa en la reducción de Mo (VI) a Mo (V) debido a la presencia del antioxidante, y la subsecuente formación de un complejo verde de fosfato/Mo(V) a pH ácido. Se mezclaron 100 µL de cada muestra con 1 mL de la solución reactivo (ácido sulfúrico 0.6 M, fosfato de sodio 28 mM y molibdato de amonio 4 mM). Posteriormente las mezclas se incubaron en un baño de agua hirviendo a 95°C durante 90 min, para después ser enfriadas a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de la solución de cada muestra a 695 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). La actividad antioxidante se calculó mediante la ecuación 3. Donde Amuestra es la absorbancia de la muestra mezclada con la solución reactivo, Ablanco es la absorbancia de la solución reactivo mezclada con el disolvente de la muestra y Acontrol es la absorbancia de la solución reactivo mezclado con agua.

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = \left(\frac{(\text{Amuestra} - \text{Acontrol})}{\text{Ablanco}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Determinación de IC₅₀. La concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) de la actividad antioxidante fue determinada para la fracción con mayor porcentaje de capacidad antioxidante por los métodos DPPH y TAC, realizando una curva de calibración en concentraciones de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 mg/mL (anexo 11.1 y 11.2).

Determinación de compuestos bioactivos. El extracto metanólico de los frutos de *P. indica* y las fracciones fueron analizados para la determinación de ácidos fenólicos totales, flavonoides totales y antocianinas totales a una concentración de muestra de 1 mg/mL:

Determinación de ácidos fenólicos totales. El contenido de ácidos fenólicos totales se determinó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Schwarz *et al.*, 2001), que consistió en mezclar 100 µL de cada muestra con 750 µL de la solución de Folin-Ciocalteu, preparada 1:10 con agua estéril. Las mezclas resultantes se e agua

estéril. Posteriormente, las mezclas se dejaron reposar por 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad, para finalmente obtener las lecturas de absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). Los resultados se muestran en μ moles equivalentes de ácido gálico por miligramo de peso fresco (μ moles de ácido gálico/mg peso fresco), los cuales se obtuvieron a través de una curva de calibración que se preparó usando concentraciones de ácido gálico como estándar entre 0 y 1 μ moles (anexo 11.3).

$$X = \frac{Y + 0.0016}{6.1652} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Determinación de flavonoides totales. Para la determinación de flavonoides totales se utilizó el método de Kim *et al.* (2003), que consiste en mezclar 10 μ L de cada muestra con 490 μ L de metanol, sometiendo la mezcla a agitación en vortex, para posteriormente agregar 1 mL de metanol, 100 μ L de cloruro de aluminio al 10% y 100 μ L de acetato de potasio al 1 M. Las muestras se sometieron a agitación en vortex y se dejaron reposar por 30 min en oscuridad, para finalmente obtener las lecturas de absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro (UV-Vis VELAB-VE51000UV). La cuantificación se obtuvo mediante una curva de calibración que se realizó con quercetina, con un rango de concentración de 0 a 100 μ moles (anexo 11.3). Los resultados se presentaron en equivalentes de μ moles de quercetina/mg peso fresco.

$$X = \frac{Y + 0.0114}{0.016} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Determinación de antocianinas totales. El contenido de antocianinas fue determinado por el método de Fuleki y Francis (1968), que cuantifica antocianinas totales con equivalente a cianidina, mediante análisis espectrofotométrico.

El método consiste en mezclar 100 μ L de muestra con 900 μ L de metanol/HCl 37% (99:1v/v) y posteriormente agitar en vortex, para finalmente dejar reposar por

escasos minutos. La absorbancia de cada muestra se determinó a 535 nm (λ), absorbancia máxima de la cianidina, a partir de ésta se calculó la concentración de antocianinas totales expresada en equivalentes de cianidina (mg/mL de extracto), mediante la siguiente fórmula:

$$mg/mL = \frac{(absorbancia\ máxima\ en\ nm)(PM)}{\epsilon}$$

Dónde: ϵ es el coeficiente de extinción molar de cianidina (32000), en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud y PM es el peso molecular de la cianidina. Los resultados se presentaron en mg Eq. Cianidina/mg de extracto, debido a que se utilizó una concentración de muestra de 1 mg/mL.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se expresaron a través de la media $\pm$ desviación estándar. Los mismos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se utilizó el software JMP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antioxidante de frutos maduros de *P. indica*

Existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante de extractos vegetales, los que son desarrollados tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque unos pocos son los más utilizados por sus características de fácil aplicación, confiabilidad y que se realizan en un tiempo relativamente corto (Huang *et al.*, 2012; Alam *et al.*, 2013; Shalaby y Shanab, 2013). Tal es el caso de los métodos DPPH, ABTS y TAC utilizados en la presente investigación para evaluar la actividad del extracto metanólico y las fracciones derivadas de éste, obtenido de frutos maduros de *Potentilla indica*, utilizando una concentración de la muestra de 1 mg/mL.

Con el ensayo de Capacidad Antioxidante Total (TAC), se observaron porcentajes de actividad antioxidante mayores al 45%, la fracción clorofórmica (F.CHCL₃) presentó un 67.90 ± 1.37 %, seguida por el extracto metanólico crudo (E.MetOH) con 52.39 ± 1.15 %, la actividad antioxidante de la fracción metanólica (F.MetOH) presentó el valor más bajo con un 47.01 ± 0.75 %. La fracción clorofórmica fue la que mostró una capacidad antioxidante similar al butilhidroxitolueno (BHT), antioxidante sintético utilizado a una concentración de 1 mg/mL (Figura 3A).

La actividad antioxidante del extracto y de ambas fracciones, también fue determinado por el método 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), observando también que la fracción clorofórmica (F.CHCL₃) mostró el porcentaje más alto con 67.25 ± 1.84 %, seguido del extracto metanólico crudo (E.MetOH) con 48.82 ± 0.86 %, también con este método, la fracción metanólica (F.MetOH) presentó la menor actividad antioxidante (22.501 ± 2.01 %). Tanto la fracción clorofórmica como el extracto metanólico mostraron mayor capacidad antioxidante que el BHT a la misma concentración probada, sin embargo, teniendo éstas menor actividad antioxidante que el TROLOX (91.13%), este último utilizado a concentración de 1 mg/mL (Figura 3B).

Finalmente, el extracto y las fracciones fueron analizadas con el método 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato (ABTS), en donde la fracción clorofórmica (F.CHCL₃) también tuvo el porcentaje más alto de actividad antioxidante con 44.51 ± 0.70 %, seguido del extracto metanólico crudo (E.MetOH) con 33.88 ± 1.13 %, y al igual que con el método DPPH, la fracción metanólica (F.MetOH) presentó la menor actividad antioxidante con 26.46 ± 0.47 %. Con este método, aunque la fracción clorofórmica tuvo la capacidad antioxidante más alta, ésta fue más baja que la mostrada por el BHT (97.2 ± 0.66 %) a 1 mg/mL (Figura 3C).

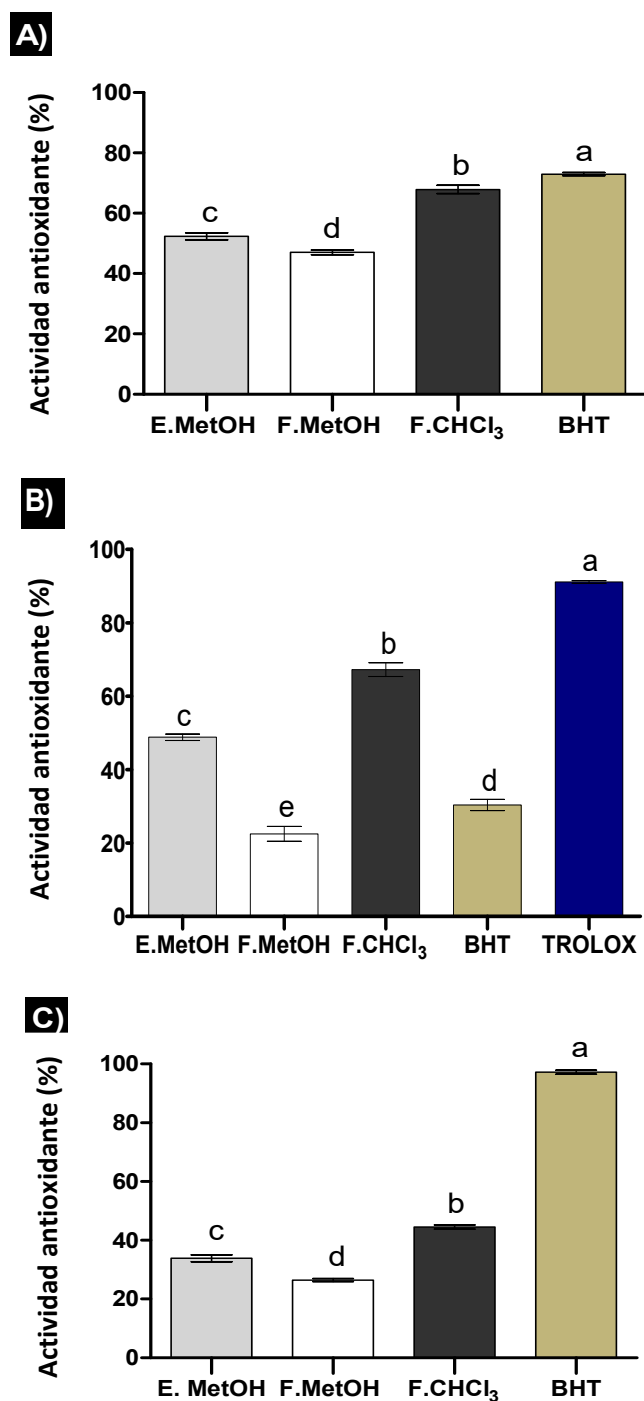


Figura 3. Porcentajes de la actividad antioxidante del extracto metanólico (E.MetOH) de los frutos de *Potentilla indica* y las fracciones metanólica (F.MetOH) y clorofórmica (F.CHCl₃), determinados por los métodos: A) TAC, B) DPPH y C) ABTS. Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

La actividad antioxidante de *P. indica* no se ha reportado para los frutos, únicamente se ha demostrado para la parte completa, con un porcentaje de eliminación del radical anión superóxido de 46.21% a una concentración de 1 mg/mL (Hu *et al.*, 2009). Sin embargo, se ha determinado la actividad antioxidante de frutos de otras plantas de la familia Rosaceae como fresa (*Fragaria x ananassa*) y zarzamora (*Rubus sp.*), con porcentajes similares a los observados en los frutos de *P. indica*.

Huang *et al.* (2012) reportaron la capacidad antioxidante por el método DPPH de extractos metanólicos de frutos de *Rubus laciniatus* y *Fragaria x ananassa* a una concentración de 1 mg/mL, los cuales tuvieron porcentajes de actividad antioxidante de 80% y 50%, respectivamente. Valores similares de DPPH son presentados por los extractos metanólicos de frutos de fresa comercial (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) y fresa silvestre (*Fragaria chiloensis*) (86% y 42%, respectivamente) (Cheel *et al.*, 2007), que concuerda con los resultados obtenidos para el extracto metanólico de los frutos de *P. indica*, principalmente con la fracción clorofórmica, tanto con los métodos DPPH como TAC.

Los frutos de *P. indica* mostraron una capacidad antioxidante mayor con los métodos TAC y DPPH, y menor con ABTS, lo que sugiere que los compuestos con actividad antioxidante de este extracto son de polaridad intermedia, lo cual se confirma al observar los porcentajes de actividad antioxidante mostrado por la fracción clorofórmica, mayores que el extracto metanólico crudo y la fracción metanólica, características de algunos compuestos polifenólicos como los de tipo flavonoides, que poseen alta actividad antioxidante, de acuerdo a lo establecido por Floegel *et al.* (2011), en que la capacidad antioxidante depende de la solubilidad de los componentes de un extracto o una fracción, por ejemplo, si son liposolubles (menor polaridad) o hidrosolubles (mayor polaridad).

La IC₅₀ de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de los frutos de *P. indica* (0.807mg/mL) (anexo 11.1) determinada por el método DPPH, concuerda con lo reportado para el extracto etanólico de frutos de frambuesa (*Rubus idaeus*) (0.80

mg/mL), pero un valor mucho menor que los extractos etanólicos de frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus*) (1.40 mg/mL) y fresa (*Fragaria × ananassa*) (5.60 mg/mL) (Hangun-Balkir y McKenney, 2012), lo cual indica una mayor actividad antioxidante por parte de los frutos de *P. indica*.

También, el valor de la IC₅₀ de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de los frutos de *P. indica*, es similar a los reportados para los extractos metanólicos de frutos de frambuesa negra (*Rubus occidentalis*) y arándano (*Vaccinium myrtillus*), con 1.15 mg/mL y 0.82 mg/mL, respectivamente (Šavikin *et al.*, 2009). La IC₅₀ de esta fracción, pero determinada por el método TAC, fue de 0.675 mg/mL, valor que también confirma una alta actividad antioxidante (anexo 11.2).

En diversos extractos de plantas, las fracciones obtenidas con disolventes de polaridad intermedia como el acetato de etilo y el cloroformo, muestran una mayor actividad antioxidante que la de extractos crudos obtenidos con disolventes polares como el etanol y el metanol. La fracción de acetato de etilo de un extracto etanólico de hojas de *Cistus incanus* (jara) presentó el porcentaje más alto de actividad antioxidante con los métodos DPPH, captación del radical O₂⁻ y captación del radical hidroxilo, más alto inclusive que el encontrando en el extracto etanólico crudo (Gori *et al.*, 2016). Resultados similares han sido observados para fracciones de este tipo en *Symphyopappus casarettoi* (Benetti *et al.*, 2007), *Plantago australis* (Nemitz *et al.*, 2010), *Cola lepidota* (Oghenerobo y Falodun, 2013), *Pistasia atlantica* (Somayeh *et al.*, 2017) y en *Halocnemum strobilaceum* (Saada *et al.*, 2018).

Lo anterior indica que el fraccionamiento de extractos crudos es un proceso que separa y concentra los compuestos bioactivos por su solubilidad y polaridad, mismo que se observó al fraccionar el extracto metanólico de *P. indica*, sobre todo con los resultados mostrados por la fracción clorofórmica, de polaridad intermedia. Además, se ha reportado que la actividad antioxidante es mayor en fracciones de un extracto crudo, debido a que en este último puede presentarse una reducción de la actividad

por efectos antagónicos o de bloqueo entre los compuestos presentes (Hidalgo *et al.*, 2010; Hajimehdipoor *et al.*, 2014).

La capacidad antioxidante de los extractos de plantas y sus fracciones mayormente son atribuidos a la presencia de compuestos de naturaleza fenólica (Saada *et al.*, 2018). Es importante mencionar que en los frutos de *P. indica*, únicamente se han identificado antocianinas, lo que indica que han sido muy poco estudiados (Qin *et al.*, 2009). Con el propósito de relacionar el grupo de compuestos presentes en el extracto crudo y fracciones de estos frutos, se determinaron los ácidos fenólicos totales, flavonoides totales y antocianinas totales.

Contenido de ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas en frutos maduros de *P. indica*

El contenido total de ácidos fenólicos y flavonoides de frutos maduros de *P. indica* se muestran en la figura 4. En cuanto a ácidos fenólicos totales, la fracción clorofórmica (F.CHCl₃) presentó el valor más alto con 0.615 ± 0.037 μ moles Eq. Ácido Gálico/g (p.f.) seguido por el extracto metanólico (E.MetOH) y la fracción metanólica (F.MetOH) con 0.112 ± 0.015 y 0.073 ± 0.006 μ moles Eq. Ácido Gálico/g (p.f.), respectivamente (figura 4A), con los que hay diferencias significativas. Para el caso de flavonoides totales, el extracto metanólico (E.MetOH) presentó el valor más alto con 14.525 ± 0.720 μ moles Eq. Quercetina/g (p.f.) seguido por la fracción clorofórmica (F.CHCl₃) y la fracción metanólica (F.MetOH) con 11.483 ± 0.469 y 7.775 ± 0.225 μ moles Eq. Quercetina/g (p.f.), respectivamente (Figura 4B), con diferencias significativas.

En la fracción clorofórmica (F.CHCl₃) se presentó el valor más alto del contenido de antocianinas totales, con 0.0028 ± 0.00013 mg Eq. Cianidina/mg de extracto seguida por la fracción metanólica (F.MetOH) y el extracto metanólico (E.MetOH) con 0.00185 ± 0.00033 y 0.000628 ± 0.00017 mg Eq. Cianidina/mg de extracto, respectivamente, con una alta diferencia significativa (Figura 4C).

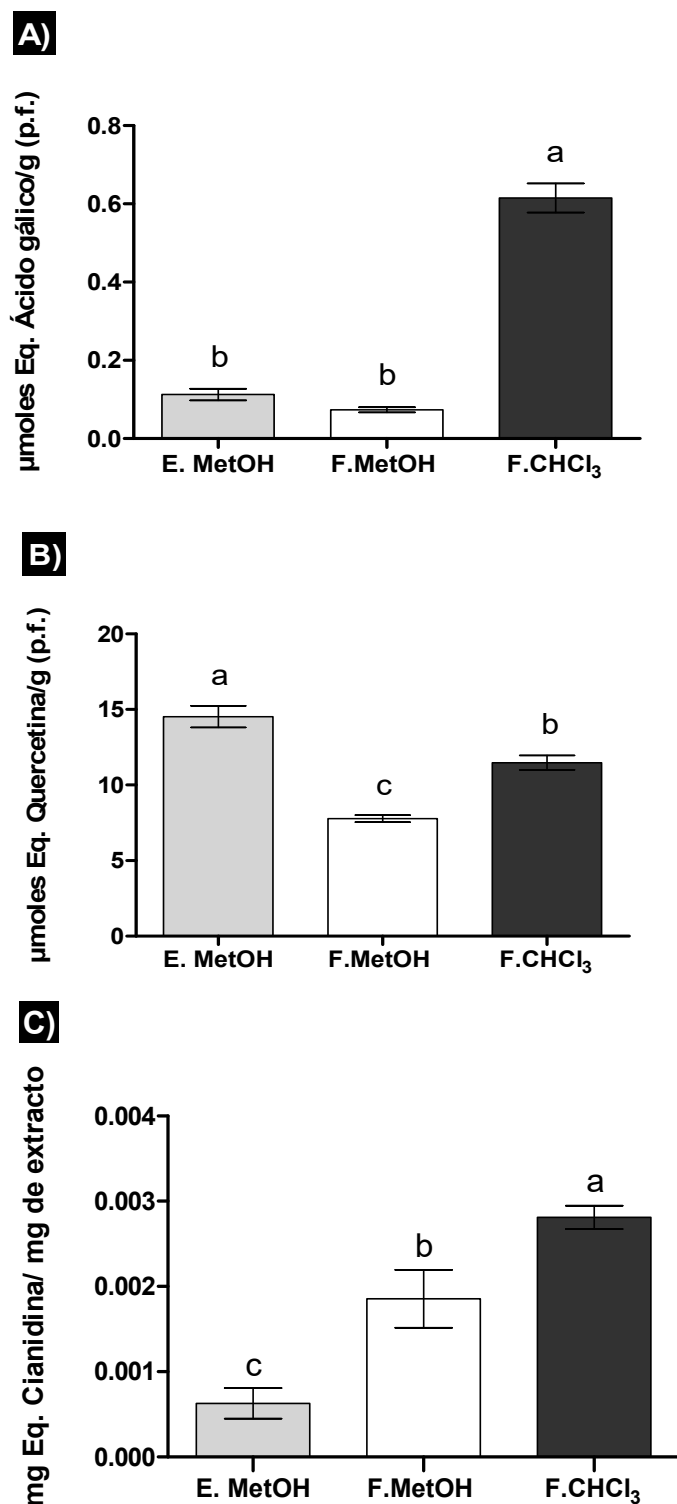


Figura 4. Ácidos fenólicos totales (A), flavonoides totales (B) y antocianinas totales (C) del extracto metanólico (E. MetOH) de los frutos de *Potentilla indica* y las fracciones metanólica (F. MetOH) y clorofórmica (F. CHCl₃). Letras diferentes indican que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=3$, prueba de Tukey).

