



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

TÍTULO DE LA TESIS

“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO/ANTIOXIDANTE DE
CLEOSERRATA SERRATA (JACQ.) *ILTIS*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PRESENTA

M. en C. MARÍA DEL CARMEN JUÁREZ VÁZQUEZ

COMITÉ TUTORAL

Dra. María Adelina Jiménez Arellanes (Director)

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar (Codirector)

Dr. Mariano Martínez Vázquez (Asesor)

Xochimilco, Ciudad de México, agosto, 2022

El presente trabajo fue realizado en:

La Unidad de Investigación Médica en Farmacología del Hospital de Especialidades UMAE del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo la codirección de la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes.

En el Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la codirección del Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

El Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro **545284**, que comprendió del periodo de **01/09/2017** al **31/08/2021**. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y, además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El autor recibió una beca CIS/IMSS con matrícula 99097569 durante el periodo 2018-2020.

El desarrollo del proyecto se realizó con el apoyo económico parcial otorgado por el Fondo de Investigación en Salud, Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, con registro ante la CNIC-IMSS R-2018-785-059.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobó la tesis titulada "Estudio fitoquímico y evaluación del potencial antiinflamatorio/antioxidante de *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis" que presentó la M. en C. María del Carmen Juárez Vázquez.

Fecha de aprobación de la tesis 26 de agosto de 2022.

JURADO:



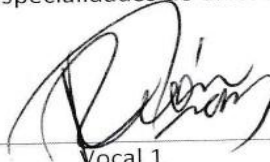
Presidente

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa



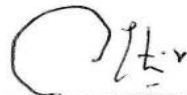
Secretario

Dra. María Adelina Jiménez Arellanes
Hospital de Especialidades de CMN SXXI, IMSS



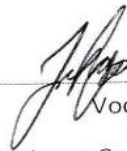
Vocal 1

Dra. Rosalba León Díaz
Instituto de Investigaciones Biológicas
Universidad Veracruzana



Vocal 2

Dr. Mariano Martínez Vázquez
Instituto de Química
Universidad Nacional Autónoma de México



Vocal 3

Dr. Jorge Cornejo Garrido
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
Instituto Politécnico Nacional.

Dedicado a mi familia

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Al doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, por haber permitido formarme académicamente.

A la Dra. Adelina Jiménez Arellanes, por permitir integrarme a su grupo de trabajo, por darme las herramientas necesarias para poder avanzar en mi formación académica durante el doctorado, por darme la motivación para seguir adelante con su consejo académico, su amistad y confianza. Gracias por las oportunidades brindadas y gracias por la contribución de conocimientos realizados al proyecto de investigación. Gracias, por el ejemplo de trabajo, perseverancia y excelencia académica.

Al Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar, por apoyarme y guiarme con su consejo académico y realizar las observaciones necesarias y pertinentes para el buen desarrollo del presente proyecto de investigación.

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por el apoyo en el desarrollo experimental, por las sugerencias realizadas al trabajo experimental y por su consejo académico. Gracias por las conversaciones académicas que hicieron que me planteara una nueva visión en la investigación.

A la Dra. Mariana Zuleima Pérez González, al M. en C. Óscar René Zambrano Vázquez, al Ing. Roberto Jared Criollo Salas, a la M. en C. Verónica García Gutiérrez, al M. en C. Freddy Muñoz Monjaraz, por su amistad y apoyo técnico en el proyecto de investigación.

A los miembros del jurado la Dra. Rosalba León Díaz, al Dr. Jorge Cornejo Garrido, al Dr. Mariano Martínez Vázquez, Dr. Cuauhtémoc Pérez González, Dr. Jorge I. Castañeda Sánchez y al Dr. Jaime Amadeo Bustos Martínez, que con sus observaciones y sugerencias han permitido mejorar el trabajo escrito.

A grupo de investigación del Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud, UAM-Iztapalapa por las sugerencias oportunas a la presentación.

Al Dr. Ángel Josabad Alonso Castro, que me apoyo y motivo a continuar con mi proceso académico, gracias por ayudarme y confiar en mí.

A mis queridos padres Isabel Vázquez, Mateo Juárez y a mi hermano Israel Juárez, con amor y respeto por su esfuerzo y dedicación, por la oportunidad que me dan al confiar en mí, porque siempre me han mantenido a flote con sus consejos de vida.

A mis estimados amigos de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología, IMSS y del Instituto de Química de la UNAM, por su amistad brindada en los buenos y los malos momentos, por el acompañamiento en este proceso. Gracias, a todos los amigos que conocí y que a lo largo de mi carrera profesional se han mantenido motivándome.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. Inflamación aguda, subaguda y crónica.....	3
2.2. Elementos celulares y químicos implicados en la inflamación y el estrés oxidante.....	4
2.3. Enfermedades inflamatorias crónicas como un problema de salud.....	5
2.4. Principales terapias antiinflamatorias y efectos adversos.....	7
2.5. El papel de los productos naturales en el tratamiento de la inflamación.....	10
2.6. Productos herbales comerciales para el tratamiento de la inflamación.....	13
3. ANTECEDENTES.....	15
3.1. Potencial antiinflamatorio de la familia <i>Cleomaceae</i>	15
3.2. Componentes químicos aislados de la familia <i>Cleomaceae</i> con efecto antiinflamatorio.....	16
3.3. Antecedentes biológicos, químicos y etnobotánicos de <i>C. serrata</i>	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN GENERAL.....	22
6. HIPÓTESIS.....	22
7. OBJETIVO GENERAL.....	22
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
9. MATERIALES Y MÉTODOS (OBJETIVOS).....	24
9.1. Objetivo 1. Colecta y preparación de los extractos orgánicos CH ₂ Cl ₂ :EtOH 1:1 (CHS) y Hex.....	26
9.2. Objetivos 2 y 5. Evaluación del efecto antiinflamatorio agudo <i>in vivo</i>	26
9.2.1. Modelo de edema plantar inducido con carragenina.....	27
9.2.2. Modelo de edema auricular inducido con 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA).....	27
9.3. Objetivo 3. Evaluación del efecto antioxidante <i>in vitro</i> de los extractos CHS, Hex, CH ₂ Cl ₂ , MeOH, de <i>p</i> CHS y <i>H</i> MeOH.....	28
9.4. Objetivo 4. Fraccionamiento químico de los extractos activos CHS y Hex por métodos cromatográficos.....	28
9.4.1. Fraccionamiento del extracto CHS por CC-FN.....	28
9.5. Objetivo 6. Identificar los constituyentes químicos mayoritarios de las fracciones primarias de CHS y extractos (CHS, Hex, CH ₂ Cl ₂ y MeOH (<i>p</i> CHS)) con mayor efecto biológico.....	30
9.5.1. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de los extractos Hex y CH ₂ Cl ₂ y de algunas fracciones poco polares (I columna) del extracto CHS.....	30
9.5.2. Detección de los constituyentes químicos de las fracciones polares: primaria F85-90, precipitado 117-129 y <i>p</i> CHS.....	30
9.5.2.1. Reacción de acetilación del precipitado <i>p</i> CHS y su fraccionamiento.....	31
9.5.2.2. Reacción de acetilación del extracto MeOH y su fraccionamiento.....	31
9.5.2.2. Reacción de hidrólisis ácida del extracto MeOH y CHS.....	32
9.5.2.3. Separación de azúcares, aminoácidos (aa) y glucosinolatos de los extractos CHS, MeOH y de <i>p</i> CHS por CC.....	33
9.5.2.4. Desarrollo del método analítico por HPLC para la separación de polifenoles presentes en <i>p</i> CHS y extracto MeOH.....	34
9.6. Objetivo 7. Ensayo de toxicidad aguda (DL ₅₀).....	35
9.7. Objetivo 8. Inducción de Inflamación crónica con Adyubante de Freund Completo (AFC) 29 días.....	36
9.8. Análisis estadístico.....	37
10. RESULTADOS (OBJETIVOS).....	38