El contenido total de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas) ha demostrado ser responsable de la actividad antioxidante en extractos de plantas y frutos (Hwang *et al.*, 2014). En los resultados de la presente investigación, se observa una relación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en los frutos maduros de *P. indica*. La fracción clorofórmica, con los valores más altos de actividad antioxidante, tiene el mayor contenido de ácidos fenólicos y antocianinas, así como una cantidad considerable de flavonoides, comparado con el extracto metanólico y la fracción metanólica.

El contenido de ácidos fenólicos totales en los frutos de *P. indica* es menor que el de frutos rojos como fresa (*F. vesca*) y algunas variedades de zarzamora (*R. fruticosus* var. “Thornfree” y *R. fruticosus* var. “Cacanska Bestrna”), los que presentan valores de 27.2, 11.44 y 10.10 $\mu\text{moles Eq. Ácido Gálico/g (p.f.)}$ (Milivojević *et al.*, 2011). También, valores mayores a los frutos de *P. indica*, han sido reportados para frutos de diferentes variedades de fresa (*Fragaria* $\times$ *ananassa*), que oscilan entre 3.48 y 5.50 $\mu\text{moles Eq. Ácido Gálico/g (p.f.)}$ (Rekika *et al.*, 2005).

Sin embargo, el contenido de flavonoides totales del extracto metanólico de frutos de *P. indica* es mayor que el de ácidos fenólicos totales, así como en sus fracciones; valores más bajos han sido reportados por Peñarrieta *et al.* (2009) para los frutos de fresa silvestre (*Fragaria vesca*) que oscilaban entre 2.4 y 4.9 $\mu\text{mol Eq. Catequina/g (p.f.)}$. De manera similar, Badhani *et al.* (2015) reportaron valores cercanos de flavonoides totales a los observados en los frutos de *P. indica*, tanto en frutos de *R. ellipticus* y *R. niveus* (15.58 y 16.24 $\mu\text{mol Eq. Quercetina/g (p.f.)}$, respectivamente).

En cuanto al contenido de antocianinas totales, los presentados en los frutos de *P. indica* son similares a los mostrados por otros frutos rojos como grosella (*Ribes rubrum*), fresa (*Fragaria* $\times$ *ananassa*) y arándano rojo (*Vaccinium oxycoccus*), con valores de 0.0025, 0.0052 y 0.0048 mg/mg de extracto, respectivamente (Ogawa *et al.*, 2008). Qin *et al.* (2009) reportaron un contenido de antocianinas totales de 0.205

mg/g de peso fresco para los frutos de *P. indica*, determinadas con base en cianidina 3-O-rutinósido, el primer estudio que cuantifica antocianinas en los frutos de falsa fresa.

En esta investigación, al compararse la actividad antioxidante del extracto metanólico de los frutos de *P. indica*, con dos de sus fracciones (fracción metanólica y fracción clorofórmica), así como con el contenido de compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas), se observó una relación directa entre ellos. Sin embargo, los resultados demuestran que la fracción clorofórmica es la de mayor actividad antioxidante, presumiblemente por contener el mayor contenido tanto de ácidos fenólicos como de antocianinas, y una cierta cantidad de flavonoides (Figuras 4). Éste es el primer reporte que analiza la actividad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de los frutos maduros de *P. indica* y ofrece una evidencia clara para realizar investigaciones futuras con la fracción clorofórmica.

CONCLUSIÓN

La fracción clorofórmica del extracto metanólico de frutos maduros de falsa fresa (*Potentilla indica*) mostró los valores más altos de actividad antioxidante, presentando una relación directa con el alto contenido de ácidos fenólicos y antocianinas totales.

REFERENCIAS

- Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiquzzaman, M.** (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Arnao, M.B., Cano, A., & Acosta, M.** (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244.
- Badhani, A., Rawat, S., Bhatt, I. D., & Rawal, R. S.** (2015). Variation in Chemical Constituents and Antioxidant Activity in Yellow Himalayan (*Rubus ellipticus* Smith) and Hill Raspberry (*Rubus niveus* Thunb.). *Journal of Food Biochemistry*, 39(6), 663-672.

- Benetti, M. R. N., Rudnicki, M., Zanotto-Filho, A., de Oliveira, M. R., Kurek, A. G., Coitinho, A., & Moreira, J. C. F.** (2007). Evaluation of antioxidant effect of extracts of *Symphopappus casarettoi*. *Fitoterapia*, 78(3), 232-234.
- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J. A., Caligari, P. D., & Schmeda-Hirschmann, G.** (2007). Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. *Food Chemistry*, 102(1), 36-44.
- Cheung, L. M., Cheung, P. C., & Ooi, V. E.** (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81(2), 249-255.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K.** (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Fuleki, T., & Francis, F. J.** (1968). Quantitative methods for anthocyanins. 1. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. *Journal of Food Science*, 33(1), 72-77.
- Goli, A. H., Barzegar, M., & Sahari, M. A.** (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chemistry*, 92(3), 521-525.
- Gori, A., Ferrini, F., Marzano, M. C., Tattini, M., Centritto, M., Baratto, M. C. ... & Brunetti, C.** (2016). Characterisation and antioxidant activity of crude extract and polyphenolic rich fractions from *C. incanus* leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1344.
- Hajimehdipoor, H., Shahrestani, R., & Shekarchi, M.** (2014). Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(3), 35-40.
- Hangun-Balkir, Y., & McKenney, M. L.** (2012). Determination of antioxidant activities of berries and resveratrol. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 5(2), 147-153.
- Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & De Pascual-Teresa, S.** (2010). Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691-696.
- Hu, W., Shen, W., & Wang, M. H.** (2009). Free radical scavenging activity and protective ability of methanolic extract from *Duchesnea indica* against protein oxidation and DNA damage. *Preventive Nutrition and Food Science*, 14(4), 277-282.
- Hu, W., Han, W., Huang, C., & Wang, M. H.** (2011). Protective effect of the methanolic extract from *Duchesnea indica* against oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 31(1), 42-50.
- Huang, W. Y., Zhang, H. C., Liu, W. X., & Li, C. Y.** (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 13(2), 94-102.
- Hwang, S. J., Yoon, W. B., Lee, O. H., Cha, S. J., & Dai Kim, J.** (2014). Radical-scavenging-linked antioxidant activities of extracts from black chokeberry and blueberry cultivated in Korea. *Food Chemistry*, 146, 71-77.

- Karamać, M., Kosińska, A., & Pegg, B.R.** (2005). Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 14(2), 165-170.
- Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y.** (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81(3), 321-326.
- Khokhar, S., & Magnusdottir, S. G. M.** (2002). Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 565-570.
- Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., & Milatović, D.** (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34(1), 1-9.
- Nemitz, M. C., Banderó-Filho, V., Zanetti, G. D., Zanotto, C. Z., & Manfron, M. P.** (2010). Phenolic compounds and antioxidant activity of the leaves of *Plantago australis* L. (Plantaginaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(7), 1082-7.
- Oghenerobo, V. I., & Falodun, A.** (2013). Antioxidant activities of the leaf extract and fractions of *Cola lepidota* K. Schum (Sterculiaceae). *Nigerian Journal of Biotechnology*, 25, 31-36.
- Ogawa, K., Sakakibara, H., Iwata, R., Ishii, T., Sato, T., Goda, T., ... & Kumazawa, S.** (2008). Anthocyanin composition and antioxidant activity of the crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4457-4462.
- Peñarrieta, J. M., Alvarado, J. A., Bergenståhl, B., & Åkesson, B.** (2009). Total antioxidant capacity and content of phenolic compounds in wild strawberries (*Fragaria vesca*) collected in Bolivia. *International Journal of Fruit Science*, 9(4), 344-359.
- Qiao, W., Yao, Z., Zhang, W., & Duan, H.Q.** (2009). Two new triterpenes from *Duchesnea indica*. *Chin. Chem. Lett*, 20, 572-575.
- Qin, C., Li, Y., Zhang, R., Niu, W., & Ding, Y.** (2009). Separation and elucidation of anthocyanins in the fruit of mockstrawberry (*Duchesnea indica* Focke). *Natural Product Research*, 23(17), 1589-1598.
- Rekika, D., Khanizadeh, S., Deschênes, M., Levasseur, A., Charles, M. T., Tsao, R., & Yang, R.** (2005). Antioxidant capacity and phenolic content of selected strawberry genotypes. *HortScience*, 40(6), 1777-1781.
- Saada, M., Kasmi, M., Jemaa, M. B., Ksouri, R.** (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of *Halocnemum strobilaceum* fractions and their related bioactive molecules identification by GC/MS and HPLC. *Research Journal of Recent Sciences*, 7(7), 1-9.
- Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Tasić, S., Menković, N., Stević, T., & Đorđević, B.** (2009). Phenolic content and radical scavenging capacity of berries and related jams from certificated area in Serbia. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(3), 212-217.
- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M.** (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42(5), 556-564.

- Snoussi, A., Hayet, B. H. K., Essaidi, I., Zgoulli, S., Moncef, C. M., Thonart, P., & Bouzouita, N.** (2012). Improvement of the composition of Tunisian myrtle berries (*Myrtus communis* L.) alcohol extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(2), 608-614.
- Somayeh, A., Mohammad, T.M., Majid A.S., & Zahra L.** (2017). Antioxidant potential and total phenolic compounds of extracts and fractions of *Pistacia atlantica*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(4), 293-297.
- Sun, T., & Ho, C. T.** (2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. *Food Chemistry*, 90(4), 743-749.
- Schwarz, K., Bertelsen G., Nissen L., Gardner P., Heinonem M., Hopia A., Huynh-Ba T., Lambelet P., McPhail D., Skibsted L., & Tijburg L.** (2001). Investigation of plants extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research Technology*, 212(3), 319-328.
- Wang, S. S., Wang, D. M., Pu, W. J., & Li, D. W.** (2013). Phytochemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of three *Potentilla* species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 321.
- Yang, E.J., Lee, J.S., Yun, C.Y., Kim, J.H., Kim, J.S., Kim, D.H., & Kim, I.S.** (2008). Inhibitory effects of *Duchesnea chrysanth* extract on ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of asthma. *Journal Ethnopharmacology*, 118(1), 102–107.
- Zhu, M., Dong, X., & Guo, M.** (2015). Phenolic profiling of *Duchesnea indica* combining macroporous resin chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. *Molecules*, 20(12), 22463-22475.

7.2. CAPÍTULO II. Determinación de la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico y la fracción clorofórmica de frutos de falsa fresa (*P. indica*) en un modelo experimental de edema en pata de rata inducida por carragenina e identificación y cuantificación de compuestos activos.

RESUMEN

Potentilla indica es una planta perteneciente a la familia Rosaceae, introducida y cultivada en México, a la cual se le atribuyen propiedades medicinales relacionadas con estrés oxidante e inflamación crónica. En este estudio se analizó la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico y de una fracción clorofórmica de los frutos de *P. indica*, utilizando el modelo de edema en pata de rata inducida por carragenina, con la administración tópica y oral del extracto y la fracción. Para la administración tópica, se aplicaron tres dosis (0.1, 1 y 10 mg/kg), mientras que para la administración oral se aplicaron solo la dosis con el mejor resultado de la actividad antiinflamatoria del ensayo tópico, tanto del extracto como de la fracción clorofórmica. El extracto metanólico administrado de manera tópica presentó un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis, la menor actividad antiinflamatoria fue con la de 0.1 mg/kg (19.84%), seguida de la de 1 mg/kg (28.9%), alcanzando un 55.2% con la de 10 mg/kg. Con la administración oral del extracto metanólico en la dosis de 10 mg/kg, ésta presentó un valor de 46.9%. Por otro lado, la fracción clorofórmica administrada de manera tópica no mostró un comportamiento dependiente de la dosis, siendo la de 1 mg/kg, la que presentó el porcentaje más alto de actividad antiinflamatoria, con 77.8%, un porcentaje mayor que con las dosis de 0.1 y 10 mg/kg, un 22.6% más que lo ejercido por el extracto metanólico (10 mg/kg) e igual al mostrado por el ibuprofeno (25 mg/kg). Finalmente, con la administración oral de la fracción clorofórmica en la dosis de 1 mg/kg, ésta presentó un valor de 72%. Los compuestos mayoritarios tanto del extracto metanólico como de la fracción clorofórmica, fueron identificados y cuantificados por HPLC, observando que la fracción clorofórmica está mayormente constituida por ácido elágico (44.37 µg/mL), quercetina (27.2 µg/mL) y rutina (18.7 µg/mL). Sin embargo, en el extracto metanólico se identificaron ácidos fenólicos como el ácido gálico (37.4 µg/mL) y el ácido p-cumárico (21.1 µg/mL). Estos resultados sugieren que la alta actividad antiinflamatoria mostrada por la fracción clorofórmica, se debe a la presencia de ácido elágico, quercetina y rutina.

Palabras clave: Antiinflamatorio, carragenina, inflamación, edema en pata de rata, *Potentilla indica*.

ABSTRACT

Potentilla indica is a plant of Rosaceae family, introduced and grown in Mexico, which are attributed medicinal properties related to oxidative stress and chronic inflammation. This study analyzed the anti-inflammatory activity of the methanolic extract and chloroformic fraction of *P. indica* fruits, using the carrageenan-induced

rat paw edema model, with topical and oral administration of extract and fraction at different doses. Three doses were applied (0.1, 1 y 10 mg/kg) in the topical administration, while the dose which the higher anti-inflammatory activity were used in the oral administration with the methanolic extract and chloroformic fraction. The methanolic extract administered topically presented a dose-dependent anti-inflammatory effect, the lowest anti-inflammatory activity was with 0.1 mg/kg (19.84%), followed by 1 mg/kg (28.9%), reaching 55.2% with 10 mg/kg. With oral administration of the methanolic extract at the dose of 10 mg/kg, it showed a value of 46.9%. On the other hand, the chloroformic fraction administered topically showed did not show dose-dependent behavior, whit 1 mg/kg obtaining the highest percentage of anti-inflammatory activity, which was 77.8% higher than at doses of 0.1 and 10 mg/kg, 22.6% over that exerted by the methanolic extract (10 mg/kg) and equal to that shown by ibuprofen (25 mg/kg). Finally, with oral administration of the chloroformic fraction at the dose of 1 mg/kg it had a 72%. The majority compounds of both the methanolic extract and the chloroformic fraction were identified and quantified by HPLC, noting that the chloroformic fraction is mostly composed of ellagic acid (44.37 µg/mL), quercetin (27.2 µg/mL) and rutin (18.7 µg/mL). However, phenolic acids such as gallic acid (37.4 µg/mL) and p-coumaric acid (21.1 µg/mL) were identified in the methanolic extract. These results suggest that the high anti-inflammatory activity shown by the chloroformic fraction is due to the presence of ellagic acid, quercetin and rutin.

Keywords: Anti-inflammatory, carrageenan, inflammation, paw edema in rat, *Potentilla indica*.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es la respuesta fisiológica protectora del organismo a las infecciones y daños en los tejidos, y que generalmente viene acompañada por hinchazón, dolor y enrojecimiento. Se caracteriza por una serie de acciones, que incluyen la vasodilatación, la permeabilidad vascular y el reclutamiento de células inmunitarias y proteínas plasmáticas en el lugar de infección o lesión tisular. Además, se ha determinado que en estos procesos se producen mediadores inflamatorios locales como prostaglandinas, leucotrienos, histamina y serotonina (aminas vasoactivas), citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, y especies reactivas de oxígeno. Aunque de manera general, la inflamación es beneficiosa para el huésped, debido a que protege contra amenazas como patógenos invasores y está estrechamente

relacionada con los procesos de reparación del tejido lesionado, si no se termina de manera oportuna, puede iniciarse un daño en los tejidos sanos del cuerpo (Hoesel y Schmid, 2013; Ambriz-Pérez *et al.*, 2016; Hussain *et al.*, 2016).

La inflamación aguda en particular tiene una evolución muy breve (desde unos minutos hasta varias horas); entre sus características está la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos en los tejidos afectados o dañados (León *et al.*, 2015).

Aunque hay tratamientos con antiinflamatorios de la medicina alópata, como los fármacos no esteroideos (ibuprofeno, naproxeno), los cuales son muy utilizados por ser muy eficientes, tienen la desventaja de tener efectos secundarios (problemas gastrointestinales, renales y cardiovasculares). Debido a lo antes mencionado, existe la necesidad de encontrar nuevas alternativas que disminuyan dichas desventajas pero que ayuden a regular el estrés oxidante y los procesos inflamatorios crónicos (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016). Una alternativa la presentan los metabolitos secundarios de plantas, de los cuales destacan, los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, entre otros) (Costa *et al.*, 2016).

La actividad antiinflamatoria de extractos de distintas plantas se ha determinado utilizando el método conocido como edema plantar inducido por carragenina, el cual es un modelo de inflamación aguda que tiene la característica de presentar un perfil bifásico. La fase inicial (0-2 h) es mediada principalmente por la producción de histamina, serotonina y bradiquininas. En contraste, a la fase tardía (2-6 h) se le atribuye la producción de prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno, COX-2 y citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8). La respuesta vascular se hace máxima y estable entre las 4 y 8 h, periodo adecuado para el ensayo de agentes antiinflamatorios (Sugishita *et al.*, 1981; Sakat *et al.*, 2014; De Araujo *et al.*, 2019).

Algunas especies de *Potentilla*, plantas de la familia Rosaceae, poseen actividad antiinflamatoria. El extracto etanólico de *P. erecta* inhibió la expresión de COX-2 al 50% (IC₅₀) a una concentración de 24.2 µg/mL en un modelo de inflamación inducida por UVB en líneas celulares (Hoffmann *et al.*, 2016). Por su parte el extracto etanólico de *P. supina* redujo la producción de TNF-α, IL-6 e IL-1β en un 34%, 50% y 57%, respectivamente, en un modelo de Inflamación inducida por LPS en células de macrófagos (Lee *et al.*, 2017). *P. indica* (falsa fresa), aunque es originaria de Asia, donde es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades que involucran procesos inflamatorios, ha sido introducida a México donde actualmente se distribuye en varios estados. Aunque los extractos de diferentes partes de la planta (hojas y raíces) poseen actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora (Zhao *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Ang *et al.*, 2014), se desconocen si estas propiedades las presentan sus frutos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico y de la fracción clorofórmica de los frutos de *P. indica*, ya que éstos mostraron la mayor actividad antioxidante, la que se relacionó directamente con un alto contenido de flavonoides, ácidos fenólicos y antocianinas (Capítulo I).

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos de *P. indica*. Los frutos maduros de *P. indica* se obtuvieron de plantas cultivadas en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Después de cada colecta los frutos fueron almacenados a -20°C.

Animales. Se utilizaron ratas Wistar macho de tres meses de edad (400g), reproducidas y mantenidas en el bioterio del IIQB de la UMSNH, según la normatividad para el cuidado de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999).

Obtención del extracto metanólico y fracción clorofórmica. Los frutos de *P. indica* fueron pulverizados con nitrógeno líquido en licuadora comercial. La extracción se realizó por maceración con metanol en frío (4°C durante cinco días en oscuridad). Por cada 100 g de frutos pulverizados se añadieron 1000 mL de metanol frío. Para la obtención del extracto, el macerado se filtró en embudo con papel Whatman No.1, descartando el material vegetal, sometiendo el extracto a evaporación a sequedad en rotavapor (45°C) al vacío. El extracto fue disuelto en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% a una concentración de 100 mg/mL, el cual fue almacenado en congelación y oscuridad hasta su uso y análisis.

La fracción clorofórmica (F.CHCl₃) se obtuvo por extracción líquido-líquido del extracto metanólico utilizando cloroformo (se utilizó un embudo de separación). Finalmente, la fracción fue evaporada a sequedad en rotavapor (45°C) y disuelta en DMSO al 5% a una concentración de 100 mg/mL.

Inducción de inflamación aguda. La actividad antiinflamatoria se evaluó en ratas macho Wistar (n=5), usando la prueba de edema en pata inducida por carragenina (Winter *et al.*, 1962). Se inyectó de manera subcutánea en el tejido plantar de la pata trasera 50 µL de una solución de carragenina al 1% solubilizada en NaCl al 0.9%.

Administración del extracto y fracción clorofórmica. En el ensayo de edema de pata, la administración del extracto y fracción se hizo bajo dos sistemas de experimentación:

- 1) Administración tópica del extracto metanólico y la fracción clorofórmica a las 4 h (tiempo de inflamación máxima) después de la aplicación de la carragenina, en las dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg (disueltas en DMSO al 5%). Se aplicó un volumen total de 50 µL en la pata (Cuadro 4).

2) Administración por vía oral del extracto metanólico y de la fracción clorofórmica en la dosis que mostró mayor actividad antiinflamatoria en el sistema de experimentación 1, administrando un volumen total de 50 μ L. El ensayo de edema (inflamación aguda) se realizó después de 28 días de estar administrando diariamente el extracto y la fracción. Durante esta experimentación se utilizaron mismos grupos de ratas, pero solamente dos de ellos con la dosis más efectiva seleccionada por el efecto antiinflamatorio con administración tópica, tanto del extracto metanólico como de la fracción clorofórmica.

El ibuprofeno (25 mg/kg) fue utilizado como control positivo, el DMSO al 5% como control negativo y un tercer control fue incluido, el cual consistió en inflamación sin tratamiento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Grupos de ratas Wistar macho (n=5), utilizados para la determinación del efecto antiinflamatorio con administración tópica del extracto metanólico y fracción clorofórmica de frutos de *Potentilla indica*.

Grupos	Tratamiento
Grupo 1	Extracto Metanólico (0.1 mg/kg)
Grupo 2	Extracto Metanólico (1 mg/kg)
Grupo 3	Extracto Metanólico (10 mg/kg)
Grupo 4	Fracción Clorofórmica (0.1 mg/kg)
Grupo 5	Fracción Clorofórmica (1 mg/kg)
Grupo 6	Fracción Clorofórmica (10 mg/kg)
Grupo 7	Ibuprofeno (25 mg/kg)
Grupo 8	Dimetilsulfóxido (DMSO) 5%
Grupo 9	Sin Tratamiento

Medición de la inflamación. La inflamación inducida por carragenina se midió a las 4, 5, 6, 7, 8 y 24 horas después de la aplicación de la carragenina, con un micrómetro digital (Mitutoyo™). El porcentaje de actividad antiinflamatoria se calculó según la siguiente fórmula:

$$Aa = \left(1 - \frac{\text{mm de la extremidad a evaluar} - \text{mm de la extremidad sin inflamar}}{\text{mm que aumenta la extremidad durante la inflamación máxima}} \right) \times 100$$

Donde Aa es actividad antiinflamatoria.

Cuantificación e identificación de compuestos fenólicos mayoritarios. El análisis se realizó por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), utilizando el equipo HP 1090 Series II, acoplado a una bomba de separación LPG-3400RS y de auto-inyección WPS-3000, con un detector rápido de separación con arreglo de diodos (DAD-3000RS). Los compuestos fenólicos fueron separados mediante una columna HP C18 (4.6 x 150 mm; 5µm) a una temperatura de 30 °C. Los datos, integración de picos y calibración, se analizaron con el software Dionix Chromeleon (Version 6.80 RS 10).

Las condiciones del análisis de muestras, consistieron en una fase móvil de acetonitrilo (disolvente A), una solución de ácido acético a pH 3.0 (disolvente B) y metanol (disolvente C), utilizando el siguiente programa de gradiente de elución: 0 min, 5%A/95%B; 10 min, 10%A /80%B /10%C; 20 min, 20%A /60%B /20%C y 30 min, 100%A.; con un flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10 µl. La detección se realizó con ultravioleta (UV) a una longitud de onda (λ) específico para compuestos fenólicos: λ 280 nm por 18.0 min con un cambio a λ 320 nm y mantenida por 6 min, finalmente se cambió a λ 380 nm, dejando en un rango de 200 nm a 700 nm. Con estas condiciones y longitudes de onda, se realizó la detección (identificación) y cuantificación de ácido cafeico, ácido cumárico, ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, quercetina y rutina (Sigma-Aldrich, México).

Cada compuesto fue preparado en una concentración de 10 µg/mL y se mezclaron para tener una solución estándar, que después de preparada fue mantenida en oscuridad a 5°C, utilizada como estándar para corroborar la identidad de cada compuesto. La cuantificación se obtuvo por comparación de los picos obtenidos de cada compuesto estándar, utilizando el tiempo de retención y mediante curvas de calibración, establecidas con las áreas de cada pico respectivas a cada

concentración. Los datos se representan como la media $\pm$ la desviación estándar de análisis independiente por triplicado.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se expresaron a través de la media $\pm$ desviación estándar. Los mismos se procesaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente se realizó una prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se utilizó el software JMP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antiinflamatoria con administración tópica

Con la administración tópica del extracto metanólico y fracción clorofórmica obtenidos de los frutos maduros de *P. indica*, se determinó la actividad antiinflamatoria, utilizando el ensayo de edema de pata en rata (Winter *et al.*, 1962), observando un efecto antiinflamatorio dependiente de la dosis y del extracto.

La inducción de la inflamación aguda con carragenina al 1% provocó un aumento prominente en el grosor de la pata, alcanzando un pico máximo a las 4 h (inflamándose en promedio 2.3 mm), tiempo que se eligió para iniciar las mediciones del efecto antiinflamatorio (4-8 h). Después de 24 h de la inducción de la inflamación, el ibuprofeno al ser administrado de manera tópica a 25 mg/kg, tuvo la más alta actividad antiinflamatoria (78.8%), sin diferencias a partir de las 8 h, por lo que la actividad antiinflamatoria se obtuvo a estos tiempos. Con la administración tópica de las dosis de 0.1 y 1 mg/kg del extracto metanólico, no se observó un efecto antiinflamatorio significativo, ya que los porcentajes de actividad antiinflamatoria no mostraron diferencias significativas con los presentados por los controles (inflamación sin tratamiento e inflamación aplicando DMSO 5%), los cuales presentaron valores promedio de 24% y 20.3%, respectivamente.

A las 24 h, se obtuvo solamente una actividad antiinflamatoria de un 19.84% con 0.1 mg/kg del extracto y un 28.9% con 1 mg/kg (Figuras 5A y 5B). Sin embargo, con la aplicación tópica del extracto metanólico a la dosis de 10 mg/kg, se observó la actividad antiinflamatoria desde las 5 h del ensayo con un 35%, alcanzando un 55.2% de actividad a las 24 h, sin diferencia significativa entre los valores de las 6, 7 y 8 h (Figura 5C). Este valor fue un 23.6% menor al ejercido por ibuprofeno a la dosis de 25 mg/kg.

A diferencia del efecto del extracto metanólico, una alta actividad antiinflamatoria de la fracción clorofórmica se observó desde las 7 h con la aplicación tópica de la dosis de 0.1 mg/kg, con 45.7%, la que se mantuvo hasta las 24 h, con 50.4% de actividad, sin diferencias significativas entre los valores de las 7, 8 y 24 h, un efecto mayor al que se observó en los controles (inflamación sin tratamiento e inflamación aplicando DMSO 5%) pero un 28.4% menor que el presentando por el ibuprofeno (Figura 6A).

Sin embargo, con la dosis de 1 mg/kg se observó la actividad antiinflamatoria desde las 5 h después de la aplicación de carragenina, con un 43.9%, sin diferencias significativas con los valores obtenidos a las 6, 7 y 8 h, pero con un aumento significativo a las 24 h, alcanzando un 77.8%, una actividad antiinflamatoria similar a la del ibuprofeno (78.8 %) (Figura 6B). Esta actividad fue la más alta observada, comparándose tanto con el extracto como con las dosis de 0.1 y 10 mg/kg de la fracción clorofórmica, ambas aplicadas de manera tópica, ya que, con esta última se presentó una actividad significativa del 40.52% a las 24 h (Figura 6C).

Actividad antiinflamatoria con administración oral

La actividad antiinflamatoria fue determinada en ratas con la administración oral del extracto metanólico (10 mg/kg) y de la fracción clorofórmica (1 mg/kg) de los frutos de *P. indica*, ya que fueron las que mejores resultados presentaron al ser administradas de manera tópica.

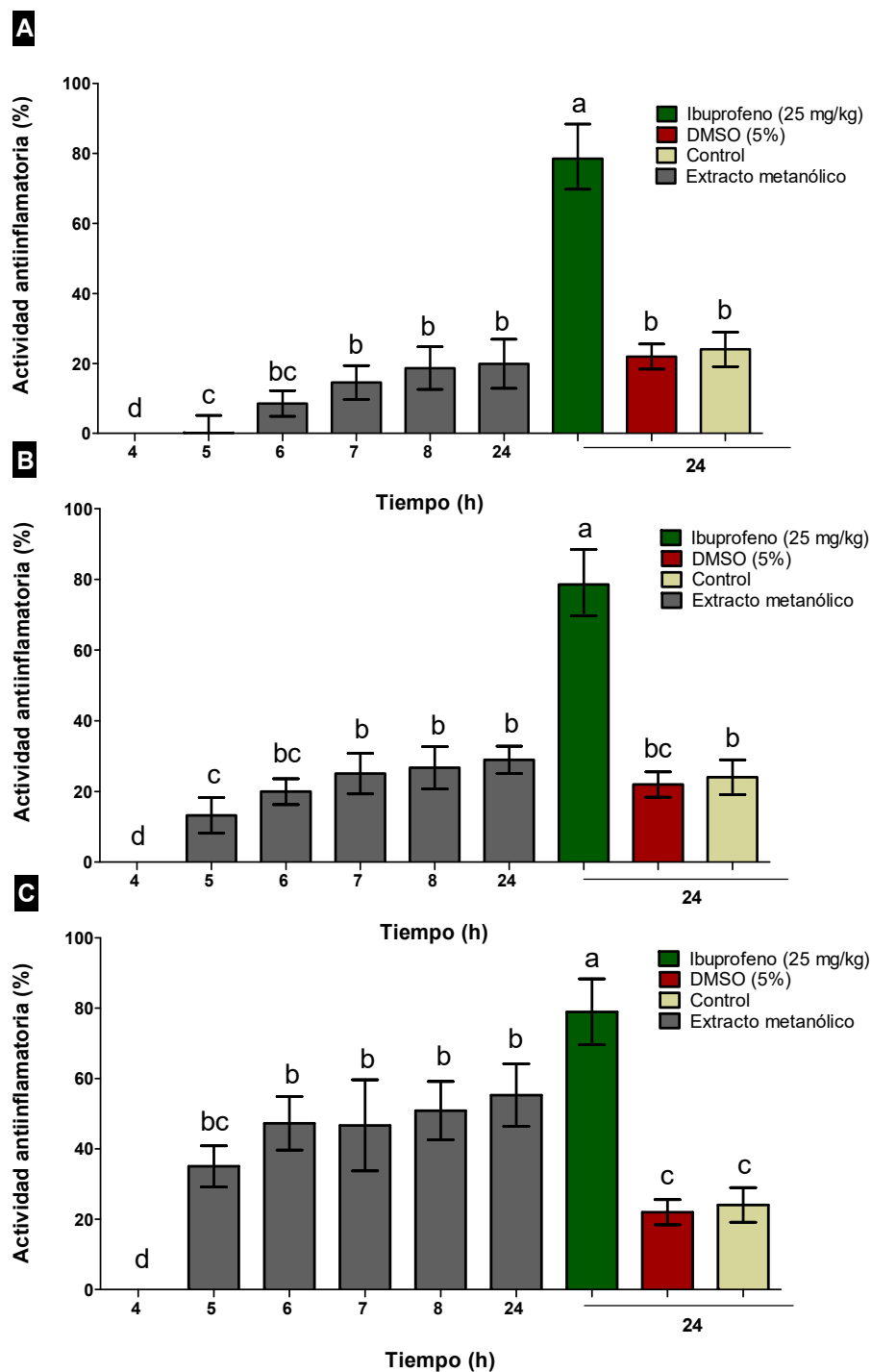


Figura 5. Porcentaje de actividad antiinflamatoria con administración tópica del extracto metanólico de los frutos de *Potentilla indica* en las dosis de 0.1 (A), 1 (B) y 10 (C) mg/kg, comparado con el efecto de ibuprofeno (25 mg/kg), la solución vehículo (DMSO 5%) y el grupo control (ratas no tratadas). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

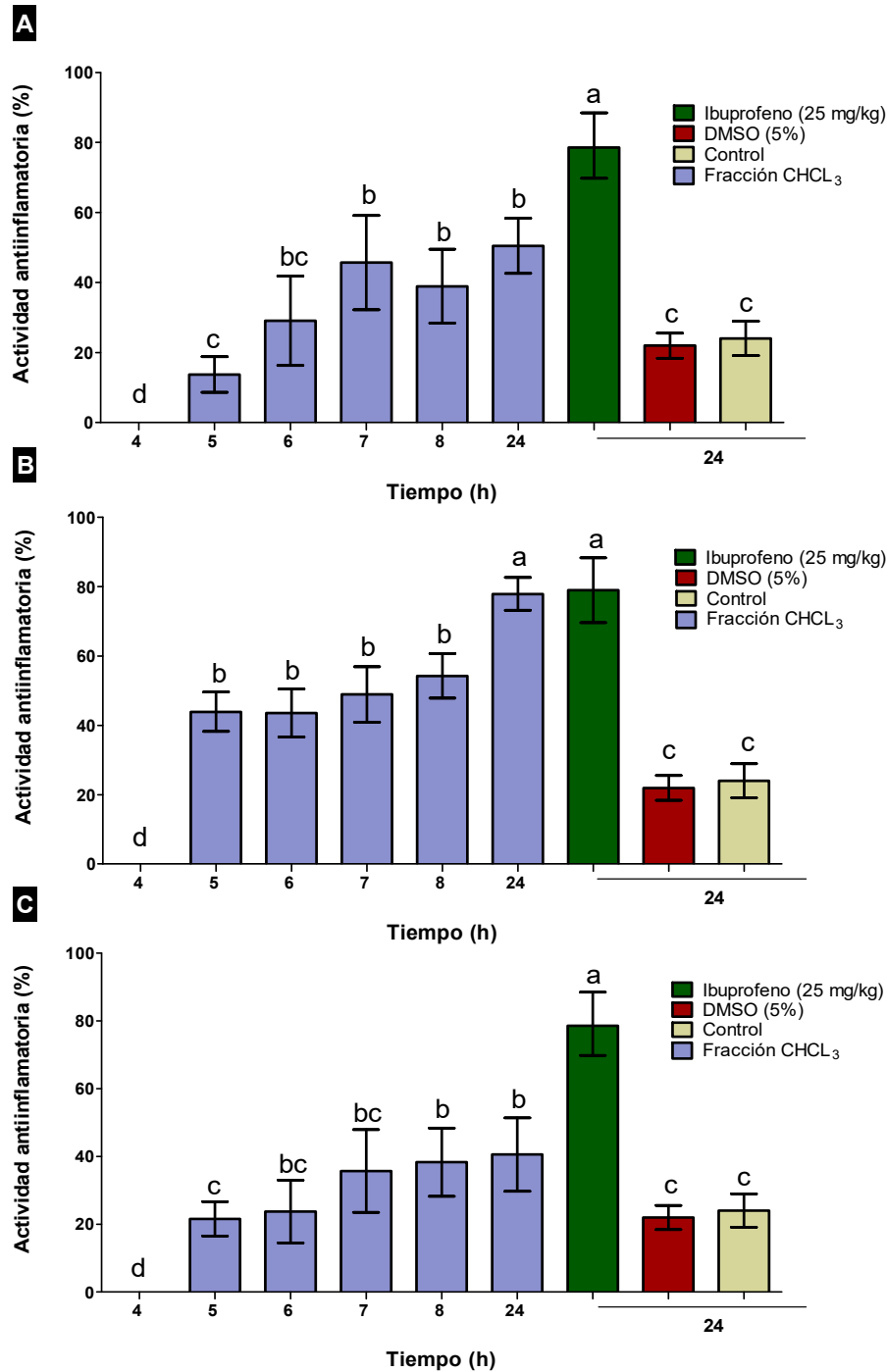


Figura 6. Porcentaje de actividad antiinflamatoria con administración tópica de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de los frutos de *Potentilla indica* en las dosis de 0.1 (A), 1 (B) y 10 (C) mg/kg, comparado con el efecto de ibuprofeno (25 mg/kg), la solución vehículo (DMSO 5%) y el grupo control (ratas no tratadas). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de Tukey).

La medición se realizó con el método y parámetros usados para la actividad antiinflamatoria con la administración tópica (Winter *et al.*, 1962). Después de la administración oral tanto del extracto y de la fracción clorofórmica, se realizó la inducción con carragenina al 1%.

Con la administración oral del extracto metanólico se observó a las 8 h un valor de actividad antiinflamatoria del 44.3%, alcanzando un 46.9% de actividad a las 24 h, teniendo diferencia significativa con los valores de las 5, 6 y 7 h (Figura 7A). A diferencia de cuando fue administrado de manera tópica, el ibuprofeno a 25 mg/kg al ser administrado de manera oral durante 28 días, mostró un valor de actividad antiinflamatoria más baja, del 16.18%, después de 24 h de la inducción de la inflamación.

La fracción clorofórmica, a diferencia del extracto metanólico, al ser aplicado de manera oral durante 28 días mostró mayor actividad antiinflamatoria en una dosis de 1 mg/kg, observando un 72 % de actividad antiinflamatoria a las 24 h, no teniendo diferencia significativa con el valor obtenido a las 8 h, y siendo un 55.82% mayor que el valor obtenido para el ibuprofeno a la misma hora (figura 7B).