10.1. Objetivo 1. Rendimiento de los extractos orgánicos (CHS, Hex, CH ₂ Cl ₂ y MeOH) y de <i>p</i> CHS e identificación de los constituyentes químicos de los extractos y <i>p</i> CHS.....	38
10.2. Objetivos 2 y 5: Efecto antiinflamatorio de los extractos (CHS, Hex, CH ₂ Cl ₂ y MeOH), fracciones primarias CHS y muestras <i>p</i> CHS, <i>r</i> CHS y <i>Amz</i>	39
10.2.1. Modelo carragenina	39
10.3 Objetivo 3. Efecto antioxidante por el método colorimétrico DPPH de los extractos Hex, CH ₂ Cl ₂ , MeOH y <i>p</i> CHS.....	48
10.4. Objetivos 4, 5 y 6. Fraccionamiento e Identificación los constituyentes químicos mayoritarios de las fracciones primarias de CHS y extractos (CHS, Hex, CH ₂ Cl ₂ , y MeOH (<i>p</i> CHS)) con mayor efecto biológico.	50
10.4.1. Fraccionamiento primario del extracto CHS y análisis por CG-EM de algunas fracciones....	50
10.4.2. Detección de componentes químicos presentes en la muestra <i>p</i> CHS.....	58
10.4.3. Acetilación de <i>p</i> CHS y su fraccionamiento	60
10.4.4. Fraccionamiento en CC-FN del extracto MeOH acetilado.	62
10.5.5. Fraccionamiento por CC-FN del extracto MeOH hidrolizado.....	64
10.6.6. Identificación de aminoácidos y azúcares en el extracto CHS y MeOH por CCF-FN	67
10.7.7. Desarrollo del método analítico por HPLC para la separación de los polifenoles de las muestras <i>p</i> CHS, <i>r</i> CHS y del extracto MeOH.	69
10.9. Objetivo 7. Determinación de la toxicidad aguda (DL ₅₀) de los extractos de <i>C. serrata</i> en ratones Balb/C.....	73
10.10. Objetivo 8. Efecto antiinflamatorio en el modelo de AFC.	77
11. DISCUSIÓN.....	82
12. CONCLUSIONES GENERALES.	93
12.1. CONCLUSIÓN FINAL.....	95
13. PERSPECTIVAS	95
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
ANEXOS	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes químicos aislados de algunos géneros de la familia <i>Cleomaceae</i>	19
Tabla 2. Sistemas de elusión para compuestos polares.....	29
Tabla 3. Rendimiento de extractos orgánicos preparados a partir de <i>C. serrata</i>	38
Tabla 4. Efecto antioxidante de los extractos, <i>p</i> CHS y <i>H</i> MeOH de <i>C. serrata</i>	49
Tabla 5. Compuestos detectados en los extractos Hex y CH ₂ Cl ₂ mediante análisis de CG-EM.	50
Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto CHS por CC-FN.	51
Tabla 7. Compuestos detectados en las fracciones primarias de CHS mediante análisis de CG-EM.52	
Tabla 8. Fracciones obtenidas del II fraccionamiento por CC-FN del extracto CHS de <i>C. serrata</i>	58
Tabla 9. Fraccionamiento químico por CC-FN del precipitado <i>p</i> CHS acetilado.	60
Tabla 10. Fraccionamiento primario del extracto MeOH acetilado.....	63
Tabla 11. Fraccionamiento secundario de la F41-56 por CC-FN.	63
Tabla 12. Fracciones obtenida de <i>p</i> CHS y del extracto MeOH (IA) por CC/SP-207.....	69
Tabla 13. Fraccionamiento primario del extracto Hex por CC-FN.....	72
Tabla 14. Efecto del extracto CHS de <i>C. serrata</i> sobre el peso (g) de los ganglios poplíteos y el porcentaje (%) de inhibición de ratones macho Balb/C con inflamación crónica inducida con AFC.	80
Tabla 15. Efecto del extracto CHS de <i>C. serrata</i> sobre el peso absoluto (g) y el peso relativo (%) de los órganos en ratones macho Balb/C.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metodología empleada para el extracto CHS	24
Figura 2. Metodología empleada para los extractos orgánicos	25
Figura 3. CCF-FN y CCF-FR comparativa de los extractos orgánicos (<i>C. serrata</i>) con el extracto original CHS.	38
Figura 4. Perfil cromatográfico del fraccionamiento primario del extracto CHS (I CCF).....	53
Figura 5. Cromatografía en capa fina de fase normal y fase reversa comparativa de los extractos Hex, CH ₂ Cl ₂ y de MeOH de <i>C. serrata</i>	55
Figura 6. Cromatografía en capa fina de fase normal comparativa de las fracciones primarias del extracto CHS.....	57
Figura 7. CCF-FR comparativa de las muestras <i>p</i> CHS, <i>r</i> CHS, de CHS y MeOH de <i>C. serrata</i> y Cromatograma UPLC-DAD-MS/MS de <i>p</i> CHS.....	59
Figura 8. CCF-FN de las fracciones secundarias obtenidas por CC-FN del precipitado <i>p</i> CHS acetilado.	61
Figura 9. Espectro RMN- ¹ H del compuesto mayoritario obtenido de la fracción primaria F24-44 de <i>p</i> CHS acetilado.	62
Figura 10. CCF-FN comparativa <i>H</i> MeOH y <i>H</i> CHS con diferentes estándares.....	65
Figura 11. CCF-FN comparativa <i>H</i> MeOH y <i>H</i> CHS con diferentes estándares.....	66
Figura 12. Cromatograma de HPLC de <i>H</i> MeOH y del estándar comercial de camferol.....	66
Figura 13. CCF-FN comparativa de los extractos CHS y MeOH de <i>C. serrata</i> con algunos estándares de aminoácidos y azúcares.....	68
Figura 14. CCF-FN comparativa de la muestra IA, polifenoles, aa y azúcares.....	70

Figura 15. Detección de azúcares y aa en las fracciones obtenidas de <i>p</i> CHS y del extracto MeOH por CCF.....	71
Figura 16. Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de <i>C. serrata</i> sobre el edema plantar (% de inhibición) en ratones macho Balb/C determinado en el modelo de inflamación crónica al día 27..	78

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de <i>C. serrata</i> en edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.....	39
Gráfica 2. Efecto antiinflamatorio del extracto CH ₂ Cl ₂ de <i>C. serrata</i> en edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.....	40
Gráfica 3. Efecto antiinflamatorio del extracto Hex, MeOH y el precipitado <i>p</i> CHS de <i>C. serrata</i> en edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.	40
Gráfica 4. Efecto antiinflamatorio de las fracciones primarias del extracto CHS sobre el edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.	41
Gráfica 5. Efecto antiinflamatorio de <i>H</i> MeOH en el modelo de edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a diferentes tiempos.	42
Gráfica 6. Efecto antiinflamatorio de <i>r</i> CHS y <i>Amz</i> en el modelo de edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.....	43
Gráfica 7. Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de <i>C. serrata</i> sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.....	44
Gráfica 8. Efecto antiinflamatorio de los extractos de <i>C. serrata</i> sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb.	44
Gráfica 9. Efecto antiinflamatorio del precipitado <i>p</i> CHS de <i>C. serrata</i> sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.....	45
Gráfica 10. Efecto antiinflamatorio de las fracciones de CHS de <i>C. serrata</i> sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.....	45
Gráfica 11. Efecto antiinflamatorio de las fracciones de CHS de <i>C. serrata</i> sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.....	46
Gráfica 12. Efecto antiinflamatorio de <i>H</i> MeOH en el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.	47
Gráfica 13. Efecto antiinflamatorio de <i>Amz</i> y <i>r</i> CHS de <i>C. serrata</i> en el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.....	47
Gráfica 14. Efecto del extracto CHS de <i>C. serrata</i> sobre el peso corporal de ratones Balb/C.	74
Gráfica 15. Efecto de los extractos Hex y CH ₂ Cl ₂ de <i>C. serrata</i> sobre el peso corporal de ratones Balb/C.....	75
Gráfica 16. Efecto del extracto MeOH de <i>C. serrata</i> sobre el peso corporal en ratones Balb/C.	76
Gráfica 17. Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de <i>C. serrata</i> de sobre el edema plantar (mm) y % de inhibición del edema plantar en ratones macho Balb/C determinado en el modelo de inflamación crónica.	78
Gráfica 18. Efecto del extracto CHS de <i>C. serrata</i> sobre la ganancia de peso corporal (g) en ratones macho Balb/C tratados por vía i.g. con el extracto CHS en el modelo de inflamación crónica.	79

ABREVIATURAS

- **AA:** Ácido araquidónico
- **aa:** Aminoácido
- **ABTS:** ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
- **AcOEt:** Acetato de etilo
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **AFC:** Adyuvante completo de Freud
- **AINEs:** Antiinflamatorios no esteroideos
- **ANOVA:** Análisis de Varianza
- **AP-1:** Proteína activadora 1
- **AR:** Artritis reumatoide
- **Balb/C:** Ratón albino
- **BW:** Peso corporal (del inglés body weight)
- **C₄H₁₀O:** n-Butanol
- **CAT:** Catalasa
- **CC:** Cromatografía en columna
- **CCF-FN:** Cromatografía en capa fina fase normal
- **CCF-FR:** Cromatografía en capa fina fase reversa
- **CC-FN:** Cromatografía en columna de fase normal
- **CD:** Antígenos de diferenciación (del inglés cluster of differentiation)
- **CDs:** Células dendríticas
- **CG-EM:** Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
- **CH₂Cl₂:** Diclorometano
- **CH₃CN:** Acetonitrilo
- **CH₃COOH:** Ácido acético
- **CHCl₃:** Cloroformo
- **CHS:** Extracto CH₂Cl₂:EtOH 1:1 de partes aéreas de *C. serrata*
- **COVID-19:** Enfermedad infecciosa causada por el coronavirus en el 2019 (del inglés coronavirus disease of 2019)
- **COX-1/COX-2:** Ciclooxigenasa -1/2 (del inglés cyclooxygenase-1/2)
- **CTLA-4:** Ag-4 asociado al linfocito T citotóxico
- **DE₅₀:** Dosis efectiva media
- **DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- **ERN:** Especies reactivas de nitrógeno
- **ERO:** Especies reactivas de oxígeno
- **EtOH:** Etanol
- **EU:** Estados Unidos
- **FARME:** Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
- **FBZ:** Fenilbutazona
- **GC:** Glucocorticoides
- **GPC:** Ganancia de peso corporal
- **GPx:** Glutación peroxidasa
- **GSH:** Glutación reducido
- **H₂SO₄:** Ácido sulfúrico
- **Hex:** Hexano
- **HMeOH:** Producto de hidrólisis del extracto MeOH
- **HOCl:** Ácido hipocloroso

- **HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés high performance liquid chromatography)
- **hrs/h:** Horas/hora
- **i.g.:** Intragástrica
- **i.p.:** Intraperitoneal
- **ICAM-1:** Molécula de adhesión intercelular (del inglés intercellular adhesion molecule-1)
- **IL:** Interleucina
- **IMSSM:** Instituto Mexicano del Seguro Social de México
- **INDO:** Indometacina
- **iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible
- **LOX:** Lipoxigenasa
- **LPS:** Lipopolisacárido
- **LT:** Leucotrienos
- **MeOH:** Metanol
- **MPO:** Enzima mieloperoxidasa
- **Na₂SO₄:** Sulfato de sodio anhidro
- **NFκB:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- **NO:** Óxido Nítrico
- **NO⁺:** Cation de nitrosonio
- **NO₂:** Dióxido de nitrógeno
- **NP:** Difenilboriloxietilamina
- **OA:** Osteoartritis
- **ONOO⁻:** Peroxinitrito
- **pCHS:** Precipitado amarillo obtenido del Extracto CHS
- **PCR:** *Proteína C reactiva*
- **PEG:** Polietilenglicol etanólico 4000 (PEG)
- **PGE₂:** Prostaglandina E₂
- **PTGS2:** Prostaglandina endoperóxido sintasa 2 (del inglés prostaglandin-endoperoxide synthase)
- **RAW264.7:** Línea celular de macrófagos murinos
- **RMN-¹H:** Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
- **SNK:** Posthoc Student–Newman–Keuls
- **SOD:** Superóxido dismutasa
- **Th:** Células T colaboradoras Th (del inglés T-helper)
- **TNF-α:** Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés tumour necrosis factor alpha)
- **TPA:** 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol
- **TX:** Tromboxanos
- **TXA₂:** Tromboxano A₂ (del inglés thromboxane A₂)
- **UPLC-DAD-MS/MS:** Cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplado a masas-masas (del inglés ultra high performance liquid chromatography with diode-array detector coupled with mass spectrometry)
- **USD:** dólares americanos
- **VCAM-1:** molécula de adhesión vascular 1 (del inglés vascular cell adhesion molecule 1)

RESUMEN

Cleoserrata serrata (familia *Cleomaceae*) es utilizada en el estado de Tabasco, México para tratar la "úlceras del chiclero". En este trabajo se describe por primera vez el potencial antioxidante y antiinflamatorio de los extractos CH₂Cl₂:EtOH (CHS), Hex, CH₂Cl₂ y MeOH de *C. serrata*.

Algunos componentes identificados en las fracciones de baja y mediana polaridad del extracto CHS fueron el palmitato de etilo, ácido palmítico, fitol, acetato de fitol, γ - y β -sitosterol, ácido linoleico, vitamina E, y γ -sitosterol y estigamasterol. En las fracciones polares se identificó rutina, un derivado glucosilado de acetina. En el extracto Hex se identificó etil éster del ácido linoleico, palmitato de etilo, vitamina E, y γ -sitosterol. En el extracto CH₂Cl₂ se detectó ácido palmítico, vitamina E, estigamasterol, γ - y β -sitosterol. Del extracto MeOH se obtuvo un precipitado (*p*CHS), el cual fue acetilado y de este se obtuvo sacarosa y un glucoflavonoide del tipo acetina.

La hidrólisis ácida del extracto MeOH permitió obtener la fase orgánica (*H*MeOH). En *H*MeOH se identificó la quercetina, camferol, escopoletina, ácido *p*-cumárico y en la fase acuosa se detectaron azúcares. Los extractos CHS, MeOH y *p*CHS contienen aminoácidos, polifenoles (rutina), azúcares y glucosinolatos. El efecto antioxidante de los extractos de *C. serrata* fue escasa.

El efecto antiinflamatorio de carragenina, CHS a 300 mg/kg inhibió el 60.83% a las 5 hrs y sus fracciones primarias mostraron mejor efecto antiinflamatorio a menor dosis. El extracto Hex y *p*CHS mostraron efecto dosis dependiente (DE₅₀ = 131.46 y 64.86 mg/kg, respectivamente). El extracto MeOH a las tres dosis probadas mostró alrededor de 45% de inhibición, sin efecto dosis dependiente. *H*MeOH resultó más activo a dosis más baja (25 mg/kg). La muestra rica en polifenoles (*r*CHS) mostró un 34.28 % a 150 mg/kg.

El efecto antiinflamatorio evaluó en el modelo de TPA (éster de forbol), el extracto CHS inhibió el 66.66% a 1 mg/oreja. Las fracciones primarias de este extracto resultaron iguales o más activas que el extracto original. Los extractos MeOH y Hex mostraron una inhibición de la inflamación entre el 40 y 57% a 1 y 2 mg/oreja, y solo el extracto CH₂Cl₂ y *p*CHS mostraron efecto dosis dependiente (DE₅₀= 0.79 y 0.47 mg/oreja). *H*MeOH a 0.5, 1 y 2 mg/oreja inhibió el 38.44, 37.51 y 41.03%, respectivamente. *r*CHS inhibió mejor que el control positivo con un 63.63% a 2 mg/oreja.

En el modelo de inflamación crónica a 28 días, el extracto CHS fue administrado por vía i.g. del día 7 al 27. El extracto CHS a una dosis de 150 mg/kg presentó mejor efecto antiinflamatorio que el control positivo (Fenilbutazona; FBZ), desde el día 7 al 27, siendo mayor el efecto antiinflamatorio (40.69 y 39.72 %) en los días 13 y 19. A mayor dosis (300 mg/kg) solo mostró efecto antiinflamatorio entre el día 17 y 19 con 35.06 y 34.33 % de inhibición. Los animales tratados con CHS (150 y 300 mg/kg) mostraron ganancia de peso corporal a partir del día 19 hasta el día 27, en cambio los animales tratados con FBZ perdieron peso del día 7 al 27, al igual que tratados con AFC. El extracto CHS a 150 y 300 mg/kg redujo el tamaño de los ganglios respecto al grupo AFC, con efecto similar a la FBZ. Además, el peso de hígado, riñones, y corazón fue menor en los grupos de FBZ y del extracto a ambas dosis respecto al grupo AFC. La DL₅₀ de CHS, MeOH, Hex, CH₂Cl₂ fue > 2 g/kg, i.g. en ratones macho Balb/C. *C. serrata* contiene compuestos de diferente naturaleza química que son responsables de su efecto biológico.

ABSTRACT

Cleoserrata serrata (family *Cleomaceae*) is used in the state of Tabasco, Mexico to treat "chewing gum ulcer". In this work, the antioxidant and anti-inflammatory potential of the extracts CH₂Cl₂:EtOH (CHS), Hex, CH₂Cl₂ and MeOH of *C. serrata* is described for the first time.