Diversos extractos de plantas han mostrado actividad antiinflamatoria cuando son probados en modelos de inflamación aguda. Una infusión de aceite/agua de hojas de zacate limón (*Cymbopogon citratus*), la cual contenía mayormente compuestos fenólicos, tuvo una actividad antiinflamatoria máxima del 43% cuando fue aplicada de manera tópica en una dosis de 400 mg/kg, en un modelo de edema de pata inducida por carragenina (Costa *et al.*, 2016).

De la misma manera, en el modelo antes mencionado, el extracto hidrometanólico de “Chén Yin” (*Artemisia scoparia*) al ser aplicado de manera tópica, tuvo una actividad antiinflamatoria máxima del 50.2% y 65% en dosis de 400 y 800 mg/kg, respectivamente (Habib y Waheed, 2013). Estos porcentajes de actividad antiinflamatoria son comparables con lo obtenido con la dosis de 10 mg/kg del

extracto metanólico y de 0.1 y 10 mg/kg de la fracción clorofórmica de este extracto, de frutos maduros de *P. indica*, aunque cabe resaltar que el efecto antiinflamatorio ocurre en dosis más bajas, lo que sugiere una alta actividad antiinflamatoria.

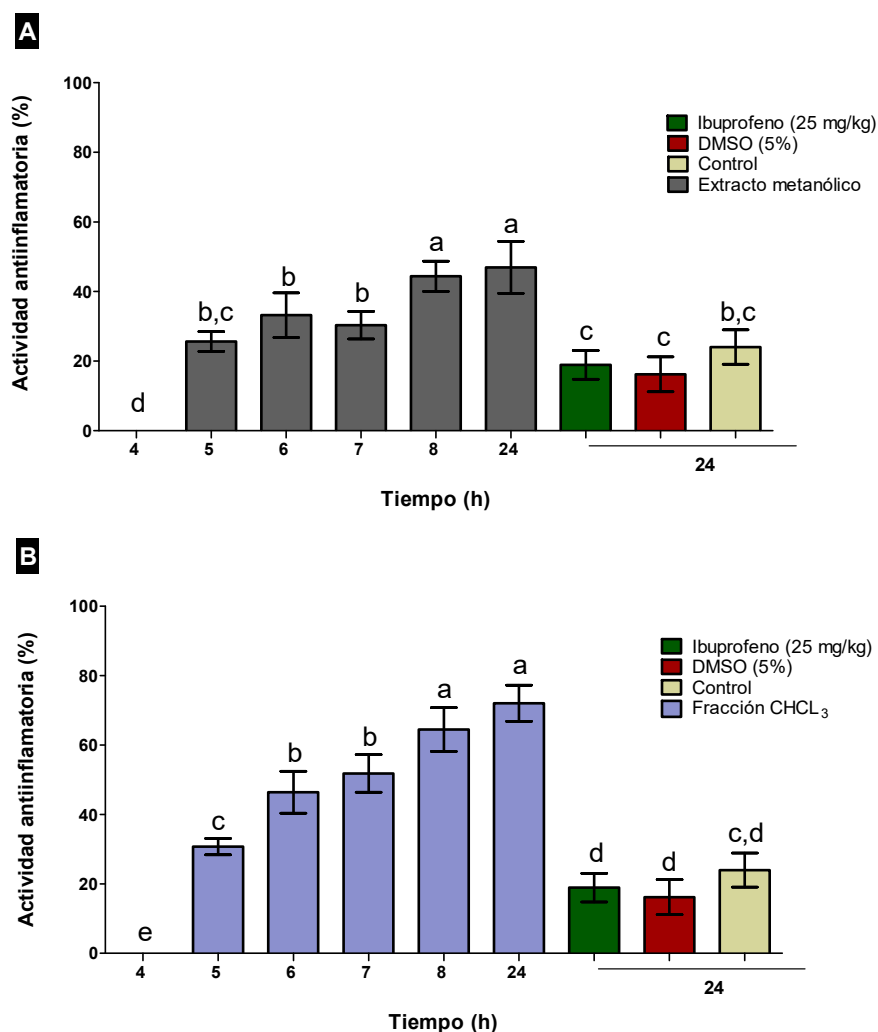


Figura 7. Porcentaje de actividad antiinflamatoria por administración oral del extracto metanólico (A) y la fracción clorofórmica (B) de los frutos de *Potentilla indica* en la dosis de 10 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente, comparado con el efecto de ibuprofeno (25 mg/kg), la solución vehículo (DMSO 5%) y el grupo control (ratas no tratadas). Letras diferentes indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$, $n=5$, prueba de

Algunos extractos vegetales muestran porcentajes más altos de actividad antiinflamatorio, como el extracto acetónico de raíces de *Rubus fairholmianus*, que tiene un 77.98% a las 7 h, con la administración oral de 400 mg/kg, utilizando también el modelo de edema de pata en rata inducido por carragenina (George *et al.*, 2014). Este porcentaje de actividad, concuerda con el obtenido con la fracción clorofórmica, pero obtenido con una dosis más baja (1 mg/kg), usando el mismo ensayo.

En el modelo de edema de pata en rata inducido con carragenina, las dosis de 100 mg/kg de diversos extractos de plantas, no han mostrado una alta actividad antiinflamatoria. El extracto metanólico de hojas de *Eupatorium adenophorum*, administrándose de manera tópica en esta dosis, solo mostró una actividad antiinflamatoria máxima de 19.64% (Negi *et al.*, 2012). De igual forma, los extractos metanólicos de hojas de *Cassia alata* y *Cassia tora*, administrados de manera tópica en la dosis de 100 mg/kg, alcanzaron una actividad antiinflamatoria del 59.4% y 45.2%, respectivamente, a las 5 h después de la aplicación de la carragenina (Misal *et al.*, 2012).

Algunos extractos y compuestos de plantas han presentado actividad antiinflamatoria empleando dosis bajas. Polifenoles aislados de corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) fueron probados de manera oral en el modelo de edema de pata en rata inducido por carragenina en dosis de 4, 8 y 25 mg/kg, teniendo un porcentaje de actividad antiinflamatoria del 27.47%, 35.21% y 63.38%, respectivamente (Vetal *et al.*, 2013). De la misma manera y utilizando el mismo modelo, el extracto acuoso de hojas de zacate limón (*Cymbopogon citratus*) obtuvo un porcentaje de actividad antiinflamatoria del 70.80% (en dosis de 34.12 mg/kg), mientras que su fracción rica en taninos obtuvo un porcentaje de 61% (en dosis de 5.96 mg/kg) (Garcia *et al.*, 2015)

Con lo anterior, y por los resultados obtenidos con la presente investigación, tanto el extracto metanólico de los frutos de *P. indica* y la fracción clorofórmica de éste,

pueden ser considerados antiinflamatorios, en una dosis de 10 mg/kg para el extracto y de 1 mg/kg para la fracción clorofórmica. Los resultados muestran que la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico es dependiente de la dosis, pero este comportamiento no se observó con la fracción clorofórmica, ya que a 0.1 y a 10 mg/kg, el efecto fue más bajo.

Este comportamiento se ha observado con la administración de algunos extractos de plantas, como el mostrado por el extracto acuoso de hojas de baburio (*Kalanchoe pinnata*), el cual produjo un mayor efecto antiinflamatorio con la dosis de 125 mg/kg (24.15%), pero no así con una dosis más baja (250 mg/kg) y una más alta (500 mg/kg), con las que se obtuvo un 12.16% y 21.26%, respectivamente (De Araujo *et al.*, 2019). Así mismo, esto se ha observado con la administración del extracto etanólico de hojas de alafia (*Alafia barteri*) (Sofidiya *et al.*, 2014), del extracto hidroalcohólico de los frutos de mirobálano (*Terminalia chebula*) (Bag *et al.*, 2013) y del extracto acuoso de hojas de berejena cimarrona (*Solanum torvum*) (Ndebias *et al.*, 2007), en los que las dosis intermedias tienen el mayor porcentaje de actividad antiinflamatoria.

De acuerdo a la característica bifásica del modelo de edema inducido por carragenina y al evaluar la actividad antiinflamatoria a partir de las 4 h, se sugiere que los frutos de *P. indica*, **evaluados en el presente estudio**, inhiben mediadores inflamatorios de la fase tardía como prostaglandinas, COX-2, especies reactivas de oxígeno y citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8), especialmente los componentes de la fracción clorofórmica en la dosis de 1 mg/kg y del extracto metanólico en la dosis de 10 mg/kg (Sakat *et al.*, 2014; De Araujo *et al.*, 2019).

La umbeliferona (cumarina simple), aislada de la fracción clorofórmica del extracto etanólico de *Potentilla evestita*, administrada de manera intraperitoneal en dosis de 10 mg/kg tuvo una actividad antiinflamatoria del 66.13% a las 5 h después que se administró, en el modelo de edema de pata de rata inducido por carragenina (Rauf *et al.*, 2014). Lo anterior concuerda con la actividad antiinflamatoria obtenida para

el extracto metanólico en la dosis de 10 mg/kg, y para la fracción clorofórmica pero en una dosis menor (1 mg/kg), en la cual algún o algunos principios activos están con una mayor pureza y a una concentración mayor, respecto al extracto metanólico.

Principales compuestos fenólicos del extracto metanólico y de la fracción clorofórmica

En un análisis de corrida por 30 min mediante el análisis por HPLC, los compuestos fenólicos de la solución mezcla de estándares, fueron separados con una óptima resolución, observando un tiempo de retención (Tr) constante para cada compuesto (Cuadro 5, Figura 8).

Cuadro 5. Compuestos fenólicos de la solución de mezcla de estándares, analizados por HPLC (10 µg/mL).

No. de Pico	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Miliunidades de Absorbancia (mAU)
1	Ácido gálico	5.64	27500
2	Catequina	12.27	5250
3	Ácido vanílico	15	30250
4	Ácido cafeico	15.5	28600
5	Epicatequina	16.5	7250
6	Ácido p-cumárico	20	22500
7	rutina	23	14200
8	Ácido elágico	24.8	11200
9	quercetina	26	24750

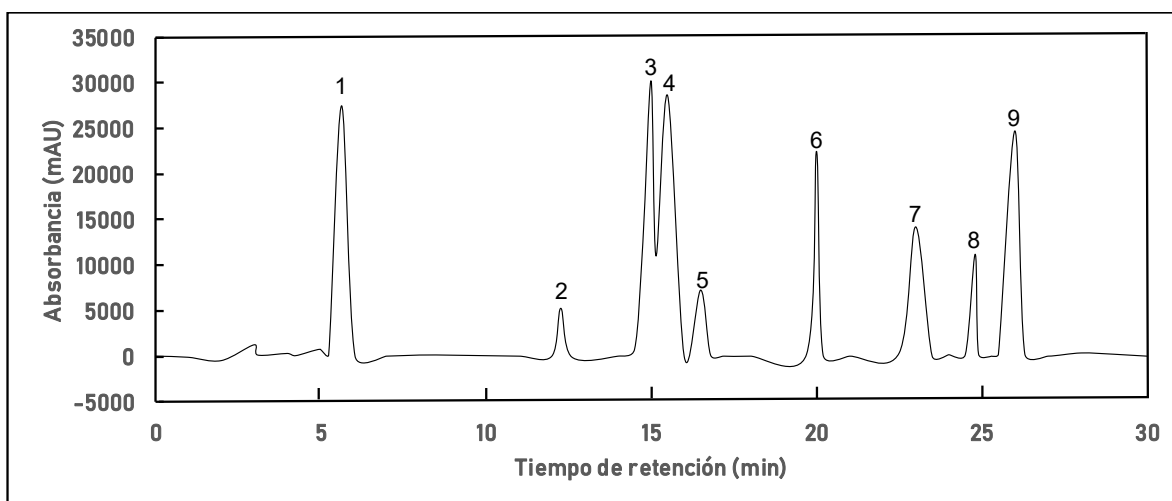


Figura 8. Cromatograma de la solución mezcla estándar de compuestos fenólicos analizado por HPLC. Picos: 1, ácido gálico; 2, catequina; 3, ácido vanílico; 4, ácido cafeico; 5, epicatequina; 6, ácido p-cumárico; 7, rutina; 8, ácido elágico; 9, quercetina.

En el extracto metanólico, los ácidos fenólicos fueron mayoritarios, identificando la presencia de ácido gálico (pico 2), ácido p-cumárico (pico 6) y ácido elágico (pico 8), no se encontró ácido cafeico ni epicatequina. El mayor contenido correspondió al ácido gálico ($37.3 \mu\text{g/mL}$), con un valor de $11.4 \mu\text{g/mL}$ de ácido elágico. También se obtuvo catequina (pico 2), rutina (pico 7) y quercetina (pico 9), pero en concentraciones bajas (Cuadro 6).

Por el contrario, la fracción clorofórmica está enriquecida por ácido elágico y flavonoides, encontrando un contenido mayor también de quercetina y rutina. En bajas concentraciones, se encontraron el ácido gálico y la catequina, sin observarse la presencia de ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido cafeico y epicatequina. El mayor contenido fue para ácido elágico ($44.37 \mu\text{g/mL}$), quercetina ($27.2 \mu\text{g/mL}$) y rutina ($18.7 \mu\text{g/mL}$) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Contenido de compuestos fenólicos identificados y cuantificados por HPLC del extracto metanólico y fracción clorofórmica de frutos de *Potentilla indica*.

No. de Pico	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Extracto metanólico	Fracción clorofórmica
			µg/mL	
1	Ácido gálico	5.64	37.3	1.11
2	Catequina	12.27	0.75	2.3
3	Ácido vanílico	15	4.7	0
4	Ácido cafeico	15.5	0	0
5	Epicatequina	16.5	0	0
6	Ácido p-cumárico	20	21.1	0
7	rutina	23	1.12	18.7
8	Ácido elágico	24.8	11.4	44.37
9	quercetina	26	0.87	27.2

Zhu *et al.* (2015) identificaron por HPLC los compuestos fenólicos del extracto etanólico de la parte aérea (tallos y hojas) de *P. indica*; encontrando, entre otros, ácido p-cumárico, quercetina y elagitaninos, reportando que éstos últimos son los compuestos fenólicos mayoritarios. Reportaron además un valor de contenido de ácido elágico de 7.47 µg/mL. Lo anterior concuerda con lo observado para el extracto metanólico y fracción clorofórmica de los frutos maduros de *P. indica*.

Se ha reportado, que este tipo de compuestos fenólicos presentan esta actividad biológica; el ácido elágico aislado de distintas fuentes vegetales, probado en el modelo de edema inducido por carragenina en ratas, ha demostrado inhibir la COX-2 e iNOS, además de reducir la formación de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y aumentar la producción de IL-10 (El-Shitany *et al.*, 2014; Mansouri *et al.*, 2015; BenSaad *et al.*,

2017). Por su parte, la quercetina probada en el mismo modelo, ha demostrado reducir el edema, restaurar los niveles de GSH e inhibir la producción de prostaglandinas y TNF- α (Morikawa *et al.*, 2003; Heeba *et al.*, 2014). Finalmente, la rutina, probada en el modelo antes mencionado, redujo significativamente el edema, en un comportamiento dependiente de la dosis, además de inhibir a la COX-2 (Selloum *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2018).

Por el contenido de ácido elágico, quercetina y rutina, observados en la fracción clorofórmica, se sugiere que éstos podrían ser los responsables del efecto de la alta actividad antiinflamatoria mostrado por esta fracción.

CONCLUSIONES

Con la administración tópica y oral de 1 mg/kg de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de los frutos de *Potentilla indica*, se obtuvo la mayor actividad antiinflamatoria con valores de 77.8% y 72%, respectivamente, mediante el ensayo de edema de pata en rata inducido con carragenina. Ambos valores de actividad antiinflamatoria fueron mayores que los mostrados por el extracto metanólico crudo, tanto de forma tópica como oral, a una dosis de 10 mg/kg. Esta actividad biológica en la fracción clorofórmica se debe a que tiene mayor contenido de ácido elágico, quercetina y rutina.

REFERENCIAS

- Ang, H.Y., Subramani, T., Yeap, S.K., Omar, A.R., Ho, W.Y., Abdullah, M.P., & Alitheen, N.B. (2014). Immunomodulatory effects of *Potentilla indica* and *Dendrophthoe pentandra* on mice splenocytes and thymocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(6), 1733–1737.
- Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B. (2016). Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1131412.
- Bag, A., Kumar Bhattacharyya, S., Kumar Pal, N., & Ranjan Chattopadhyay, R. (2013). Anti-inflammatory, anti-lipid peroxidative, antioxidant and membrane stabilizing activities of

- hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* fruits. *Pharmaceutical Biology*, 51(12), 1515-1520.
- BenSaad, L. A., Kim, K. H., Quah, C. C., Kim, W. R., & Shahimi, M.** (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 47.
- Costa, G., Ferreira, J. P., Vitorino, C., Pina, M. E., Sousa, J. J., Figueiredo, I. V., & Batista, M. T.** (2016). Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, 222-228.
- De Araujo, E. R. D., Félix-Silva, J., Xavier-Santos, J. B., Fernandes, J. M., Guerra, G. C. B., de Araújo, A. A., ... & Zucolotto, S. M.** (2019). Local anti-inflammatory activity: Topical formulation containing *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* leaf aqueous extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 113, 108721.
- El-Shitany, N. A., El-Bastawissy, E. A., & El-desoky, K.** (2014). Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *International Immunopharmacology*, 19(2), 290-299.
- Garcia, R., Ferreira, J. P., Costa, G., Santos, T., Branco, F., Caramona, M., ... & Figueiredo, I. V.** (2015). Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activities of *Cymbopogon citratus* in vivo-Polyphenols Contribution. *Research Journal of Medicinal Plant*, 9(1), 1-13.
- George, B. P., Parimelazhagan, T., & Chandran, R.** (2014). Anti-inflammatory and wound healing properties of *Rubus fairholmianus* Gard. root—An in vivo study. *Industrial Crops and Products*, 54, 216-225.
- Habib, M., & Waheed, I.** (2013). Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities of *Artemisia scoparia* hydromethanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 18-24.
- Heeba, G. H., Mahmoud, M. E., & Hanafy, A. A. E.** (2014). Anti-inflammatory potential of curcumin and quercetin in rats: role of oxidative stress, heme oxygenase-1 and TNF- α . *Toxicology and Industrial Health*, 30(6), 551-560.
- Hoesel, B., & Schmid, J. A.** (2013). The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12(1), 86.
- Hoffmann, J., Casetti, F., Bullerkotte, U., Haarhaus, B., Vagedes, J., Schempp, C., & Wölflle, U.** (2016). Anti-inflammatory effects of agrimoniin-enriched fractions of *Potentilla erecta*. *Molecules*, 21(6), 792.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N.** (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.
- Lee, H. J., Shin, J. S., Lee, K. G., Park, S. C., Jang, Y. P., Nam, J. H., & Lee, K. T.** (2017). Ethanol Extract of *Potentilla supina* Linne Suppresses LPS-induced Inflammatory Responses through

- NF- κ B and AP-1 Inactivation in Macrophages and in Endotoxic mice. *Phytotherapy Research*, 31(3), 475-487
- León R. M. L., Alvarado B. A., De Armas G. J. O., Miranda A. L., Varens C. J. A. & Cuesta D. J. Á.** (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay*, 5(1), 47-62.
- Mansouri, M. T., Hemmati, A. A., Naghizadeh, B., Mard, S. A., Rezaie, A., & Ghorbanzadeh, B.** (2015). A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 47(3), 292.
- Misal G., Gouri, D., Gulkari V.** (2012) Formulation and evaluation of herbal gel. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3(4), 501–5.
- Morikawa, K., Nonaka, M., Narahara, M., Torii, I., Kawaguchi, K., Yoshikawa, T., ... & Morikawa, S.** (2003). Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, 74(6), 709-721.
- Negi, A., Sharma, N., & Singh, M. F.** (2012). Formulation and evaluation of an herbal anti-inflammatory gel containing *Eupatorium* leaves extract. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(4), 112-117.
- Ndebia, E. J., Kamgang, R., & Nkeh-ChungagAnye, B. N.** (2007). Analgesic and anti-inflammatory properties of aqueous extract from leaves of *Solanum torvum* (Solanaceae). *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(2), 240-244.
- Rauf, A., Khan, R., Khan, H., Pervez, S., & Pirzada, A. S.** (2014). *In vivo* antinociceptive and anti-inflammatory activities of umbelliferone isolated from *Potentilla evestita*. *Natural Product Research*, 28(17), 1371-1374.
- Sakat, S. S., Mani, K., Demidchenko, Y. O., Gorbunov, E. A., Tarasov, S. A., Mathur, A., & Epstein, O. I.** (2014). Release-active dilutions of diclofenac enhance anti-inflammatory effect of diclofenac in carrageenan-induced rat paw edema model. *Inflammation*, 37(1), 1-9.
- Selloum, L., Bouriche, H., Tigrine, C., & Boudoukha, C.** (2003). Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 54(4), 313-318.
- Sofidiya, M. O., Imeh, E., Ezeani, C., Aigbe, F. R., & Akindede, A. J.** (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Alafia barteri*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(3), 348-354.
- Sugishita, E., Amagaya, S., & Ogihara, Y.** (1981). Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *Journal of Pharmacobio-dynamics*, 4(8), 565-575.
- Vetal, S., Bodhankar, S. L., Mohan, V., & Thakurdesai, P. A.** (2013). Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats. *Food Science and Human Wellness*, 2(2), 59-67.

- Winter, C.A., Risley, E.A., & Nuss, G.W.** (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111(3), 544-547.
- Yang, E.J., Lee, J.S., Yun, C.Y., Kim, J.H., Kim, J.S., Kim, D.H., & Kim, I.S.** (2008). Inhibitory effects of *Duchesnea chrysanth* extract on ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of asthma. *Journal of Ethnopharmacology*, 118(1), 102–107.
- Zhu, M., Dong, X., & Guo, M.** (2015). Phenolic Profiling of *Duchesnea indica* Combining Macroporous Resin Chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. *Molecules*, 20(12), 22463-22475.
- Zhao, L., Zhang, S. L., Tao, J. Y., Jin, F., Pang, R., Guo, Y. J, ... & Zheng, G. H.** (2008). Anti-inflammatory mechanism of a folk herbal medicine, *Duchesnea indica* (Andr) Focke at RAW264. 7 cell line. *Immunological Investigations*, 37(4), 339-357.
- Zhao, J., Maitituersun, A., Li, C., Li, Q., Xu, F., & Liu, T.** (2018). Evaluation on analgesic and anti-inflammatory activities of total flavonoids from *Juniperus sabina*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

7.3. CAPÍTULO III. Determinación de la actividad antiartrítica del extracto metanólico y la fracción clorofórmica de frutos de falsa fresa (*Potentilla indica*) en ratas Wistar macho artríticas.

Resumen

Potentilla indica es una planta usada en la medicina tradicional de Asia para tratar enfermedades en las que intervienen procesos inflamatorios y en estudios previos se determinó que el extracto metanólico y la fracción clorofórmica de los frutos de *P. indica*, mostraron una alta actividad antioxidante y antiinflamatoria, relacionado con el contenido de compuestos fenólicos, particularmente el de flavonoides (Capítulo I y Capítulo II). En esta investigación se evaluó el efecto de este extracto y la fracción clorofórmica en ratas Wistar macho artríticas, utilizando un modelo de artritis inducida por colágeno tipo II y adyuvante incompleto de Freund. Para la evaluación clínica de la enfermedad se utilizó un índice artrítico que considera 5 puntos en escala de 0-4, de acuerdo a inflamación y sintomatología. Tanto el extracto metanólico como la fracción clorofórmica fueron administrados de manera oral (50 µL) durante 28 días en una dosis de 10 mg/kg y 1 mg/kg, respectivamente. Los resultados indican que el extracto metanólico retrasó significativamente los síntomas de la enfermedad, manteniendo signos artríticos de índice 1 durante 18 días, lo cual fue similar al comportamiento observado en el tratamiento con dexametasona; además, con la administración de este extracto no se observaron cambios en los niveles séricos de glucosa, ácido úrico, creatinina, colesterol total, triglicéridos y urea, con una disminución en los parámetros del factor reumatoide y proteína C reactiva. Lo anterior sugiere que el extracto metanólico de frutos de *P. indica* muestra protección renal y hepática, así como un efecto en la regulación de mediadores que intervienen en el desarrollo de la artritis reumatoide.

Palabras clave: Adyuvante incompleto de Freund, artritis inducida por colágeno tipo II, factor reumatoide, índice antiartrítico, proteína C reactiva.

Abstract

Potentilla indica is a plant used in Asian traditional medicine to treat diseases in which inflammatory processes are involved and in previous studies determine that the methanolic extract and the chloroformic fraction of *P. indica* fruits, showed a high antioxidant and anti-inflammatory activity, related to the content of phenolic compounds, particularly flavonoids (Chapter I and Chapter II). This research evaluated the effect of this extract and the chloroformic fraction in arthritic male Wistar rats using a model of type II collagen II-induced arthritis and incomplete Freund's adjuvant. An arthritic index considered 5 points in one 0-4 scale, which is based in the inflammation and symptomatology, was used for the clinical evaluation of the disease. Both the methanolic extract and the chloroformic fraction were administered orally (50 µL) for 28 days at a dose of 10 mg/kg and 1 mg/kg, respectively. The results indicate that the methanolic extract significantly delayed the symptoms of the disease, maintaining an arthritic index of 1 for 18 days, which was

similar to the behavior observed in dexamethasone treatment; In addition, no changes were observed in serum glucose, creatinine, uric acid and urea levels with the administration of this extract, however, a decrease in the rheumatoid factor and C-reactive protein were found. This suggests that the methanolic extract of *P. indica* fruits shows renal and hepatic protection, as well as an effect on the regulation of mediators involved in the development of rheumatoid arthritis.

Key words: Antiarthritic index, C-reactive protein, incomplete Freund's adjuvant, rheumatoid factor, Type II collagen-induced arthritis,

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune y deformante de las articulaciones de etiología poco conocida. Se caracteriza por cambios destructivos en el cartílago, articulación y hueso, además de hiperplasia sinovial causada por una gran infiltración de leucocitos y una proliferación de fibroblastos sinoviales y la expresión de altos niveles de citocinas proinflamatorias, entre las que destacan el TNF- α , la IL-1, la IL-6 y la IL-8 (Watson y Preedy, 2013; Uotsu *et al.*, 2016).

Esta enfermedad actualmente la padece el 1% de la población mundial y desafortunadamente aún no tiene cura. Las terapias actuales están dirigidas a aliviar la inflamación, el dolor y el daño en las articulaciones. Éstas incluyen antiinflamatorios no esteroideos, glucocorticoides y anticuerpos monoclonales (Kaur *et al.*, 2012; Uotsu *et al.*, 2016). No obstante, la mayoría de éstos tienen efectos secundarios indeseables.

Con el propósito de explorar antiartríticos en compuestos derivados de plantas, como una alternativa a los agentes terapéuticos actuales, por considerarlos más seguros, pocos se han estudiado y algunos como la curcumina, han mostrado tener efecto antiartrítico al evitar la activación de células B y T, macrófagos, neutrófilos, o por inhibir la activación de NF κ B e inducir la apoptosis de fibroblastos sinoviales (Kaur *et al.*, 2012). La actividad antiartrítica de los extractos vegetales se puede evaluar de varias formas, siendo el más utilizado el modelo de artritis inducido por

colágeno tipo II, ya que tiene una gran semejanza con la artritis reumatoide humana al ser un proceso impulsado por el complejo de histocompatibilidad restringido de células T y caracterizado por inflamación sinovial, formación de pannus, deformación e inmovilización de las articulaciones, generación de auto anticuerpos y presencia de factor reumatoide (Ierna *et al.*, 2010).

Debido a que diversos extractos de especies de *Potentilla* (*P. indica* y *P. chrysantha*), plantas de la familia Rosaceae originarias de Asia, han demostrado tener actividad antioxidante (Kim *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011), antiinflamatoria (Yang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008) e inmunomoduladora (Ang *et al.*, 2014), y en nuestro grupo de trabajo se ha evaluado el efecto antioxidante y antiinflamatorio del extracto metanólico de los frutos de *P. indica* y de la fracción clorofórmica, es de interés analizar el efecto antiartrítico de éstos.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar la actividad antiartrítica del extracto metanólico y de la fracción clorofórmica de los frutos de *P. indica*, en ratas Wistar macho utilizando un modelo de artritis inducida por colágeno tipo II y adyuvante incompleto de Freund.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos de *P. indica*. Los frutos maduros de *P. indica* se obtuvieron de plantas cultivadas en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Después de cada colecta los frutos fueron almacenados a -20°C.

Animales. Se utilizaron ratas Wistar macho de 6 meses de edad (450g), reproducidas y mantenidas en el bioterio del IIQB de la UMSNH, según la normatividad para el cuidado de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999).

Obtención del extracto y fracción clorofórmica. Los frutos de *P. indica* fueron pulverizados con nitrógeno líquido en licuadora comercial. La extracción se realizó por maceración con metanol en frío (4°C durante cinco días en oscuridad). Por cada 100 g de frutos pulverizados se añadieron 1000 mL de metanol frío. Para la obtención del extracto, el macerado se filtró en embudo con papel Whatman No.1, descartando el material vegetal, sometiendo el extracto a evaporación a sequedad en rotavapor (45° C) al vacío. El extracto fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% a una concentración de 100 mg/mL, el cual fue almacenado en congelación y oscuridad. La fracción clorofórmica (F.CHCl₃) se obtuvo por extracción líquido-líquido del extracto metanólico, utilizando cloroformo para separación de fases en un embudo de separación. Finalmente, la fracción fue evaporada a sequedad en rotavapor (45° C) y disuelta en DMSO al 5% a una concentración de 10 mg/mL.

Inducción de artritis. La artritis se indujo con el método descrito por Song *et al.* (2015), que consistió en inyectar de manera intradérmica en la base de la cola un total de 100 µL de una emulsión que contenía volúmenes iguales de adyuvante incompleto de Freund y colágeno de pollo tipo II disuelto en 0.05 M de ácido acético, con una concentración final de 1 mg/mL. A los 7 días después de la primera inmunización se administró un refuerzo (100 µL) de la emulsión antes mencionada. La evaluación clínica del desarrollo de la artritis inducida por colágeno se realizó por observación semanal de los signos o síntomas artríticos en las patas y articulaciones, los cuales son caracterizados por edema, eritema, e inmovilización de la extremidad. Se midió el diámetro de las extremidades con un micrómetro digital y se evaluó la severidad de la artritis de acuerdo al índice artrítico descrito por Ierna *et al.* (2010) (Cuadro 7).

Administración del extracto metanólico y fracción clorofórmica. Para el ensayo antiartrítico se utilizaron diversos tratamientos utilizando los grupos de ratas que se describen en el cuadro 8.

Cuadro 7. Índice artrítico en artritis inducida con adyuvante incompleto de Freund y colágeno de pollo tipo II en ratas Wistar (Ierna *et al.*, 2010).

Índice Artrítico	Signos artríticos
0	Sin hinchazón o eritema.
1	Enrojecimiento e hinchazón leve pero definidos del tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón aparentes limitados a dedos individuales, independientemente del número de dedos afectados.
2	Enrojecimiento moderado e hinchazón de tobillo o muñeca.
3	Enrojecimiento intenso e hinchazón de toda la pata, incluidos los dedos.
4	Miembro con inflamación máxima con afectación de múltiples articulaciones.

Cuadro 8. Grupos de ratas Wistar macho (n=3), utilizados para la determinación del efecto antiartrítico con administración oral por 28 días del extracto metanólico y fracción clorofórmica de frutos de *Potentilla indica*.

Grupos		Tratamiento
Grupo 1	RA-MeOH	Ratas artríticas administradas con extracto metanólico en dosis de 10 mg/kg (mejor dosis observada en el ensayo inflamatorio del capítulo II).
Grupo 2	RA-F.CHCl₃	Ratas artríticas administradas con fracción clorofórmica en dosis de 1 mg/kg (mejor dosis observada en el ensayo inflamatorio del capítulo II).
Grupo 3	RA-DEX	Ratas artríticas administradas con dexametasona en dosis de 0.01 mg/kg.
Grupo 4	RA-DKE	Ratas artríticas administradas con dexketoprofeno en dosis de 0.1 mg/kg.
Grupo 5	RA-ST	Ratas artríticas sin tratamiento.
Grupo 6	R-NA-ST	Ratas no artríticas sin tratamiento.

La administración de todas las sustancias se hizo por vía oral, administrándose durante 28 días y aplicando en todos los casos un volumen de 50 μ L, empezando a administrarse 14 días después de la inducción de la artritis, ya que fue el momento en el que se observó la aparición de los primeros signos artríticos.

Química sanguínea y estudio inmunológico. Después de la eutanasia, la sangre fue colocada en tubos BD Vacutainer, dejando coagular para posteriormente obtener el suero con centrifugación a 3,500 rpm/10 min. El suero fue analizado mediante pruebas de química sanguínea (glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, colesterol total y triacilglicéridos) a través del equipo Dri-Chem NX500i Fujifilm e inmunológicas como el factor reumatoide (FR) y la proteína C reactiva por aglutinación en placa. Para el FR se utilizó el anticuerpo IgM y para la proteína C, el anticuerpo IgG de cabra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las ratas que no fueron inducidas a desarrollar la artritis reumatoide (R-NA-ST), no mostraron cambios en sus extremidades (patas) y articulaciones durante los 28 días de la experimentación, considerando a este grupo con un índice artrítico de cero (0). Sin embargo, el desarrollo de la enfermedad pudo constatararse en todos los grupos de ratas inducidas, mostrando al día 1 (14 días después de la primera inducción), un índice artrítico de 1. Posteriormente cada 10 días se observaron los cambios y se registraron los valores del índice artrítico. En el grupo de ratas artríticas a las que no se les administró ningún tratamiento (RA-ST), desde el día 10 se observó un índice artrítico de 3, que se mantuvo a los 18 días, alcanzando el máximo valor de 4, a los 28 días (Cuadro 9).

Con la administración del extracto metanólico de frutos de *P. indica* (RA-MeOH), las ratas inducidas a desarrollar artritis reumatoide, mostraron síntomas del índice artrítico 1, el que se mantuvo sin cambios durante 18 días, sin embargo, a los 28 días, se observaron signos del índice 3. Aunque con la administración de la fracción clorofórmica de este extracto (RA-F.CHCl₃), el efecto fue similar, el índice artrítico alcanzado fue de 2 hasta los 18 días, pero mostraron síntomas de la artritis que se presentaron en las ratas del grupo RA-ST, con un índice de 4. Solamente con el tratamiento con dexametasona (DEX), las ratas mantuvieron un índice artrítico de 1 durante toda la fase de experimentación, no así con las tratadas con dexketoprofeno

(DKE), las que de manera paulatina, desarrollaron la artritis reumatoide a lo largo del experimento, alcanzando el índice de 4 a los 28 días (Cuadro 9).

Cuadro 9. Índices de artritis en ratas artríticas Wistar macho con la administración oral del extracto metanólico y la fracción clorofórmica de frutos de *Potentilla indica*.

Grupos de ratas	Índices Artríticos			
	Días			
	1	10	18	28
R-NA-ST (grupo 6)	0	0	0	0
RA-ST (grupo 5)	1	3	3	4
RA-MeOH (grupo 1)	1	1	1	3
RA-F.CHCl ₃ (grupo 2)	1	2	2	4
RA-DEX (grupo 3)	1	1	1	1
RA-DKE (grupo 4)	1	2	3	4

En la figura 9 se muestran las fotografías representativas de una de las extremidades de las ratas utilizadas durante el ensayo de la inducción de la artritis reumatoide, sin tratamiento y tratadas con el extracto metanólico y la fracción clorofórmica de frutos de *P. indica*, así como los antiinflamatorios DEX y DKE. Al tiempo inicial, previo a la inmunización para el desarrollo de la artritis reumatoide, el diámetro de la parte plantar al empeine fue de 6.73 mm, sin que se observara enrojecimiento y signos de artritis (índice 0) (Figura 9A).

A los 14 días posterior a la primera inmunización con la emulsión, se observaron los primeros signos de la enfermedad, mostrando rigidez articular en los dedos (índice 1) (Figura 9B) con un aumento de la inflamación de 0.1 mm, por lo que fue considerado como el día 1 para determinar el progreso de la artritis reumatoide. Este índice artrítico se mantuvo sin cambios en ratas artríticas tratadas con DEX. Sin embargo, las ratas artríticas sin tratamiento (RA-ST) presentaron un índice de 3

desde el día 10, ya que se observó un aumento en la inflamación de 1.8 mm, alcanzando un máximo de 3.26 mm a los 28 días, considerando un índice artrítico de 4 (Figura 9C).