Some components identified in the low and medium polarity fractions of the CHS extract were ethyl palmitate, palmitic acid, phytol, phytol acetate, γ - and β -sitosterol, linoleic acid, vitamin E, and γ -sitosterol and stigmasterol. Rutin, a glycosylated derivative of acacetin, was identified in the polar fractions. Linoleic acid ethyl ester, ethyl palmitate, vitamin E, and γ -sitosterol were identified in the Hex extract. Palmitic acid, vitamin E, stigmasterol, γ - and β -sitosterol were detected in the CH₂Cl₂ extract. A precipitate (*p*CHS) was obtained from the MeOH extract, which was acetylated and sucrose and an acacetin-type glucoflavonoid were obtained from it.

Acid hydrolysis of the MeOH extract allowed the organic phase (*H*MeOH) to be obtained. In *H*MeOH, quercetin, campferol, scopoletin, *p*-coumaric acid were identified and sugars were detected in the aqueous phase. CHS, MeOH and *p*CHS extracts contain amino acids, polyphenols (rutin), sugars and glucosinolates. The antioxidant effect of the extracts of *C. serrata* was scarce.

The anti-inflammatory effect of carrageenan, CHS at 300 mg/kg inhibited 60.83% at 5 hours and its primary fractions showed a better anti-inflammatory effect at lower doses. The Hex extract and *p*CHS showed a dose-dependent effect (ED_{50} = 131.46 and 64.86 mg/kg, respectively). The MeOH extract at the three doses tested showed around 45% inhibition, without a dose-dependent effect. *H*MeOH was more active at a lower dose (25 mg/kg). The sample rich in polyphenols (*r*CHS) showed 34.28% at 150 mg/kg.

The anti-inflammatory effect evaluated in the TPA (phorbol ester) model, the CHS extract inhibited 66.66% at 1 mg/ear. The primary fractions of this extract were equal to or more active than the original extract. The MeOH and Hex extracts showed an inhibition of inflammation between 40 and 57% at 1 and 2 mg/ear, and only the CH₂Cl₂ and *p*CHS extracts showed a dose-dependent effect (ED_{50} = 0.79 and 0.47 mg/ear). *H*MeOH at 0.5, 1 and 2 mg/ear inhibited 38.44, 37.51 and 41.03%, respectively. *r*CHS inhibited better than the positive control with 63.63% at 2 mg/ear.

In the chronic inflammation model at 28 days, the CHS extract was administered i.g. from day 7 to 27. The CHS extract at a dose of 150 mg/kg presented a better anti-inflammatory effect than the positive control (Phenylbutazone; FBZ), from day 7 to 27, the anti-inflammatory effect being greater (40.69 and 39.72%) in on days 13 and 19. At a higher dose (300 mg/kg) it only showed an anti-inflammatory effect between days 17 and 19 with 35.06 and 34.33% inhibition. Animals treated with CHS (150 and 300 mg/kg) showed body weight gain from day 19 to day 27, whereas animals treated with FBZ lost weight from day 7 to 27, as did those treated with AFC. The CHS extract at 150 and 300 mg/kg reduced the size of the ganglia compared to the AFC group, with a similar effect to that of the FBZ. In addition, the weight of liver, kidneys, and heart was lower in the FBZ and extract groups at both doses compared to the AFC group. The LD₅₀ of CHS, MeOH, Hex, CH₂Cl₂ was > 2 g/kg, i.g. in male Balb/C mice. *C. serrata* contains compounds of a different chemical nature that are responsible for its biological effect.

1. INTRODUCCIÓN.

La inflamación se define como un proceso de protección del sistema inmunológico en los tejidos vascularizados, donde se activan mecanismos celulares y moleculares destinados a destruir, aislar o eliminar estímulos nocivos (lesión, trauma, microorganismos, irritantes).¹ Si esta condición se mantiene por cortos periodos de tiempo (horas /días) se denomina inflamación aguda, pero sí se mantiene por largos periodos de tiempo (meses a años) se denomina inflamación crónica. Los mecanismos efectores del sistema inmunológico que desencadenan la inflamación también pueden generar estrés oxidante y daño en los tejidos.² En la inflamación crónica siempre se genera un tejido fibroso y necrosis, el daño depende del tipo de tejido u órgano afectado. Además, la inflamación crónica se asocia con enfermedades cardiovasculares, cáncer y afecciones reumáticas, como la artritis reumatoide (AR), lupus y osteoartritis (OA), entre otros padecimientos.³

La inflamación crónica se caracteriza por la participación de células del sistema inmunológico, como neutrófilos, macrófagos, la activación de linfocitos Th y B productores de anticuerpos. Los macrófagos activados a través del factor de transcripción nuclear κB (NF- κB), liberan citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) y producen mediadores lipídicos (como prostaglandinas -PGE₂-) por medio de la actividad de ciclooxigenasas (COX).³ Así mismo, los macrófagos y neutrófilos, a través de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO) y el óxido nítrico sintasa (iNOS), contribuyen a la generación de moléculas altamente reactivas (especies reactivas de oxígeno -ERO- y de nitrógeno -ERN-). Esta situación puede exceder los mecanismos endógenos de defensa antioxidante enzimática [superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y no enzimática (glutatión reducido, GSH)], favoreciendo la oxidación de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Por lo tanto, el estrés oxidante generado por la inflamación puede dañar a los tejidos y promover la progresión y aparición de enfermedades inflamatorias crónicas.^{4,5}

Dentro de las enfermedades inflamatorias crónicas esta la AR, una enfermedad autoinmune e inflamatoria que afecta el 1% de las personas a nivel mundial. La AR tiene un impacto socioeconómico importante en términos de costo, discapacidad y pérdida de productividad. La AR se caracteriza por un prominente edema tisular y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Adicionalmente, se genera hiperplasia celular, aumento de moléculas de adhesión en la superficie celular e infiltración celular inflamatoria que, al principio, implica solamente a neutrófilos y linfocitos. En la fase crónica participan células mononucleares, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas (CDs), linfocitos Th y B. Por otro lado, las ERO y ERN contribuyen a la patología con posterior destrucción y fibrosis tisular.⁶⁻⁸

Para la AR, al igual que en otras enfermedades inflamatorias crónicas, tales como la OA, la lesión musculoesquelética, así como la espondiloartritis y el cáncer (es difícil caracterizar al proceso canceroso como una enfermedad inflamatoria crónica), el tratamiento farmacológico es a largo plazo; dirigido a disminuir la sintomatología y la actividad inflamatoria. Además, evita la progresión de la lesión estructural articular y prevenir la invalidez en los pacientes. Sin embargo, esta terapia puede ejercer efectos adversos graves a la salud (lesiones hepáticas y renales, gastritis, inmunosupresión).⁹ Debido a esto, entre el 60-90% de los pacientes con AR usan medicina alternativa que incluye plantas medicinales.¹⁰ La investigación en fitofármacos utilizados para el tratamiento de la AR ha permitido poner en evidencia el potencial antiinflamatorio de diversos compuestos químicos obtenidos de plantas medicinales.

Las especies que pertenecen a la familia *Cleomaceae*, que incluye a los géneros *Cleome*, *Corynandra*, *Gynandropsis*, *Cleoserrata* y *Tarenaya*, son ampliamente usados en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (enfermedades reumáticas y de la piel), fiebre y malaria. Se ha descrito que algunas especies han mostrado importante actividad antiinflamatoria aguda en el modelo de carragenina y crónica en el modelo de artritis inducida por adyuvante completo de Freud (AFC), así como antinociceptiva *in vivo*. En modelos *in vitro* mostraron actividad inmunomodulador en macrófagos y polimorfonucleares. Así como actividad antioxidante *in vitro* por los métodos de ABTS y DPPH. En la familia *Cleomaceae* se han identificado principalmente polifenoles, flavonoides, carbohidratos/glucósidos, alcaloides, esteroides, saponinas, cumarinas, quinonas y terpenos.¹¹

En este trabajo es de interés la especie *C. serrata* (Jacq.) Iltis (Sin. *Cleome serrata* Jacq.), comúnmente conocida como “mastuerzo” o “zumkak”. Esta especie se distribuye en el sur y centro de México, es empleada para el tratamiento de infecciones de la piel e infecciones bacterianas.¹²

Alamilla-Fonseca *et al.* (2018), reportaron que, en el estado de Tabasco, México, las hojas se utilizan para el tratamiento de la “úlceras del chiclero”, infección generada por *Leishmania* spp, la cual produce lesiones inflamatorias cutáneas.¹³ En Panamá, el grupo amerindio Kuna la emplea para el tratamiento de la mordedura de serpiente.¹⁴

La evaluación preliminar del extracto (CH₂Cl₂:EtOH 1:1) de las hojas de *C. serrata* mostró efecto antiinflamatorio agudo por vía tópico y sistémico, empleando el modelo de edema auricular inducido con 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol en ratón (TPA) y en el modelo de edema plantar inducido con carragenina, respectivamente (datos no publicados). Actualmente no existen estudios que reporten el efecto antiinflamatorio y antioxidante de *C. serrata*. En este contexto y con el fin de

contribuir en la búsqueda de una alternativa terapéutica antiinflamatoria, en este trabajo se aporta información sobre el potencial antiinflamatorio y antioxidante de *C. serrata* así como su toxicidad y perfil fitoquímico.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. Inflamación aguda, subaguda y crónica.

La inflamación fue descrita por el enciclopedista romano Celso y el médico griego Galeno en cinco signos cardinales: *calor* y *rubor* (generados por el aumento del movimiento de la sangre a través de los vasos dilatados), *hinchazón* (edema; aumento del paso del líquido desde los vasos sanguíneos dilatados y permeables hacia los tejidos circundantes), *dolor* (resultado de respuestas iniciales o prolongadas por mediadores inflamatorios en el tejido conectivo) y *functio laesa* (pérdida de función; inmovilidad de la articulación o reemplazo funcional con tejido cicatricial).¹⁵

Actualmente se define a la inflamación como parte de un mecanismo de defensa del cuerpo en el que el sistema inmune reconoce y elimina los estímulos dañinos, y comienza el proceso de curación. En la inflamación se reconoce una *fase de inducción* (reconocimiento de señales de daño tisular, detección de agentes endógenos y exógenos), seguido por el *pico de inflamación* (reclutamiento de células efectoras y liberación de mediadores químicos de la inflamación) y la *fase de resolución* (estímulo nocivo eliminado, restauración y homeostasis en el tejido). La falta de resolución en la inflamación conduce a enfermedades inflamatorias crónicas. Los factores que afectan esta condición pueden ser genéticos (genes involucrados en la modulación de la respuesta inmune), por la alteración en mecanismos que promueven la autoinmunidad o debidos a procesos que conllevan a la pérdida de la función barrera-epitelio, lo que permite la exposición a los agentes nocivos.¹⁶⁻¹⁷

La respuesta inflamatoria puede clasificarse en *aguda*; cuando se logra eliminar el antígeno en unas pocas horas o días, y dan lugar a la resolución de la inflamación. En este proceso se observa una respuesta inmune no específica (inmunidad innata), mediada principalmente por neutrófilos y macrófagos; el tejido conectivo está vascularizado y ocasionalmente puede generarse necrosis.¹⁸ Sin embargo, si el proceso dura de 2 a 6 semanas se denomina *inflamación subaguda*, siendo el período entre la inflamación aguda y crónica. Si el proceso inflamatorio se mantiene por periodos prolongados de varios meses a años se presenta una *inflamación crónica*.¹⁸ En esta condición la persistencia del estímulo se mantiene y los mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune van a depender del tipo de células y órganos del tejido inflamado. Este proceso se caracteriza por presentar una respuesta inmune específica (inmunidad adaptativa), con

participación de macrófagos, fibroblastos y linfocitos (linfocitos Th y B). En esta condición siempre se produce en tejido fibroso y se presenta necrosis.¹⁹

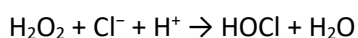
2.2. Elementos celulares y químicos implicados en la inflamación y el estrés oxidante.

En el proceso inflamatorio participan diversos componentes, como las citocinas proinflamatorias TNF- α y TNF- β , así como fagocitos mononucleares, linfocitos Th y B, que interactúan con las células endoteliales para inducir ICAM-1 (moléculas de adhesión intercelulares), VCAM-1 (moléculas de adhesión vasculares) y selectina E, lo que permite la salida de granulocitos. Los TNFs son potentes activadores de neutrófilos, mediadores de adherencia celular, quimiotaxis, degranulación y estallido respiratorio.¹⁹ La IL-1 es producida por fagocitos mononucleares, células endoteliales, queratinocitos, células sinoviales, osteoblastos y neutrófilos. La IL-1 activa a los linfocitos Th, al mejorar la producción de IL-2. La IL-1 interactúa con el sistema nervioso central para producir fiebre, letargo, sueño y anorexia.¹⁹ La IL-6 es producida por las células fagocíticas mononucleares y por linfocitos Th y B, fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos. La IL-6, media la activación, el crecimiento y diferenciación de células Th, y tiene un papel principal central en la polarización a la respuesta Th17. Además, es un regulador importante de la termogénesis corporal. Los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas maduras y secretan inmunoglobulinas (IgG e IgM).¹⁹

Otros mediadores químicos de importancia son: histamina, serotonina, bradiquinina y eicosanoides (tromboxanos; TX), leucotrienos (LT) y prostaglandinas (PG). Estas moléculas participan en la vasodilatación de arterias y aumento de la permeabilidad de capilares, lo que permite que los neutrófilos y proteínas sanguíneas se muevan de los vasos sanguíneos hacia el intersticio. Además, participan en la inducción del dolor por la activación de terminaciones nerviosas locales, como la PGE₂.²⁰ La biosíntesis de PG se inicia por acción enzimática de COX-1 y COX-2, las cuales son importantes en la inflamación y homeóstasis, así como en la citoprotección epitelial gástrica. La enzima COX-2 (PTGS2; prostaglandina-endoperóxido sintasa 2) es altamente inducida por estímulos en los sitios de inflamación, y sintetiza los mediadores que participan en la promoción del dolor, fiebre y la progresión tumoral.²¹

Por otro lado, durante el proceso inflamatorio crónico, el equilibrio redox se altera, provocando estrés oxidante, produciendo ERO y ERN. Los mecanismos antioxidantes endógenos como CAT, SOD, GPx y GR, y no enzimáticos (GSH), se ven alterados, provocando la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, lo que genera daño tisular.²²

Una de las principales proteínas producidas por los neutrófilos activados es la MPO, con actividad microbicida al producir moléculas oxidantes. Esta genera ácido hipocloroso en presencia de peróxido de hidrógeno:²³



Por otro lado, los macrófagos activados producen óxido nítrico (NO, cuya vida media es de 20 s) a partir del aminoácido L-arginina y oxígeno molecular por la actividad enzimática del iNOS para inhibir la replicación de patógenos. iNOS produce mayores cantidades de NO, alcanzando concentraciones micromolares, durando horas o días. En los tejidos con alta producción de NO hay formación de ERN por procesos como nitración (adición de NO₂), nitrosación (adición de NO⁺) y oxidación.²⁴

2.3. Enfermedades inflamatorias crónicas como un problema de salud.

Enfermedades reumáticas

Desde la segunda mitad del siglo XX se observa un incremento en la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles, las cuales son de elevada morbilidad y generan severos problemas sanitarios y socioeconómicos. Dentro de estas están las enfermedades reumáticas de larga duración y lenta progresión como la AR, OA, fibromialgia y gota, las cuales se distinguen por la presencia de dolor, rigidez o movilidad reducida, inflamación crónica y estrés oxidante.²⁵

Salaffi *et al.* (2019)²⁵ reportó que la AR tiene mayor impacto en la calidad de vida que las demás enfermedades reumáticas. Con distribución mundial, la AR afecta a cualquier persona, con mayor predisposición en mujeres. Puede presentarse a cualquier edad. Sin embargo, la incidencia y la tasa de mortalidad aumenta por razones naturales en adultos mayores.²⁵ En México se registraron 854,029 casos de enfermedades reumáticas, en el Servicio de Especialidades del IMSS durante el 2008. En primer lugar, se registró a la dorsalgia con 194,795 individuos (22.8%) de los cuales el 26 % son hombres (76,234) y el 21.1 % son mujeres (118,561), en segundo lugar, se encontró a la artrosis de rodilla con 99,150 casos (11.6%) donde 35,078 son hombres (12 %) y 64,072 son mujeres (11.45%) y en tercer lugar se encuentra la AR con 59,744 (7%) casos de AR, de los cuales, el 2.8 % fueron hombres (8,330) y el 9.2 % fueron mujeres (51, 414). Otras enfermedades reumáticas registradas fueron lesión de hombro (6.1%), artrosis (6%), entesopatías (3.5%), Sinovitis y tenosinovitis (2.3%) entre otras enfermedades reumáticas menores <2% .²⁶