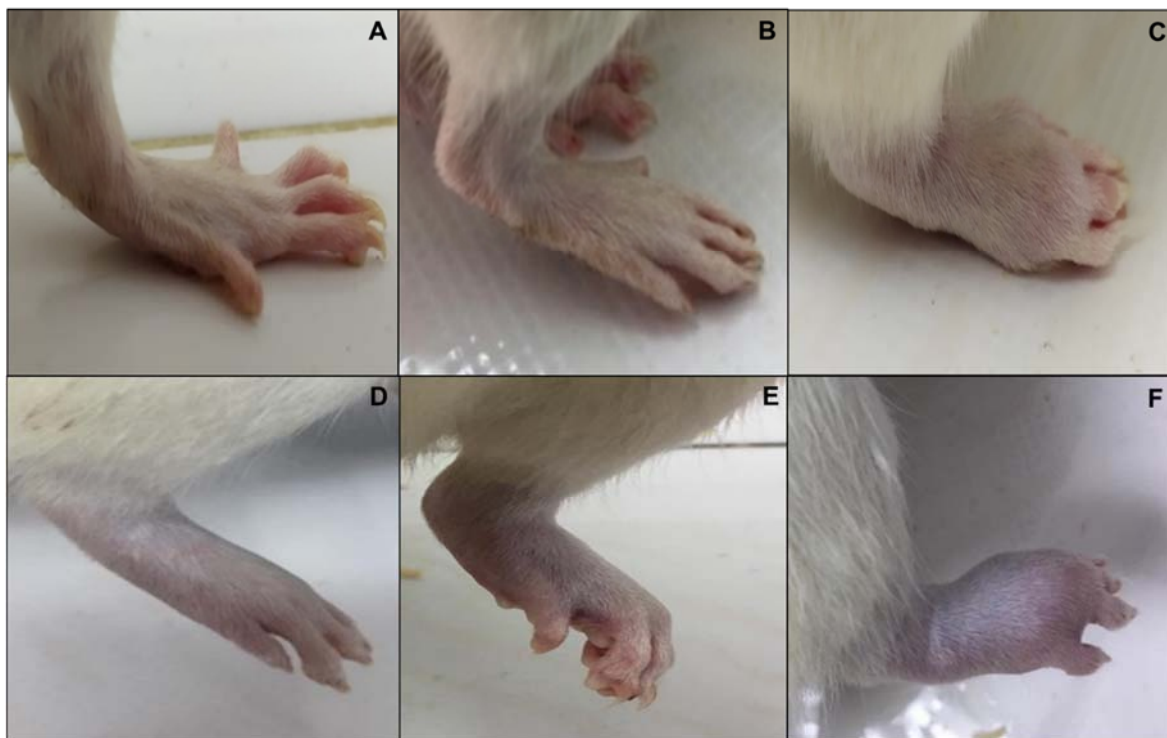


Figura 5. Fotografías representativas de signos desde el inicio de la inducción de la artritis reumatoide experimental en ratas Wistar macho, hasta la máxima inflamación y síntomas representativos de la enfermedad: A) Pata de rata no artrítica sin tratamiento, R-NA-ST (tiempo 0); B) Pata de rata artrítica con un índice artrítico 1, día 1; C) Pata de rata del grupo RA-ST con un índice artrítico de 4, a los 28 días del tratamiento; D) Pata de rata del grupo tratado con el extracto metanólico (RA-MeOH) de frutos de *P. indica*, con un índice artrítico de 3, a los 28 días del tratamiento; E) Pata de rata del grupo tratado con la fracción clorofórmica (RA-F. CHCl_3), con un índice artrítico de 4, a los 28 días del tratamiento; F) Pata de rata con un índice artrítico de 4, del grupo tratado con DKE, a los 28 días del tratamiento (RA-DKE).

Con la administración del extracto metanólico (RA-MeOH) de los frutos de *P. indica*, el progreso de los síntomas de la artritis reumatoide fue detenido, mostrando signos de un índice artrítico de 1 hasta los 18 días, sin embargo, a los 28 días, se observaron síntomas de un índice de 3, con una inflamación máxima 1.5 mm, con

signos claros de enrojecimiento y rigidez en los dedos (Figura 9D). A diferencia de este resultado, un menor efecto de la fracción clorofórmica en las ratas artríticas (RA-F.CHCl₃) se presentó ya que se obtuvieron índices artríticos de 2 a los 10 y 18 días, y se observaron signos de un índice artrítico de 4 a los 28 días, con una inflamación máxima de 3.5 mm (Figura 9E).

A pesar de que el dexketoprofeno (DKE) es un medicamento antiinflamatorio, desde los 10 días no fue capaz de detener el progreso de la enfermedad, con un claro aumento en la inflamación, enrojecimiento y la falta de movilidad en las extremidades, pasando de un índice artrítico 1 hasta el 3 a los 18 días y alcanzando un índice de 4 a los 28 días de la experimentación. A este tiempo, se presentó una inflamación máxima de 4.37 mm (Figura 9F).

Estos resultados demuestran un efecto antiinflamatorio mayormente del extracto metanólico, el cual ha demostrado inhibir la inflamación aguda en un 46.94% (capítulo II), pero además retrasó la aparición de síntomas de la artritis reumatoide hasta los 18 días con la administración de 10 mg/kg, lo que no permitió que se presentaran signos graves (índice artrítico 4). Debido a que con la administración de la fracción clorofórmica (1 mg/kg), no se obtuvo un efecto antiartrítico, el extracto metanólico de los frutos de *P. indica*, podría ser considerado con un potencial antiartrítico, aunque es posible que esta fracción tenga este mismo efecto a la dosis de 10 mg/kg. La dexametasona (0.01 mg/kg) demostró tener la mayor actividad antiartrítica, ya que mostró puntuaciones de severidad artrítica de 1, con una inhibición de la inflamación del 100%.

Un efecto antiartrítico con la aplicación de extractos vegetales se ha reportado en diversas investigaciones, el isoeugenol, un compuesto de naturaleza fenólica, con alta actividad antioxidante y antiinflamatoria, mostró índices artríticos de 2 y 3 con la administración vía oral de las dosis de 10 mg/kg y 25 mg/kg en ratas Wistar macho artríticas inducidas con adyuvante completo de Freund, respectivamente, a los 24 días después de la inducción (Kaur *et al.*, 2012). En este mismo modelo, un

resultado similar fue demostrado con la administración vía oral de 50 y 200 mg/kg del extracto hidroalcohólico de corteza de *Punica granatum* durante 21 días, presentando un retraso el avance de la enfermedad, con índices de 2 y 3 (Karwasra *et al.*, 2019). Resultados similares se han reportado con la administración de dosis altas con el extracto etanólico de los frutos de *Xanthium strumarium* (Lin *et al.*, 2014) y de las raíces de *Litsea cubeba* (Lin *et al.*, 2013), que utilizando el mismo modelo experimental, no presentan un alto efecto antiartrítico pero si retrasan o inhiben algunos síntomas, como el enrojecimiento, la inflamación y movilidad de las extremidades. Esto concuerda con lo obtenido para el extracto metanólico de los frutos de *P. indica*, el cual podría tener potencial para retrasar los síntomas durante la artritis reumatoide.

Marcadores bioquímicos e inmunológicos en suero de ratas artríticas

Para relacionar el progreso de la artritis reumatoide en las ratas Wistar macho tratadas con el extracto metanólico de frutos de *P. indica*, de la fracción clorofórmica de éste, así como con los antiinflamatorios dexametasona y dexketoprofeno, se determinaron en suero, marcadores bioquímicos como glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, colesterol total y triacilglicéridos, y los marcadores inmunológicos como el factor reumatoide (FR) y la proteína C reactiva (Cuadro 10).

Los valores de glucosa y urea, aunque variaron dependiendo de los tratamientos, éstos están dentro de las cifras de referencia para rata, según lo establecido por León *et al.* (2011) (cuadro 11), que reportan niveles normales de 43-152.7 mg/dL de glucosa y 38-63.3 mg/dL de urea. Sin embargo, el contenido de ácido úrico, creatinina, colesterol total y triacilglicéridos, fueron más altos y fuera de los límites de referencia (Cuadro 10, cuadro 11), en las ratas artríticas sin tratamiento (RA-ST) y en las tratadas con DKE y DEX, a excepción de los niveles de triacilglicéridos, los que solo se ven aumentados en el grupo de ratas RA-ST.

Cuadro 10. Marcadores bioquímicos e inmunológicos en suero de ratas Wistar macho artríticas, tratadas con el extracto metanólico y la fracción clorofórmica de los frutos de *Potentilla indica*.

Marcadores en suero	Grupo Experimental					
	R-NA-ST	RA-ST	RA-MeOH	RA-F.CHCl ₃	RA-DEX	RA-DKE
Glucosa¹	68.1 ± 4.5 ^a	98.3 ± 10.1 ^b	102.6 ± 7.5 ^b	92.7 ± 6.4 ^b	102.2 ± 9.9 ^b	124.61 ± 7.2 ^c
Urea¹	38.33 ± 5.2 ^a	44.56 ± 3.7 ^b	36.43 ± 4.7 ^a	43.07 ± 3.1 ^{ab}	40.42 ± 4.7 ^{ab}	45.35 ± 3.1 ^c
Ác. úrico¹	1.16 ± 0.09 ^a	2.02 ± 0.11^c	1.23 ± 0.19 ^b	1.33 ± 0.18 ^b	2.01 ± 0.99^c	2.04 ± 0.19^d
Creatinina¹	0.62 ± 0.05 ^b	1.12 ± 0.9^e	0.59 ± 0.09 ^a	0.68 ± 0.7 ^c	0.82 ± 0.07^d	0.109 ± 0.11^e
Colesterol total¹	61.59 ± 5.1 ^a	132.51 ± 9.7^c	63.4 ± 3.7 ^a	85.72 ± 6.2 ^b	127.9 ± 10.1^c	128.6 ± 9.8^c
Triacil-glicéridos¹	62.63 ± 6.1 ^a	113.95 ± 10.1^d	69.22 ± 3.4 ^a	76.3 ± 3.1 ^b	93.86 ± 8.3 ^c	91.78 ± 6.1 ^c
FR²	1.1 ± 0.2 ^a	6.6 ± 0.5^c	1.3 ± 0.2 ^a	1.5 ± 0.11 ^{ab}	3.3 ± 0.2 ^b	3.5 ± 0.2 ^b
Proteína C³	1.2 ± 0.11 ^a	5.5 ± 0.5^d	1.8 ± 0.1 ^b	1.3 ± 0.58 ^b	2.8 ± 0.14 ^c	2.7 ± 0.11 ^c

¹mg/dL; ²UI/mL; ³mg/L

Cuadro 11. Valores de referencia de parámetros bioquímicos en suero de ratas (León *et al.*, 2011; SPINREACT, México).

Parámetro	Valor de Referencia (normales)
Glucosa (mg/dL)	43-152-7
Urea (mg/dL)	38-63.3
Ácido úrico (mg/dL)	0.88-1.66
Creatinina (mg/dL)	0.32-0-71

Colesterol total (mg/dL)	44.4-96.9
Triacil-glicéridos (mg/dL)	26.7-99.9
Factor reumatoide (UI/mL)	>5 Unidades Internacionales
Proteína C reactiva (mg/L)	>6

La ratas artríticas tratadas con extracto metanólico (RA-MeOH) y con fracción clorofórmica (RA-F.CHCl₃) mantuvieron niveles normales de ácido úrico, creatinina, colesterol total y triacilglicéridos; esto indica que la administración continua por vía oral de éstos en ratas artríticas puede prevenir posibles daños renales, hepáticos y cardiovasculares durante la evolución de la enfermedad, a diferencia de los antiinflamatorios convencionales (dexametasona y dexketoprofeno) que muestran posibles efectos secundarios dañinos. Lo anterior concuerda con lo reportado en la literatura donde extractos de distintas plantas (*Strychnos potatorum*, *Glycosmis pentaphylla*, *Tridax procumbens*, *Mangifera indica*, *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis*) han mantenido niveles normales de parámetros bioquímicos en suero cuando son administrados por vía oral en ratas artríticas (artritis inducida por adyuvante de Freund) (Ekambaram *et al.*, 2010; Abdel-Moein *et al.*, 2011; Petchi *et al.*, 2015).

En cuanto a los niveles del FR y la proteína C reactiva, éstos solo se observaron elevados, en el límite considerado para artritis reumatoide establecida (>5 Unidades Internacionales (UI)/mL), en las ratas artríticas sin tratamiento (Cuadro 10). Observándose que en los grupos RA-MeOH y RA-F.CHCl₃, se redujeron significativamente los valores de factor reumatoide (FR), siendo estos valores incluso menores que el obtenido para el grupo RA-DEX. Para el caso del valor de proteína C reactiva el único grupo que tuvo valores por encima del límite (cuadro 11) fue el RA-ST, indicando que tanto el extracto, la fracción y los medicamentos antiinflamatorios utilizados tienen efecto en disminuir este parámetro.

Extractos de distintas plantas han disminuido el FR y la proteína C reactiva cuando son administrados por vía oral de manera continua en ratas Wistar artríticas

inducidas por adyuvante completo de Freund; ejemplos de estos son el extracto metanólico del material vegetal de *Cyathocline purpurea* y los extractos etanólicos del material de vegetal de *Terminalia bellirica* y *Commiphora wightii* (Patel y Pundarikakshudu, 2016) Cabe mencionar que dichos extractos se administran a dosis superiores a 100 mg/kg, lo que nos indica que el extracto metanólico de los frutos de *P. indica* tiene un efecto similar a una dosis menor.

Este efecto antiartrítico que muestra el extracto metanólico de los frutos de *P. indica* se puede deber al alto contenido de flavonoides (Capítulo I), el cual es más alto que el contenido de éstos para la fracción clorofórmica. Este alto contenido de flavonoides del extracto metanólico además ha demostrado tener casi un 50% de actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda (Capítulo II). La literatura ya ha reportado distintos flavonoides que cuando son administrados de manera oral han ayudado a controlar la artritis. Así, por ejemplo, la naringenina ha mostrado actividad antiartrítica, ya que al ser administrada de manera oral en dosis de 100 mg/kg en un modelo de artritis inducida por colágeno bovino tipo II y adyuvante completo de Freund en ratones, ésta redujo la activación de NFκB, los niveles de anti colágeno tipo II y limitó la proliferación de células T (Li *et al.*, 2015). Así mismo, la nobiletina, utilizada en el modelo antes mencionado, al ser administrada de manera intraperitoneal en dosis de 60 mg/kg detuvo significativamente la inflamación y la erosión del cartílago y del hueso, manteniendo un índice artrítico de 2 durante toda la experimentación (Imada *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

El extracto metanólico de los frutos maduros de *Potentilla indica* mostró retrasar los síntomas de la artritis inducida por colágeno tipo II y adyuvante incompleto de Freund, lo que indica que tiene potencial para ser usado como agente terapéutico en la artritis reumatoide.

REFERENCIAS

- Abdel-Moein, N. M., Abdel-Moniem, E. A., Mohamed, D. A., & Hanfy, E. A.** (2011). Evaluation of the anti-inflammatory and anti-arthritis effects of some plant extracts. *Grasas y aceites*, 62(4), 365-374.
- Ang, H.Y., Subramani, T., Yeap, S.K., Omar, A.R., Ho, W.Y., Abdullah, M.P., & Alitheen, N.B.** (2014). Immunomodulatory effects of *Potentilla indica* and *Dendrophthoe pentandra* on mice splenocytes and thymocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(6), 1733–1737.
- Ekambaram, S., Perumal, S. S., & Subramanian, V.** (2010). Evaluation of antiarthritic activity of *Strychnos potatorum* Linn seeds in Freund's adjuvant induced arthritic rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1), 56.
- Hu, W., Shen, W., & Wang, M. H.** (2009). Free radical scavenging activity and protective ability of methanolic extract from *Duchesnea indica* against protein oxidation and DNA damage. *Preventive Nutrition and Food Science*, 14(4), 277-282.
- Hu, W., Han, W., Huang, C., & Wang, M. H.** (2011). Protective effect of the methanolic extract from *Duchesnea indica* against oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31(1), 42-50.
- Ierna, M., Kerr, A., Scales, H., Berge, K., & Griinari, M.** (2010). Supplementation of diet with krill oil protects against experimental rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 11(1), 136.
- Imada, K., Lin, N., Liu, C., Lu, A., Chen, W., Yano, M., ... & Ito, A.** (2008). Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and-2 in collagen-induced arthritic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(2), 181-185.
- Kaur, G., & Sultana, S.** (2012). Evaluation of antiarthritic activity of isoeugenol in adjuvant induced arthritis in murine model. *Food and Chemical Toxicology*, 50(8), 2689-2695.
- Karwasra, R., Singh, S., Sharma, D., Sharma, S., Sharma, N., & Khanna, K.** (2019). Pomegranate supplementation attenuates inflammation, joint dysfunction via inhibition of NF-κB signaling pathway in experimental models of rheumatoid arthritis. *Journal of Food Biochemistry*, e12959.
- Kim, I. G., Jung, I. L., Oh, T. J., Kim, K. C., & Shim, H. W.** (2002). Polysaccharide-enriched fraction isolated from *Duchesnea chrysantha* protects against oxidative damage. *Biotechnology Letters*, 24(16), 1299-1305.
- León, G.A.C., Blanco D., Peña A., Ronda M., González B.O., Arteaga M.E., Bada A.M., González Y. y Mancebo A.** (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB. *Revista electrónica de Veterinaria*, 12(11), 1-10.

- Li, Y. R., Chen, D. Y., Chu, C. L., Li, S., Chen, Y. K., Wu, C. L., & Lin, C. C.** (2015). Naringenin inhibits dendritic cell maturation and has therapeutic effects in a murine model of collagen-induced arthritis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1467-1478.
- Lin, B., Zhang, H., Zhao, X. X., Rahman, K., Wang, Y., Ma, X. Q., ... & Qin, L. P.** (2013). Inhibitory effects of the root extract of *Litsea cubeba* (lour.) pers. on adjuvant arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 147(2), 327-334.
- Lin, B., Zhao, Y., Han, P., Yue, W., Ma, X. Q., Rahman, K., ... & Han, T.** (2014). Anti-arthritic activity of *Xanthium strumarium* L. extract on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 248-255.
- Patel, M. G., & Pundarikakshudu, K.** (2016). Anti-arthritic activity of a classical Ayurvedic formulation Vatari Guggulu in rats. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 6(4), 389-394.
- Petchi, R. R., Parasuraman, S., Vijaya, C., Krishna, S. G., & Kumar, M. K.** (2015). Antiarthritic activity of a polyherbal formulation against Freund's complete adjuvant induced arthritis in Female Wistar rats. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 6(3), 77.
- Song, H. P., Li, X., Yu, R., Zeng, G., Yuan, Z. Y., Wang, W., ... & Cai, X.** (2015). Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritis in Wistar rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4), 1483-1488.
- Uotsu, N., Shen, M., Yazawa, K., & Teramoto, S.** (2016). Suppression of Arthritis Progression with Lutein Extracted from *Tagetes erecta* in Collagen-Induced Arthritis Model Rats. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)*, 16(2), 134-141.
- Watson, R. R., & Preedy, V. R. (Eds.).** (2013). *Bioactive food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases*. Waltham, EUA: Academic press.
- Yang, E.J., Lee, J.S., Yun, C.Y., Kim, J.H., Kim, J.S., Kim, D.H., & Kim, I.S.** (2008). Inhibitory effects of *Duchesnea chrysantha* extract on ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of asthma. *Journal Ethnopharmacology*, 118(1), 102-107.
- Zhao, L., Zhang, S. L., Tao, J. Y., Jin, F., Pang, R., Guo, Y. J., ... & Zheng, G. H.** (2008). Anti-inflammatory mechanism of a folk herbal medicine, *Duchesnea indica* (Andr) Focke at RAW264. 7 cell line. *Immunological Investigations*, 37(4), 339-357.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Algunos compuestos fenólicos de origen vegetal se han reportado con actividad para reducir el daño durante la inflamación o en enfermedades en las que intervienen procesos inflamatorios, ayudando además a reducir el estrés oxidante causado por estas condiciones (Tangney y Rasmussen, 2013). Por lo tanto, en los últimos años, diversas investigaciones se realizan con el propósito de encontrar en diversas plantas o sus flores y frutos, compuestos de tipo fenólico que tengan múltiples beneficios, como actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiartrítica, entre otros.

Es por ello, que en la presente investigación, se estudiaron este tipo de actividades biológicas en extractos metanólicos de frutos maduros de *Potentilla indica*, una planta de la familia Rosaceae, que como planta completa ha demostrado tener actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica (Kim *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012), aunque los estudios con frutos son escasos y se desconoce la relación del contenido de los compuestos fenólicos con la actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria y antiartrítica.