En México no se cuenta con datos estadísticos actualizados sobre las enfermedades reumáticas; sólo un estudio realizado por Peláez-Ballestas *et al.* (2011)²⁷ describió que en cinco estados (Chihuahua, Nuevo León, Sinaloa, Yucatán y Ciudad de México) de la República Mexicana, con una

muestra de 19,213 individuos, el 68.8% (11,602) fueron mujeres con una edad promedio de 42 años. Los pacientes de este estudio presentaron una prevalencia de OA del 10.5 %, AR (1.6%), fibromialgia (0.7%), gota (0.3%), espondilitis anquilosante (0.14%), lupus (0.07%). De los pacientes en esta población solo el 25.6% (4,930 personas) recibieron tratamiento médico; donde el 34.2% emplearon antiinflamatorios no esteroideos, el 1.9% (367 personas), consulta de médicos generales (11.5%) uso medicina alternativa y el 1.7% acudió con fisioterapeutas. Se ha asociado la prevalencia de desórdenes musculoesqueléticos a mujeres de edad avanzada. Las mujeres tienen mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad reumática; por ejemplo, la AR predominó en mujeres con el 1.8% en comparación con el 0.8% en los hombres. En OA 8.08 % fueron hombres y el 11.1 % fueron mujeres.²⁷ En América Latina, la población más afectada es la de niveles socioeconómicos bajos por no tener adecuados programas de salud pública, lo que se traduce en retraso en el acceso temprano a la atención médica, al diagnóstico y tratamiento no oportuno.²⁸

Las enfermedades reumáticas son padecimientos que representan altos costos en los servicios de atención primaria y son las causas médicas más comunes de ausencias prolongadas en el trabajo al producir discapacidad; requieren atención y tratamiento continuo y prolongado. Mould-Quevedo *et al.* (2008)²⁹ describieron que en México el costo promedio anual por paciente con AR ascendió a \$610 USD, lo que representa el 15% del ingreso familiar. Los costos directos institucionales por paciente/año con AR fueron de \$1724.2 USD y el costo total anual por paciente con AR fue de \$2334.3 USD; los medicamentos, los exámenes de laboratorio y de gabinete y las terapias alternativas fueron los gastos más empleados.²⁹ En Estados Unidos (EU), los gastos totales nacionales de atención médica atribuibles a la AR y las pérdidas de ingresos entre los adultos ≥ 18 años fue de \$303.5 mil millones en 2013. Se ha estimado que los gastos médicos nacionales atribuibles a la AR fueron de \$139.8 mil millones (rango de \$135.9 a \$ 157.5 mil millones).³⁰

La presencia de enfermedades no transmisibles que cursan con inflamación crónica, como la AR, es el resultado del estilo de vida, falta de ejercicio y tipo de alimentación poco saludable. Es importante mencionar que los hábitos alimenticios influyen en la salud humana y pueden influir en gran medida en la progresión y manifestación de enfermedades reumáticas.³¹ En los EU, aproximadamente el 80% de los adultos mayores tienen al menos una afección crónica y, aproximadamente el 50%, tiene al menos dos padecimientos. Xu y Lin (2017)³² describieron que los principales factores asociados con AR en EU son la edad avanzada, tabaquismo, diabetes, obesidad, osteoporosis y pobreza; estos resultados fueron obtenidos del análisis de datos de la encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición en una población de 8,789 (8, 483 sin AR y 306 con AR),

con edades de entre 20 a 55 años, que incluyó mexicoamericanos, hispanos, blancos no hispanos, negros no hispanos y de otras poblaciones (incluidos los multirraciales).

Inflamación y Obesidad

La obesidad es la acumulación de grasa anormal o excesiva en el cuerpo humano y se considera un rasgo característico del síndrome metabólico (desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes); además, contribuye al daño en articulaciones. El estilo de vida, la escasa actividad física y la ingesta de una dieta elevada en ácidos grasos saturados y las comidas con alto índice glucémico provocan aumento del peso corporal y contribuyen al estrés oxidante y a la inflamación crónica de bajo grado.³³

En la actualidad existe un incremento en obesidad a nivel mundial; por ejemplo, para el 2016, la OMS reportó que 1900 millones de adultos (> 18 años) tenían sobrepeso; de los cuales, aproximadamente 650 millones eran obesos y 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso o eran obesos. Se estima que en el 2019 fue la causa directa de 1.5 millones de defunciones y en el 2012, 2.2 millones de personas fallecieron como consecuencia de la hiperglucemia.³⁴ El exceso de grasa o carbohidratos en los tejidos adiposos genera hiperplasia e hipertrofia de los adipocitos, induciendo hipoxia, necrosis e infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, favoreciendo la liberación de mediadores inflamatorios como TNF- α e IL-6. Además, IL-6 estimula, en los hepatocitos la producción de la proteína C reactiva (PCR). Esta proteína es utilizada para detectar infecciones e inflamaciones de lesiones agudas; está asociada a niveles reducidos de adiponectina que son necesarios para mejorar la sensibilidad a insulina. Además, existe un aumento de ERO que conduce al estrés oxidante. Estrés oxidante y la inflamación están involucrados con la aterosclerosis, la hipertensión y la alteración de marcadores metabólicos y, por lo tanto, en eventos cardiovasculares adversos importantes.³⁵

2.4. Principales terapias antiinflamatorias y efectos adversos.

Automedicación y antiinflamatorios

Los agentes anti-inflamatorios no esteroides (AINE) son los agentes más empleados en la clínica en monoterapia o en combinación con otros fármacos, para tratar diversas enfermedades en las que se presenta un proceso inflamatorio (AR, OA, lesión musculoesquelética, espondiloartritis, migrañas y cáncer de colon).³⁶ El periodo de administración de los AINEs es variable, por lo que esta variabilidad conduce a la automedicación, representando un problema para los sistemas de salud, ya que pueden generar la aparición de toxicidad, dependencia, interacciones medicamentosas, falta de efectividad por tiempo inadecuado de tratamiento, dosis insuficiente o indicación errónea,

incluso puede enmascarar la presencia de otra enfermedad. Los AINEs tienen efectos secundarios variables (gastro-duodenal, intestinales, cutáneos, renales y hepáticas) y son responsables de aproximadamente el 10% de los casos de lesión hepática inducida por fármacos. En una población de 1486 pacientes ambulatorios, de la Ciudad de Buenos Aires, se encontró que existe una prevalencia de automedicación de antiinflamatorios y analgésicos del 34.6%, siendo el ibuprofeno (40.2%), paracetamol (25.8%), aspirina (19.4%), diclofenaco (9.1%), meloxicam (2.3%) y tramadol (0.8%) los más empleados.³⁷ Los AINE son responsables del 30 % de los ingresos hospitalarios por reacciones adversas a medicamentos, principalmente por hemorragia, infarto de miocardio, ictus y daño renal.

Actualmente, ante la pandemia por COVID-19, hubo un aumento en el empleo de medicamentos para prevenir o tratar el COVID-19, lo que provocó un desabasto e incremento en los precios, así como aumento en los riesgos de intoxicaciones y efectos adversos. En un estudio observacional descriptivo para conocer la automedicación como estrategia para prevenir o tratar el COVID-19, donde se incluyeron 790 personas en Lima, Perú, se encontró que los medicamentos de mayor autoconsumo, previos al inicio de la pandemia fueron analgésicos (29.1%), antiinflamatorios (28.1%) y antibióticos (27.6%); y durante la pandemia, los más empleados fueron la combinación de antibióticos/antiinflamatorios (39.2%) y de antiinflamatorios solos (30.9%).³⁸ Aun no se conocen los riesgos o beneficios en reportes científicos, sin embargo, alguno informes anecdóticos de pacientes que estuvieron graves por COVID-19, también estuvieron expuestos a Ibuprofeno. Este medicamento se supone podría aumentar el receptor de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), el cual es el receptor para el virus SARS-CoV-2, (Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2) por lo que la Agencia Reguladora de Medicamentos y Productos Sanitarios del Reino Unido recomendó evitar los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).³⁸ Se conoce que los AINEs pueden aumentar los riesgos cardiovasculares y, a largo plazo, aumentar la mortalidad por COVID-19.³⁹ En el 2021 se realizó un estudio sistemático de las prácticas en la automedicación para prevenir o manejar COVID-19, en una revisión sistemática de siete estudios (Perú, Uganda, Nigeria, Bangladesh) se encontró que los medicamentos más empleados en la automedicación eran antibióticos, cloroquina o hidroxiclороquina, paracetamol, vitaminas o suplementos, ivermectina e ibuprofeno. Existe una falta de estudios en algunas regiones como América del Norte, Medio Oriente, África y Oceanía, algunos factores que pueden estar involucrados en la automedicación es la falta de promoción, la regulación y la posibilidad de acceder a algunos medicamentos sin receta.⁴⁰

La función de los AINEs está dada por su capacidad para inhibir la biosíntesis de las prostanglandinas (PG), de acuerdo con la selectividad sobre las enzimas COX-1 y COX-2, al interactuar y unirse al sitio activo de la enzima, impidiendo la unión a su sustrato (AA, ácido araquidónico), por lo que son inhibidores competitivos.