Efecto de compuestos fenólicos de frutos de *P. indica* sobre la actividad antioxidante *in vitro*

Aunque el extracto metanólico de los frutos de *P. indica* mostró un alto contenido de flavonoides totales (14.525 μ moles Eq. Quercetina/g peso fresco), los porcentajes de actividad antioxidante fueron considerablemente bajos, menores al 55% en los tres ensayos (TAC, DPPH y ABTS), un comportamiento similar fue observado por la fracción metanólica derivada de este extracto. Sin embargo, la fracción clorofórmica presentó la actividad antioxidante más alta por los tres métodos empleados, con 67.90%, 67.25% y 44.51% para TAC, DPPH y ABTS, respectivamente (Figura 3), encontrando para TAC una IC₅₀ de 0.675 mg/mL y para DPPH de 0.807 mg/mL (anexo 11.1 y 11.2). Estos valores son similares a los de

extractos etanólicos de diversos frutos como frambuesa (*Rubus idaeus*) (0.80 mg/mL), frambuesa negra (*Rubus occidentalis*) (1.15 mg/mL) y arándano (*Vaccinium myrtillus*) (0.82 mg/mL) (Šavikin *et al.*, 2009), pero 1.7 veces menor que los de zarzamora (*Rubus fruticosus*) (1.40 mg/mL) y 7 veces menor que lo presentados por los frutos de fresa (*Fragaria × ananassa*) (5.60 mg/mL) (Hangun-Balkir y McKenney, 2012). Esto indica una alta actividad antioxidante de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de los frutos de *P. indica*.

Estos valores se relacionan directamente con el contenido más alto obtenido, tanto de ácidos fenólicos totales (0.615 μ moles Eq. Ácido Gálico/g peso fresco) como de antocianinas totales (0.0028 mg Eq. Cianidina/mg de extracto), compuestos que actúan directamente, secuestrando y estabilizando especies reactivas de oxígeno, interviniendo, por lo tanto, en la actividad antioxidante (Figura 4). Este comportamiento ya ha sido ampliamente demostrado mediante métodos como ORAC, FRAP, DPPH, ABTS e inhibición de peroxidación lipídica (Miguel *et al.*, 2011; Caroch y Ferreira, 2013), con lo que se demuestra la relación de la presencia de compuestos con grupos hidroxilos como los del tipo fenólico con la actividad antioxidante.

Efecto de compuestos fenólicos de frutos de *P. indica* sobre la actividad antiinflamatoria

La alta actividad antioxidante de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de los frutos de *P. indica*, se relacionó también directamente con la actividad antiinflamatoria tanto con la administración tópica como oral, utilizando el modelo de edema en pata de rata inducida por carragenina, que fue mayor que el extracto metanólico crudo. Con la dosis de 1 mg/kg de la fracción clorofórmica se obtuvieron porcentajes de actividad antiinflamatoria de 77.8% y 72%, con administración tópica y oral, respectivamente, con un 22.6% mayor que el ejercido por el extracto metanólico a la dosis de 10 mg/kg y similar al mostrado por el ibuprofeno en una dosis de 25 mg/kg (Figuras 5, 6 y 7).

Los resultados sugieren que, debido al fraccionamiento del extracto, la fracción mostró un contenido alto de ácidos fenólicos y de antocianinas totales, que podrían ser considerados los responsables de esta actividad, ya que Nair *et al.* (2015) reportaron la actividad antiinflamatoria de antocianinas provenientes del extracto de *C. ternatea* en un modelo de inflamación inducida por lipopolisacárido (LPS) en células de macrófagos, demostrando que esta actividad fue debida a estos compuestos, que inhibieron la expresión de iNOS y por lo tanto de óxido nítrico, a través de la inhibición del NF- κ B.

Resultados similares se han observado en diversos modelos, con la administración de distintas fracciones ricas en antocianinas, relacionando una alta actividad antioxidante (IC₅₀ de 5.74 μ g/mL por el método DPPH) con la actividad antiinflamatoria (Intuyod *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2015).

En la fracción clorofórmica del extracto metanólico de los frutos de *P. indica*, se identificaron principalmente ácido elágico (44.37 μ g/mL), quercetina (27.2 μ g/mL) y rutina (18.7 μ g/mL), como los compuestos mayoritarios (cuadro 6). Estos compuestos son producidos por diversas plantas de diferentes familias y de las que se han estudiado y relacionado directamente algunos de estos compuestos o en mezcla, con una alta actividad antioxidante y antiinflamatoria. El ácido elágico, un polifenol perteneciente a los elagitaninos, y los flavonoides quercetina y rutina, han sido reportados con una alta actividad antiinflamatoria (Hernández *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2004).

El ácido elágico, el ácido nordihidroguaiarético y la curcumina, entre otros, poseen además actividad antiinflamatoria ya que se demostró que actúan secuestrando directamente especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, inhibiendo a COX-2, LOX, óxido nítrico y algunas citocinas proinflamatorias (Jurenka, 2009; Watson y Preedy, 2013).

Efecto de compuestos fenólicos de frutos de *P. indica* sobre la actividad antiartrítica

Con la administración oral del extracto metanólico en ratas artríticas se observó que se retrasaron los síntomas de la enfermedad, manteniendo durante 18 días un índice artrítico de 1, mostrando un comportamiento similar al observado en las ratas artríticas tratadas con dexametasona (antiinflamatorio esteroideo). Este efecto se relaciona con el alto contenido de flavonoides que contiene el extracto metanólico (Figura 4).

Se ha demostrado la actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora de este tipo de compuestos, sin embargo, los mecanismos por los cuales actúan no están del todo comprendidos. Así, por ejemplo, la naringenina reduce la activación de NFκB, los niveles de anti colágeno tipo II y limita la proliferación de células T (Li *et al.*, 2015), puntuaciones clínicas en varios modelos de artritis reumatoide experimental como la artritis inducida por adyuvante y colágeno mejoraron con la administración de quercetina (Ansari *et al.*, 2014).

Natarajan *et al.* (2015) reportaron que los flavonoides del árbol del té, la catequina y la epigallocatequina-3-galato, protegen el cartílago articular contra la degradación por colagenasa. Se ha reportado además que ciertos flavonoides son capaces de estimular la producción de citocinas antiinflamatorias, en particular la IL-10 en modelos experimental de artritis reumatoide (Kelepouri *et al.*, 2018). Finalmente, se ha observado que la combinación de dexametasona y epigallocatequina-3-galato resultó en una reducción del edema en ratas artríticas inducidas por adyuvante completo de Freund (Roy *et al.*, 2013). Estas investigaciones concuerdan con el efecto del extracto metanólico de los frutos de *P. indica* y su alto contenido de flavonoides.

Por otro lado, con la administración oral del extracto metanólico y la fracción clorofórmica en ratas artríticas, se observó que se mantenían valores dentro de los límites de referencia (León *et al.*, 2011) para glucosa, ácido úrico, creatinina, colesterol total, urea, triacilglicéridos, factor reumatoide y proteína C reactiva

(Cuadro 10), indicativo que tanto el extracto como la fracción pueden prevenir posibles daños renales, hepáticos y cardiovasculares durante la evolución de la enfermedad.

Es importante mencionar que la administración de los antiinflamatorios convencionales (dexametasona y dexketoprofeno) presentaron valores de ácido úrico, creatinina y colesterol total que estaban fuera de los límites de referencia reportados por León *et al.* 2011 para ratas (Cuadro 10), responsables de los efectos secundarios adversos que éstos causan. Cabe mencionar que el grupo de ratas artríticas sin tratamiento, presentó niveles que se encontraban fuera de los límites de referencia para ácido úrico, creatinina, colesterol total y triacilglicéridos.

Distintas investigaciones han reportado que la simple inducción de artritis experimental puede provocar estos cambios en los niveles normales de estos marcadores bioquímicos en suero, siendo por lo tanto la artritis una enfermedad muy agresiva que requiere de nuevas alternativas, como la administración de dosis de extractos o compuestos de origen vegetal, que ayuden a disminuir o retardar los síntomas y daños (Munro *et al.*, 1997; Daoussis *et al.*, 2009; Roddy y Doherty, 2010; Hickson *et al.*, 2014; Hendawy *et al.*, 2015; Shan *et al.*, 2018).

Propuesta del mecanismo de acción de compuestos fenólicos durante la inflamación aguda y el desarrollo experimental de artritis

En esta investigación, las antocianinas y los compuestos fenólicos como el ácido elágico, la quercetina y la rutina, entre otros, presentes en la fracción clorofórmica de los frutos maduros de *P. indica* (Figura 4, Cuadro 6), sugiere que sean los responsables de la mayor actividad antioxidante *in vitro* y actividad antiinflamatoria *in vivo*. Sin embargo, los compuestos como el ácido gálico, el ácido p-cumárico y en menor medida el ácido elágico, presentes mayormente en el extracto metanólico (Cuadro 6), que también mostró el mayor contenido de flavonoides totales (Figura 4), indican que podrían ser los que muestran mayor efecto antiartrítico.

En la figura 10 se propone un mecanismo de acción de cómo podrían estar actuando estos compuestos fenólicos en los procesos inflamatorios (Ambriz-Pérez *et al.*, 2016), ya sea en la inflamación aguda (edema inducido por carragenina), para el caso de las antocianinas y los ácidos fenólicos; o para la inflamación crónica (artritis experimental) para el caso de los flavonoides.

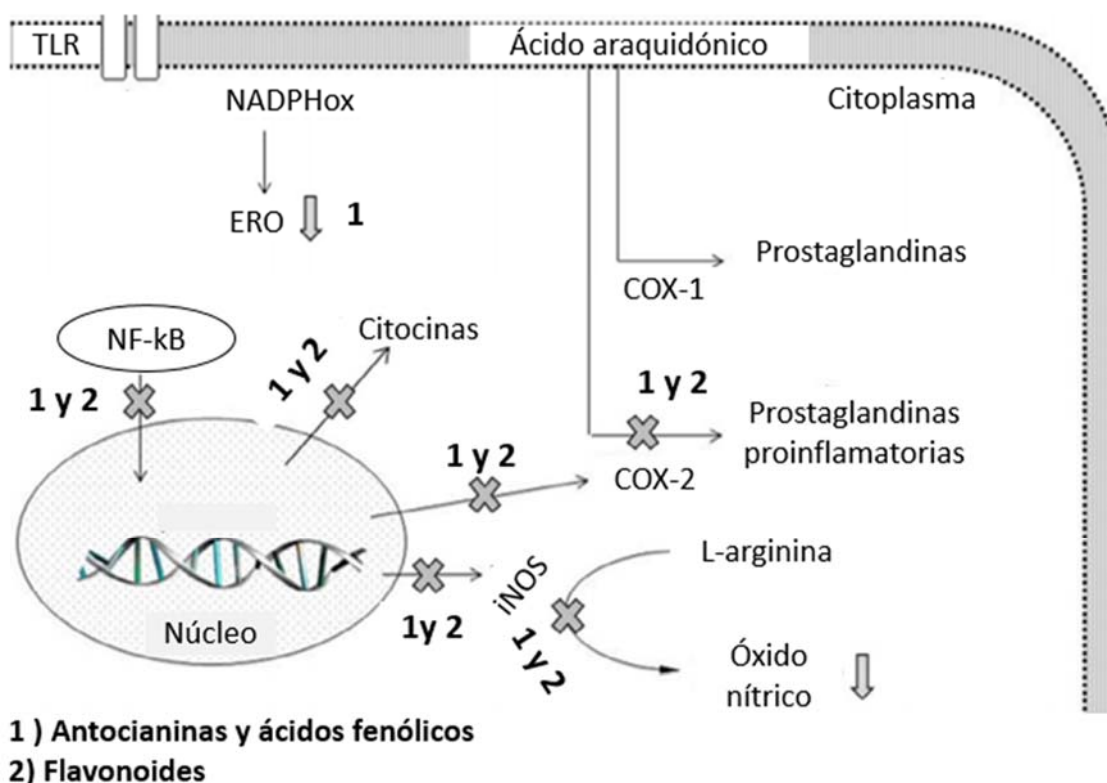


Figura 6. Mecanismo de acción en procesos inflamatorios (tomada y modificada de Ambriz-Pérez *et al.*, 2016)

Los flavonoides, como la quercetina y la rutina, actúan en la inhibición de la actividad del ácido araquidónico a través de la fosfolipasa A2 (PLA2), ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX) y la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) productora de NO. Con la inhibición de estas enzimas, se reduce la producción de ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y NO, mediadores importantes durante la inflamación (Sies *et al.*, 2005). Además, algunos flavonoides pueden inhibir otros mediadores del proceso inflamatorio tales como la proteína C reactiva (PCR), cuya elevación en suero se considera un indicador de inflamación crónica y su concentración

plasmática un biomarcador predictivo de la enfermedad cardiovascular (Gómez-Juaristi, 2015). Esto último fue observado durante la experimentación, tanto con la administración oral del extracto metanólico como con la fracción clorofórmica.

Así, se ha descrito una reducción de los niveles plasmáticos de PCR en ratones alimentados con dieta rica en colesterol y enriquecida con epicatequina respecto a aquellos animales alimentados con la misma dieta, pero sin este flavanol (Morrison *et al.*, 2014). También, epicatequín-3-galato y quercetina parecen activar el transportador ABCA1 (ATP-binding cassette-A1), reducir los niveles de proteínas quimiotácticas, como la MCP-1 (proteína quimioatrayente de macrófagos tipo 1), e inhibir la producción de PCR (González *et al.*, 2011; Gómez-Juaristi, 2015).

Kim *et al.* (2004) reportaron que los flavonoides como el resveratrol, son capaces de modular la expresión génica, regulando la expresión de genes proinflamatorios y, por lo tanto, atenuando la respuesta inflamatoria existente, así como la regulación de niveles del factor transcripción nuclear NF- κ B. La ingesta rica de resveratrol en ratones, mostró una reducción de la IL-6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Do *et al.*, 2008; Gómez-Juaristi, 2015).

9. CONCLUSIÓN GENERAL

Se observó una relación directa entre la alta actividad antioxidante y la actividad antiinflamatoria con el contenido de compuestos fenólicos, encontrando que la fracción clorofórmica derivada del extracto metanólico de frutos de *P. indica*, mostró la mayor actividad, sugiriendo que este efecto se debe al contenido de ácidos fenólicos y antocianinas.

El extracto metanólico crudo de los frutos maduros de *P. indica* aunque no mostró el mayor efecto tanto antioxidante como antiinflamatorio, demostró retrasar los síntomas de la artritis inducida por colágeno en ratas Wistar, lo que se relacionó directamente con el contenido de flavonoides totales.

Se sugiere que el ácido elágico, la quercetina y la rutina, son los responsables del efecto antioxidante y antiinflamatorio de la fracción clorofórmica; y los ácidos gálico, p-cumárico y elágico, de la actividad antiartrítica del extracto metanólico.

10. LITERATURA CITADA GENERAL

- Alu'Datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Al-Mahasneh, M. A., Ereifej, K., Al-Karaki, G., ... & Ghozlan, K. A.** (2017). Profiles of free and bound phenolics extracted from Citrus fruits and their roles in biological systems: content, and antioxidant, anti-diabetic and anti-hypertensive properties. *Food & Function*, 8(9), 3187-3197.
- Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Gutierrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B.** (2016). Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1131412.
- Ang, H.Y., Subramani, T., Yeap, S.K., Omar, A.R., Ho, W.Y., Abdullah, M.P., & Alitheen, N.B.** (2014). Immunomodulatory effects of *Potentilla indica* and *Dendrophthoe pentandra* on mice splenocytes and thymocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(6), 1733–1737.
- Aro, A. O., Dzoyem, J. P., Eloff, J. N., & McGaw, L. J.** (2016). Extracts of six Rubiaceae species combined with rifampicin have good in vitro synergistic antimycobacterial activity and good anti-inflammatory and antioxidant activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 385.
- Ansari, M. M., Neha, H. A., & Khan, N. H. A.** (2014). Quercetin alleviate oxidative stress and inflammation through upregulation of antioxidant machinery and down-regulation of COX2 and NF-κB expression in collagen induced rheumatoid arthritis. *International Journal of Drug Development & Research*, 6, 215-230.
- Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. N.** (2016). Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules*, 21(10), 1321.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O.** (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9.
- Bowen-Forbes, C. S., Zhang, Y., & Nair, M. G.** (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 554-560.
- Bhardwaj, R. L., Nandal, U., Pal, A., & Jain, S.** (2014). Bioactive compounds and medicinal properties of fruit juices. *Fruits*, 69(5), 391-412.
- Caballero, U.C.V., & Pinzón, C.L.** (2006). Artritis reumatoide tratada con inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa (Anti-TNF-alfa) y tuberculosis pulmonar. *Salud Uninorte*, 22(1), 29-39.
- Calderón de Rzedowski, G.** (2001). Rosaceae. En G. Calderón de Rzedowski, & J. Rzedowski (Eds.), *Flora fanerogámica del Valle de México* (pp. 233- 250). Ciudad de México, México: Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

- Calixto, J.B., Otuki, M.F., & Santos, A.R.** (2003). Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). *Planta medica*, 69(11), 973–983.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C.** (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Chao, C. L., Weng, C. S., Chang, N. C., Lin, J. S., Kao, S. T., & Ho, F. M.** (2010). Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutrition Research*, 30(12), 858-864.
- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J. A., Caligari, P. D., & Schmeda-Hirschmann, G.** (2007). Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. *Food Chemistry*, 102(1), 36-44.
- Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R.** (2010). Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods. *Talanta*, 81(4), 1300–1309.
- Daoussis, D., Panoulas, V., Toms, T., John, H., Antonopoulos, I., Nightingale, P., ... & Kitas, G. D.** (2009). Uric acid is a strong independent predictor of renal dysfunction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 11(4), R116.
- De Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R.** (2011). Citocinas y dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 260-265.
- Do, G. M., Kwon, E. Y., Kim, H. J., Jeon, S. M., Ha, T. Y., Park, T., & Choi, M. S.** (2008). Long-term effects of resveratrol supplementation on suppression of atherogenic lesion formation and cholesterol synthesis in apo E-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(1), 55-59.
- Doss, H. M., Dey, C., Sudandiradoss, C., & Rasool, M. K.** (2016). Targeting inflammatory mediators with ferulic acid, a dietary polyphenol, for the suppression of monosodium urate crystal-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, 148, 201-210.
- Dost, T.; Ozkayran, H.; Gokalp, F.; Yenisey, C.; Birincioglu, M.** (2009). The effect of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) on experimental colitis in rat. *Digestive Diseases and Sciences*, 54, 1214–1221.
- Fan, Y. M., Xu, L. Z., Gao, J., Wang, Y., Tang, X. H., Zhao, X. N., & Zhang, Z. X.** (2004). Phytochemical and antiinflammatory studies on *Terminalia catappa*. *Fitoterapia*, 75(3-4), 253-260.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K.** (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.

- Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y., Giampieri, F., Afrin, S., Alvarez-Suarez, J. M., Mazzoni, L., ... & Battino, M.** (2017). Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, 102, 1-10.
- Ganesan, K., & Xu, B.** (2017). A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. *Nutrients*, 9(5), 455.
- Gómez-Juaristi, M.** (2015). *Metabolismo de flavonoides y ácidos hidroxycinámicos de la dieta. Estudios de transporte in vitro y de disponibilidad en humanos* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- González, R., Ballester, I., López-Posadas, R., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martinez-Augustin, O., & Medina, F. S. D.** (2011). Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 331-362.
- Hangun-Balkir, Y., & McKenney, M. L.** (2012). Determination of antioxidant activities of berries and resveratrol. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 5(2), 147-153.
- Hendawy, O. M., Ahmed, W. M. S., Abosaif, A. A., & Mahmoud, F. A.** (2015). Effect of Atorvastatin and Vitamin D on Freund's Adjuvant-Induced Rheumatoid Arthritis in Rat. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 7, 090-094.
- Hernández Ángel, M., García Bacallao, L., Rojo Domínguez, D. M., & Olivares Padilla, D.** (2003). Almendro de la India: potencial biológico valioso. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0-0.
- Hickson, L. J., Crowson, C. S., Gabriel, S. E., McCarthy, J. T., & Matteson, E. L.** (2014). Development of reduced kidney function in rheumatoid arthritis. *American Journal of Kidney Diseases*, 63(2), 206-213.
- Hsiang, C.Y.; Lo, H.Y.; Huang, H.C.; Li, C.C.; Wu, S.L.; Ho, T.Y.** (2013) Ginger extract and zingerone ameliorated trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice via modulation of nuclear factor- κ B activity and interleukin-1 β signalling pathway. *Food Chemistry*, 136, 170–177.
- Hu, W., Shen, W., & Wang, M. H.** (2009). Free radical scavenging activity and protective ability of methanolic extract from *Duchesnea indica* against protein oxidation and DNA damage. *Preventive Nutrition and Food Science*, 14(4), 277-282.
- Hu, W., Han, W., Huang, C., & Wang, M. H.** (2011). Protective effect of the methanolic extract from *Duchesnea indica* against oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31(1), 42-50.
- Hughes, S. D., Ketheesan, N., & Haleagrahara, N.** (2017). The therapeutic potential of plant flavonoids on rheumatoid arthritis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(17), 3601-3613.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N.** (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

- Intuyod, K., Priprem, A., Limphirat, W., Charoensuk, L., Pinlaor, P., Pairojkul, C., ... & Pinlaor, S.** (2014). Anti-inflammatory and anti-periductal fibrosis effects of an anthocyanin complex in *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 206-215.
- Izquierdo, E., & Pablos, J. L.** (2013). Fibroblastos sinoviales. *Seminarios de la Fundación Española de Reumatología*, 14(4), 121-128.
- Jung, H., Lee, H. J., Cho, H., & Hwang, K. T.** (2015). Anti-Inflammatory Activities of *Rubus* Fruit Anthocyanins in Inflamed Human Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Food Biochemistry*, 39(3), 300-309.
- Jurenka, J. S.** (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Medicine Review*, 14(2).
- Karp, G.** (2011). *Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos*. México, Ciudad de México: Mc Graw Hill.
- Kelepouri, D., Mavropoulos, A., Bogdanos, D. P., & Sakkas, L. I.** (2018). The role of flavonoids in inhibiting Th17 responses in inflammatory arthritis. *Journal of Immunology Research*, 2018.
- Kim, I. G., Jung, I. L., Oh, T. J., Kim, K. C., & Shim, H. W.** (2002). Polysaccharide-enriched fraction isolated from *Duchesnea chrysantha* protects against oxidative damage. *Biotechnology Letters*, 24(16), 1299-1305.
- Kim, J.M. Jang, D.S., Lee, Y.M., Yoo, J.L, Kim, Y.S., Kim, J.H., & Kim, J.S.** (2008). Aldose reductase and protein glycation inhibitory principles from the whole plant of *Duchesnea chrysantha*. *Chemistry and Biodiversity*, 5(2), 352-356.
- Kumar, E., Mastan, S. K., Sreekanth, N., Chaitanya, G., Reddy, G. A., & Raghunandan, N.** (2015). Anti-Arthritic Property of the Ethanollic Leaf Extract of *Cardiospermum Halicacabum* Linn. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 1(2), 395-400.
- Lee, I.R., & Yang, M.Y.** (1994). Phenolic compounds from *Duchesnea chrysantha* and their cytotoxic activities in human cancer cell. *Archives of Pharmacal Research*, 17(6), 476-479.
- Lee, J.S, Kim, I.S, Ryu, J.S., Kim, J.H., Kim, J.S. Kim, D.H., & Yun, C.Y.** (2012). The inhibitory effect of *Duchesnea chrysantha* extract on the development of atopic dermatitis like lesions by regulating IgE and cytokine production in Nc/Nga mice. *Phytotherapy Research*, 26(2), 284-290.
- Lee, J. W., Lew, J. H., Kim, T. W., & Kang, H.** (2016). Effect of an herbal mixture of Cinnamon Cortex, Persicae Semen, and Natril Sulfas on collagen-induced arthritis and lipopolysaccharides-induced nuclear factor- κ B signaling. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 1-6.
- León, G.A.C., Blanco D., Peña A., Ronda M., González B.O., Arteaga M.E., Bada A.M., González Y. y Mancebo A.** (2011). Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 12(11):1-10.

- León R. M. L., Alvarado B. A., De Armas G. J. O., Miranda A. L., Varens C. J. A. & Cuesta D. J. Á.** (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay*, 5(1), 47-62.
- Li, Y. R., Chen, D. Y., Chu, C. L., Li, S., Chen, Y. K., Wu, C. L., & Lin, C. C.** (2015). Naringenin inhibits dendritic cell maturation and has therapeutic effects in a murine model of collagen-induced arthritis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(12), 1467-1478.
- López, L. F. J., Fernández, G., Monteagudo, S. I., & Carreño P. L.** (2002). Auto anticuerpos en la artritis reumatoide. *Revista Española de Reumatología Suplementos*, 1(1), 27-35.
- Maji, A. K., & Banerji, P.** (2016). Phytochemistry and gastrointestinal benefits of the medicinal spice, *Capsicum annuum* L.(Chilli): a review. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 13(2), 97-122.
- Miguel M.G.** (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 291-312.
- Miguel, M. G.** (2011). Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 7-15.
- Morrison, M., van der Heijden, R., Heeringa, P., Kaijzel, E., Verschuren, L., Blomhoff, R., ... & Kleemann, R.** (2014). Epicatechin attenuates atherosclerosis and exerts anti-inflammatory effects on diet-induced human-CRP and NFκB *in vivo*. *Atherosclerosis*, 233(1), 149-156.
- Munro, R., Morrison, E., McDonald, A. G., Hunter, J. A., Madhok, R., & Capell, H. A.** (1997). Effect of disease modifying agents on the lipid profiles of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 56(6), 374-377.
- Nair, V., Bang, W. Y., Schreckinger, E., Andarwulan, N., & Cisneros-Zevallos, L.** (2015). Protective role of ternatin anthocyanins and quercetin glycosides from butterfly pea (*Clitoria ternatea* Leguminosae) blue flower petals against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in macrophage cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(28), 6355-6365.
- Nardi, G. M., Januario, A. G. F., Freire, C. G., Megiolaro, F., Schneider, K., Perazzoli, M. R. A., ... & Niero, R.** (2016). Anti-inflammatory activity of berry fruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. *Pharmacognosy research*, 8(Suppl 1), S42.
- Natarajan, V., Madhan, B., & Tikku, M. L.** (2015). Intra-articular injections of polyphenols protect articular cartilage from inflammation-induced degradation: suggesting a potential role in cartilage therapeutics. *PloS one*, 10(6).
- Ondua, M., Njoya, E. M., Abdalla, M. A., & McGaw, L. J.** (2019). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 234, 27-35.
- Paduch, R., Wiater, A., Locatelli, M., & Tomczyk, M.** (2015). Aqueous extracts of selected *Potentilla* species modulate biological activity of human normal colon cells. *Current Drug Targets*, 16(13), 1495-1502.

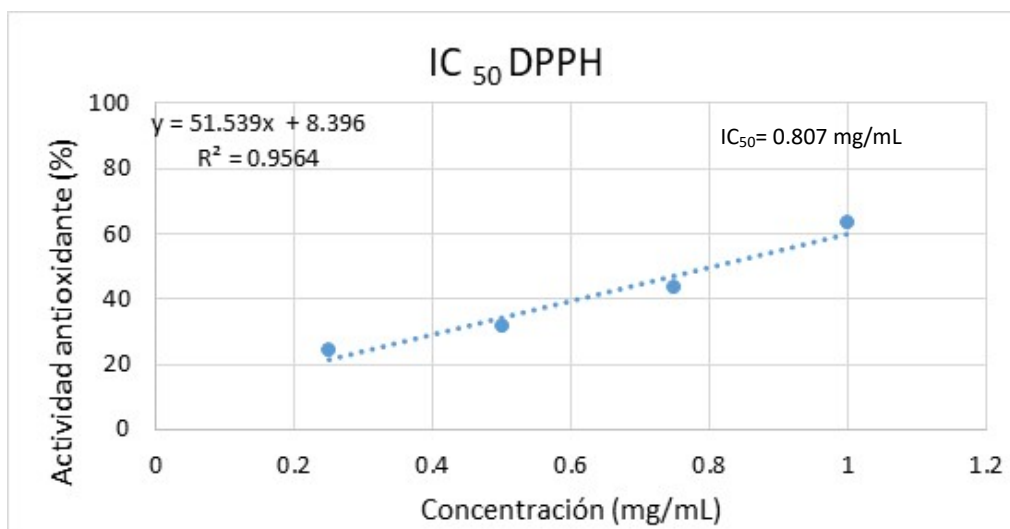
- Peng, B., Chang, Q., Wang, L., Hu, Q., Wang, Y., Tang, J., & Liu, X.** (2008). Suppression of human ovarian SKOV-3 cancer cell growth by *Duchesnea* phenolic fraction is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Gynecologic Oncology*, 108(1), 173-181.
- Peng, B., Hu, Q., & Liu, X.** (2009). *Duchesnea* phenolic fraction inhibits *in vitro* and *in vivo* growth of cervical cancer through induction of apoptosis and cell cycle arrest. *Experimental Biology and Medicine*, 234(1), 74-83.
- Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M.** (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2), 337-341.
- Qiao, W., Yao, Z., Zhang, W., & Duan, H.Q.** (2009). Two new triterpenes from *Duchesnea indica*. *Chinese Chemical Letters*, 20, 572-575.
- Qin, C., Li, Y., Zhang, R., Niu, W., & Ding, Y.** (2009). Separation and elucidation of anthocyanins in the fruit of mockstrawberry (*Duchesnea indica* Focke). *Natural Product Research*, 23(17), 1589-1598.
- Robert, M., & Miossec, P.** (2019). IL-17 in rheumatoid arthritis and precision medicine: from synovitis expression to circulating bioactive levels. *Frontiers in Medicine*, 5, 364.
- Roddy, E., & Doherty, M.** (2010). Gout. Epidemiology of gout. *Arthritis Research & Therapy*, 12(6), 223.
- Rossi, W. M., Garrido, G., & Sellés, A. J. N.** (2016). Biomarcadores del estrés oxidativo en la terapia antioxidante. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 4(2), 62-83.
- Roy, S., Sannigrahi, S., Ghosh, B., Pusp, P., & Roy, T.** (2013). Combination therapy of dexamethasone with epigallocatechin enhances tibiotarsal bone articulation and modulates oxidative status correlates with cartilage cytokines expression in the early phase of experimental arthritis. *European Journal of Pharmacology*, 698(1-3), 444-454.
- Sánchez, R. S., López, L. F. J., & Carreno, L.** (2011). Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. *Reumatología Clínica*, 6, 20-24.
- Sanmartí, R., & Gómez, P. J. A.** (2011). Biomarcadores en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 6(3), 25-28.
- Sansaricq, C. I., Miranda, C., María, E., Molinet, F. E. J., & Peña S. M.** (2015). Indicadores biológicos y de estrés oxidativo en la evolución de pacientes con artritis reumatoide. *Revista Cubana de Reumatología*, 17(2), 132-138.
- Schell, J., Scofield, R. H., Barrett, J. R., Kurien, B. T., Betts, N., Lyons, T. J., ... & Basu, A.** (2017). Strawberries improve pain and inflammation in obese adults with radiographic evidence of knee osteoarthritis. *Nutrients*, 9(9), 949.
- Shan, J., Peng, L., Qian, W., Xie, T., Kang, A., Gao, B., & Di, L.** (2018). Integrated serum and fecal metabolomics study of collagen-induced arthritis rats and the therapeutic effects of the zushima tablet. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 891.

- Sharma, H., Chauhan, P., & Singh, S.** (2018). Evaluation of the anti-arthritic activity of *Cinnamomum cassia* bark extract in experimental models. *Integrative Medicine Research*, 7(4), 366-373.
- Sies, H., Schewe, T., Heiss, C., & Kelm, M.** (2005). Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 304S-312S.
- Song, H. P., Li, X., Yu, R., Zeng, G., Yuan, Z. Y., Wang, W., ... & Cai, X.** (2015). Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritis in Wistar rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 10(4), 1483-1488.
- Sugishita, E., Amagaya, S., & Ogihara, Y.** (1981). Antinflammatory Testing Methods: Comparative Evaluation of Mice and Rats. *Journal of Pharmacobio-dynamics*, 4(8), 565-575.
- Suresh, P., Kavitha, C. N., Babu, S. M., Reddy, V. P., & Latha, A. K.** (2012). Effect of ethanol extract of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) seeds on Freund's adjuvant-induced arthritis in albino rats. *Inflammation*, 35(4), 1314-1321.
- Tangney, C. C., & Rasmussen, H. E.** (2013). Polyphenols, inflammation, and cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 15(5), 324.
- Tapia, A., Rodríguez J., Theoduloz, C., López, S., Feresin, G.E. & Schmeda, H. G.** (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2), 155-161.
- Tian, J., Chen, J. W., Gao, J. S., Li, L., & Xie, X.** (2013). Resveratrol inhibits TNF- α -induced IL-1 β , MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt pathway. *Rheumatology International*, 33(7), 1829-1835.
- Tomovic, M. T., Cupara, S. M., Popovic-Milenkovic, M. T., Ljubic, B. T., Kostic, M. J., & Jankovic, S. M.** (2015). Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Potentilla reptans* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 72(1), 137-145.
- Tomczyk, M., Pleszczyńska, M., & Wiater, A.** (2010). Variation in total polyphenolics contents of aerial parts of *Potentilla* species and their anticariogenic activity. *Molecules*, 15(7), 4639-4651.
- Uotsu, N., Shen, M., Yazawa, K., & Teramoto, S.** (2016). Suppression of Arthritis Progression with Lutein Extracted from *Tagetes erecta* in Collagen-Induced Arthritis Model Rats. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)*, 16(2), 134-141.
- Vasconcelos, S. M. L., Goulart, M. O. F., Moura, J. B. D. F., Manfredini, V., Benfato, M. D. S., & Kubota, L. T.** (2007). Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30, 1323-1338.
- Wang, S. S., Wang, D. M., Pu, W. J., & Li, D. W.** (2013). Phytochemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of three *Potentilla* species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 321.
- Watson, R. R., & Preedy, V. R. (Eds.).** (2013). *Bioactive food as dietary interventions for arthritis and related inflammatory diseases*. Waltham, EUA: Academic press.

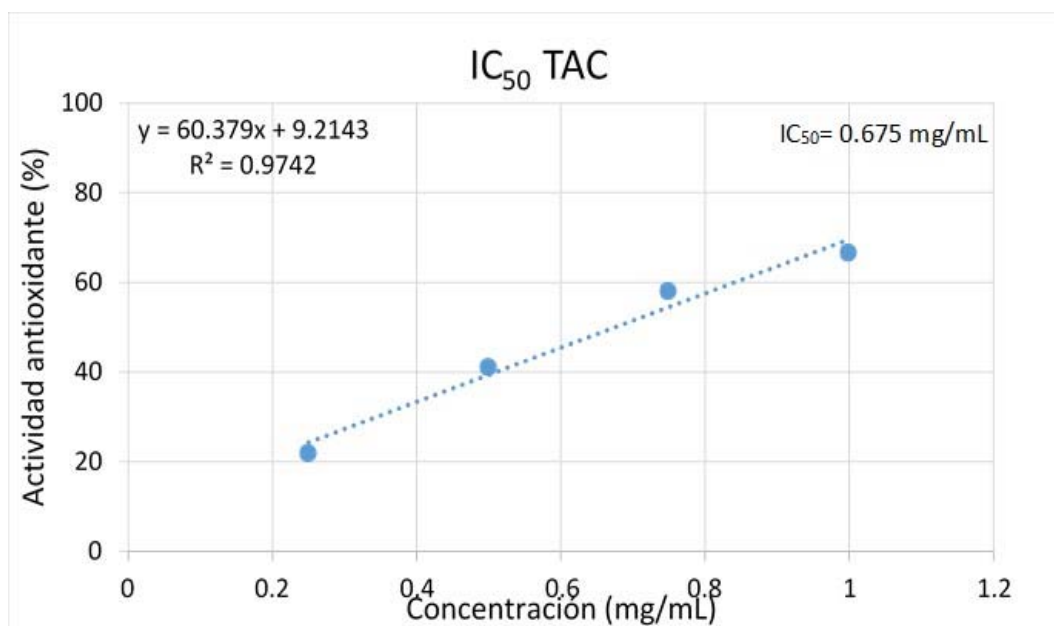
- Xiang-Hui, J., Jian-Qiang, G., Chao-Wen, S., & Liu, X. M.** (2012). High frequency shoot organogenesis in juvenile leaf of *Duchesnea indica* (Andr.) Focke. *African Journal of Biotechnology*, 11(17), 4039-4044.
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., ... & Li, H. B.** (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 96.
- Yang, E.J., Lee, J.S., Yun, C.Y., Kim, J.H., Kim, J.S., Kim, D.H., & Kim, I.S.** (2008). Inhibitory effects of *Duchesnea chrysantha* extract on ovalbumin-induced lung inflammation in a mouse model of asthma. *Journal Ethnopharmacology*, 118(1), 102–107.
- Yen, J.** (2001). Tumor Necrosis Factor promoter polymorphisms in patients with Rheumatoid arthritis in Taiwan. *The Journal of Rheumatology*, 28(8), 1788-1792.
- Young, J.M., & De Young, L.M.** (1989). *Cutaneous Models of Inflammation for the Evaluation of Topical and Systemic Pharmacological Agent*. En S. Spector & N. Back (Eds.), *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation* (pp. 215-231). New York, EUA: Alan R. Liss.
- Yue, C., You, X., Zhao, L., Wang, H., Tang, F., Zhang, F., ... & He, W.** (2010). The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology International*, 30(12), 1553-1557.
- Zheng, Z., Sun, Y., Liu, Z., Zhang, M., Li, C., & Cai, H.** (2015). The effect of curcumin and its nanoformulation on adjuvant-induced arthritis in rats. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 4931-4942.
- Zhu, M., Dong, X., & Guo, M.** (2015). Phenolic Profiling of *Duchesnea indica* Combining Macroporous Resin Chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. *Molecules*, 20(12), 22463-22475.

11. ANEXOS

11.1. Curva de calibración para la determinación de la IC_{50} de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de frutos de *Potentilla indica* (falsa fresa) por el método DPPH.



11.2. Curva de calibración para la determinación de la IC_{50} de la fracción clorofórmica del extracto metanólico de frutos de *Potentilla indica* (falsa fresa) por el método TAC.



- 11.3. Curva de calibración de ácido gálico ($\mu\text{moles/g}$ peso fresco) ($\lambda=725\text{ nm}$) (a); curva de calibración de quercetina ($\mu\text{moles/g}$ peso fresco) ($\lambda=415\text{ nm}$) (b).