Los AINEs como meloxicam, nimesulida, ketorolaco y diclofenaco muestran cierta selectividad para inhibir la COX-2 sobre la COX-1. En cambio, los fármacos como celecoxib, valdecoxib, rofecoxib, etoricoxib y lumiracoxib son selectivos para inhibir exclusivamente COX-2. Valdecoxib y rofecoxib fueron retirados del mercado a nivel mundial por incrementar el riesgo de infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.⁴¹

Se conoce la importancia de las PG a nivel gastrointestinal, renal y cardiovascular; por lo que el bloqueo de COX-1 puede reducir la producción de prostanoides y conducir a efectos adversos como dispepsia, esofagitis, úlceras gastrointestinales, erosiones en el intestino delgado, retención de sodio, hipertensión, insuficiencia renal aguda, riesgo cardiovascular; así como inhibición plaquetaria por inhibición de TXA₂. Los efectos de los AINEs van a depender de la duración y la dosis administrada; además, la edad incrementa el riesgo de manifestar alguno de estos efectos adversos.⁴²

Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) son derivados del cortisol o hidrocortisona producidos por las glándulas suprarrenales y son la terapia principal para enfermedades inflamatorias y autoinmunes, como asma bronquial, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, AR, lupus eritematoso sistémico y esclerosis múltiple. Los principales GC empleados en clínica son prednisolona, metilprednisolona, betametasona y dexametasona. Sus efectos se inician cuando se unen al receptor de GR presente en casi todos los tejidos del cuerpo; esta unión conduce a la regulación de la transcripción de genes relacionados con efectos inmunosupresores, como los factores de transcripción AP-1 (proteína activadora 1) y NF-κB, inhibiendo la transcripción de TNF-α, IL-1 e IL-6, y modificando la expresión de COX-2.⁴³

Los GC, al ser estructuralmente parecidos al cortisol endógeno, están asociados con graves efectos secundarios, pueden disminuir la respuesta inmune, aumentando la susceptibilidad a infecciones microbianas, parasitarias y virales; además, puede incrementar el catabolismo proteínico, ocasionando osteoporosis y adelgazamiento de la piel. También se puede generar el aumento y redistribución de la grasa corporal, lo que conlleva a la obesidad. Otros trastornos que también pueden presentarse son hipertensión, hiperglucemia, anovulación y amenorrea.⁴⁴

Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME)

Los FARME son inmunosupresores e inmunomoduladores indicados para el tratamiento de la AR, artritis psoriásica y la espondilitis anquilosante. También son empleados en enfermedades del tejido conectivo, como la esclerosis sistémica, el lupus eritematoso sistémico y el síndrome de Sjögren, así como miositis inflamatoria, vasculitis, uveítis, enfermedad inflamatoria intestinal, algunos tipos de cáncer e infecciones virales, como la COVID-19.⁴⁵

Los FARME se dividen en sintéticos y biológicos, siendo los primeros los más empleados, como el metotrexato, leflunomida, hidroxicloroquina, sulfasalazina y GC. Los biológicos se dirigen a una vía específica del sistema inmune, como los antagonistas de TNF (infliximab, golimumab, certolizumab pegol, etanercept), antagonistas del receptor IL-1 (anakinra), antagonistas del receptor IL-6 (tocilizumab), anticuerpo monoclonal quimérico con unión al antígeno CD20 (rituximab) y abatacept, que es una proteína de fusión que se une a CTLA-4 (Ag-4 asociado al linfocito T citotóxico). El empleo de estos fármacos requiere de la evaluación del beneficio hacia el paciente versus los efectos adversos a largo plazo. El uso de FARME en pacientes con AR inmunodeprimidos incrementa el riesgo a infecciones como la tuberculosis, parasitosis y herpes. De forma general, el metotrexato, leflunomida y sulfasalazina puede generar malestares gastrointestinales, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, mielosupresión y neumonitis. El metotrexato y leflunomida pueden causar alopecia. La hidroxicloroquina se considera como uno de los FARME con mejor perfil de seguridad porque no aumenta el riesgo de infecciones y sus efectos dependen de la dosis y de la acumulación. Algunos de los efectos más graves e irreversibles son la retinopatía, miopatía y arritmias ventriculares. El empleo de los FARME biológicos puede generar el aumento de infecciones bacterianas, virales y fúngicas. Los FARME anti-TNF están asociados a la presencia de linfoma y el cáncer de piel.⁴⁶

2.5. El papel de los productos naturales en el tratamiento de la inflamación.

En años recientes, las personas con AR acuden a la medicina tradicional mediante el empleo de las llamadas plantas medicinales, debido a: A) experiencias positivas en la mejora de ciertos padecimientos, B) la insatisfacción de los tratamientos farmacológicos convencionales, C) efectos adversos que se manifiestan por el uso de medicamentos usados en la clínica, D) difícil acceso a los servicios de salud primarios, E) presencia de enfermedades crónicas (hipertensión, cáncer, AR, incontinencia urinaria, asma y fractura de cadera), que provocan tensión financiera.⁴⁷ Asimismo, se reporta que los padecimientos tratados más frecuentemente con plantas medicinales en México son enfermedades del sistema inmune, enfermedades dérmicas, problemas musculoesqueléticos,

gastrointestinales, hipertensión, infecciones, gripa, fiebre, tos, diabetes, inflamación, AR e infecciones urinarias.⁴⁸

En México algunas especies vegetales son empleadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, como lesiones cutáneas y enfermedades crónicas como la AR. Se ha demostrado que contienen compuestos con actividad antiinflamatoria, los cuales se han evaluado *in vivo* a través de dos modelos de inflamación aguda a nivel tópico, empleando el TPA, y a nivel sistémico, empleando la carragenina. Así como el modelo de inflamación crónica con AFC. Este tipo de investigaciones permite obtener evidencia científica, generando una posibilidad para el descubrimiento de fármacos más efectivos con menos efectos adversos.⁴⁹ Por ejemplo, el extracto EtOH de las partes aéreas de *Moussonia deppeana* (Schltdl. & Cham.) Klotzsch ex Hanst, (A. Gray), conocida como “tlachichinole” empleada en la medicina tradicional de México, contiene apigenina y hesperetina. Algunas de las fracciones obtenidas por partición de este extracto presentaron β -sitosterol, estigmasterol, mezcla de ácido ursólico y oleanólico, presencia de derivados del ácido cafeico o clorogénico; y como compuesto mayoritario el verbascósido. En un ensayo de toxicidad aguda (14 días), el extracto EtOH fue administrado a una dosis de 2 g/kg por vía i.g. en ratones macho y hembra Balb/C, y no se observaron alteraciones macroscópicas en órganos.

Además, la administración del 1 g/kg por vía i.g. durante 28 días (toxicidad subaguda) en ratones macho Balb/C, no mostró alteraciones bioquímicas, hematológicas, ni a nivel histológico. Respecto a su efecto antiinflamatorio por vía tópica en el modelo de TPA, mostró una $DE_{50} = 1.41$ y 1.53 mg/oreja en ratones macho y hembras Balb/C, respectivamente. En el modelo sistémico de carragenina, en ratones macho se observó un 52.22% de inhibición del edema y en hembras un 50.69% a una dosis de 450 mg/kg.⁵⁰

Gutiérrez-Rebolledo *et al.* (2018)⁵¹ reportó que el extracto EtOH estandarizado con base en el contenido de verbascósido (79.2 mg/gr de extracto seco), a 450 y 900 mg/kg administrados por vía i.g. diariamente, a partir del día 7 al día 28 en el modelo de AR inducido con AFC en ratones Balb/C, inhibió la inflamación del edema plantar de forma similar, con el 15, 24 y 25% durante los días 15, 21 y 28, respectivamente, en comparación con el grupo CFA sin tratamiento. El efecto antiinflamatorio del extracto en ambas dosis fue similar al del grupo PBZ 100 mg/kg (24%). Durante el experimento de AFC se registró la ganancia de peso corporal y se observaron, a dosis de 450 mg/kg, valores similares a los ratones sanos. El día 28 se realizó un recuento de linfocitos en los grupos tratados con AFC y se observó que con el extracto hubo una disminución estadísticamente significativa del 48,91%, en comparación con el grupo CFA no tratado ($5,95$ células $\times 10^3/L$), similar

incluso a los valores mostrados por animales sanos ($4,30 \text{ células} \times 10^3/\text{L}$). Se determinó en el tejido del edema la tasa de oxidación mediante la determinación del contenido de proteínas carboniladas y la peroxidación lipídica, encontrando que el extracto a dosis de 450 mg/kg, disminuyó estos parámetros en un 52.18 y 45.53%, respectivamente. En cortes histológicos de los tejidos ganglionares se observó que reduce la hiperplasia folicular en los ganglios poplíteos y la infiltración leucocitaria de los ratones tratados con AFC.

Por otro lado, *Cnidoscolus tehuacanensis* Breckon, una especie endémica conocida como “mala mujer”, es empleada para el tratamiento del reumatismo, artritis y hemorroides. El extracto $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) mostró efecto antiinflamatorio con una $\text{DE}_{50}=1.79 \text{ mg/oreja}$ y 567.3 mg/kg en el modelo de TPA y carragenina, respectivamente. La fracción con alto contenido de acetato de lupeol (90.4%) y con 8.9% de acetato de β -amirina, mostró significativo efecto antiinflamatorio por vía tópica, inhibiendo el edema en un 57.28% a 2 mg/oreja y la fracción polar 151 (con isoorientina y amentoflavona) mostró el 75.65 % de inhibición del edema en oreja a la misma dosis. La fracción con alto contenido de acetato de lupeol y de acetato de β -amirina inhibió el 41.86% el edema plantar inducido con carragenina.⁵² Juárez-Vázquez *et al.* (2020)⁵³ reportaron que el acetato de lupeol (componente mayoritario de *C. tehuacanensis*) mostró una $\text{DE}_{50}= 1.79 \text{ mg/oreja}$ (modelo TPA) y en el modelo de carragenina a dosis de 100, 150 y 250 mg/kg mostró 43.31, 40.22 y 51.25 % de inhibición, respectivamente a la 5 h. En el modelo de inflamación crónica inducido con AFC (28 días), el acetato de lupeol a la dosis de 125 mg/kg inhibió el edema plantar de forma similar al control positivo, FBZ (100 mg/kg); además, inhibió la actividad de COX-2.

El extracto $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) de las hojas de *Cnidoscolus chayamansa* (Mc Vaugh), conocida como “espinaca mexicana”, contiene principalmente moretenol, acetato de moretenilo, escopoletina kaempferol-3,7-dimetil éter y 5-hidroxi-7-3', 4'-trimetoxiflavanona, moretenona y acetato de lupeol. Esta especie es de valor nutricional (vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos grasos). En el modelo de TPA, el extracto mostró una $\text{DE}_{50}= 1.66 \text{ mg/oreja}$ similar al control INDO ($\text{DE}_{50}= 1.74 \text{ mg/oreja}$) y en el modelo de carragenina mostró una $\text{DE}_{50}= 351.53 \text{ mg/kg}$.⁵⁴ Mediante el fraccionamiento químico del extracto $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1) se obtuvo la fracción poco polar F12-42, la cual presentó una $\text{DE}_{50}= 50.11 \text{ mg/kg}$ en el modelo de carragenina y una $\text{DE}_{50}= 1.48 \text{ mg/oreja}$ en el modelo de TPA; esta fracción contiene lupeol, β -amirina, acetato de β -amirina, moretenona y acetato de lupeol. El mismo extracto, a 200 mg/kg administrado por vía i.g. diariamente a partir del día 7 al 28 en un modelo de inflamación crónica plantar (28 días) inducido por AFC, mostró una inhibición del edema a partir del día 14 al 28 con un 45.33% de inhibición; este extracto también

mostró un efecto hepatoprotector y favoreció la ganancia de peso corporal en un modelo de daño hepático inducido con la mezcla de fármacos antituberculosos (rifampicina/isoniazida/pirazinamida, 50:50:100 mg/kg) administrado en un periodo de 39 días.⁵⁵

Sphaeralcea angustifolia Cavanilles & Don, conocida como “vara de San José”, es una especie empleada en México para el tratamiento de la inflamación y heridas. A partir del fraccionamiento del extracto CH₂Cl₂ se identificó una mezcla de amirinas, estigmasterol, β-sitosterol, escopoletina e hidroxycumarina. El extracto CH₂Cl₂ administrado a dosis de 100 mg/kg por vía i.p. una vez al día en un modelo de inflamación crónica inducido por AFC, a partir del día 2 mostró un 49.37% de inhibición del edema y, administrado por 12 días vía i.p. en el modelo de AFC (20 días), inhibió el edema con un 40.2 al 50.1% a partir del día 14 al día 20. El extracto a 2 mg/oreja administrada por vía tópica en un modelo de inflamación crónica inducido por múltiples aplicaciones de TPA (180 min) tuvo un 50.6% de inhibición del edema.⁵⁶ En un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado con una formulación farmacéutica del extracto de *Sphaeralcea angustifolia* estandarizado con base a su contenido de escopoletina y tomentina al 1% en presentación en gel y una formulación que contenía diclofenaco en el cual participaron 113 personas (55 en el grupo experimental y 58 en el grupo de control), aplicando el tratamiento tópicamente durante 4 semanas, se observó su efectividad terapéutica y tolerabilidad en pacientes con osteoartritis en las manos. La efectividad terapéutica fue del 89% del extracto y 91,3% del diclofenaco. Ninguno de los tratamientos presentó efectos adversos.⁵⁷

2.6. Productos herbales comerciales para el tratamiento de la inflamación.

Algunos extractos herbales han mostrado buen efecto antiinflamatorio, menos toxicidad y escasas reacciones adversas; como el extracto acuoso de la corteza de *Manguifera indica* L. Vimang®, de uso clínico en Cuba. En este extracto se han identificado ácidos fenólicos (ácido gálico, 3,4 dihidroxi ácido benzoico, ácido benzoico), éster fenólico (ácido gálico éster metílico, propil éster del ácido gálico, propil ácido benzoico éster), flavan-3-oles (catequina y epicatequina) y el componente mayoritario mangiferina (10%); además, ácidos grasos como mirístico, palmítico, esteárico, oleico-linoleico y eicosatrienoico. Este producto, a 0.5 y 2 mg/oreja disminuyó la inflamación en los modelos de inflamación tópica inducida por ácido araquidónico, con un porcentaje de inhibición del 41 y 49.7%, y el acetato de miristato con una DE₅₀=1.1 mg/oreja en este último modelo. Además, disminuyó la actividad de MPO e *in vitro* en macrófagos RAW264.7 estimulados (LPS-IFNγ o el ionóforo de calcio A23187), inhibió los niveles de PGE₂ y LTB₄.⁵⁸ Este extracto en diferentes formulaciones (tableta, solución acuosa, crema) se registró como

fitomedicamento útil en el tratamiento adyuvante de enfermedades con dolor y/o inflamación. En un estudio clínico de pacientes con OA en rodilla, a los que se les administró una tableta cada 8 h, y se aplicó una crema tres veces al día en la rodilla afectada por tres meses, todos los pacientes mostraron analgesia satisfactoria a partir de los 15-21 días hasta los tres meses; además, se observó inhibición de la proliferación sinovial.⁵⁹

El producto Acheflan® generado en Brasil en forma de crema y aerosol, contiene aceite esencial de *Cordia verbenacea* DC al 0.5%, cuyos componentes principales son el α -humuleno y el (-)-transcariofileno y se emplea en el tratamiento tópico de dolores musculares, tendinitis y otros procesos inflamatorios; además, es empleado en la curación de heridas. En un modelo de inflamación aguda en la pata de rata inducida por LPS, los sesquiterpenos a una dosis de 50 mg/kg administrado por vía oral inhibieron la activación de NF- κ B inducida por LPS y migración de neutrófilos, aunque solo el α -humuleno redujo TNF- α e IL-1.⁶⁰ En un modelo experimental de cicatrización de heridas, como el modelo de heridas por escisión cutánea en ratas Wistar, los animales recibieron un tratamiento tópico diariamente por 8 y 15 días con crema de Acheflan®; el análisis histológico mostró mejor formación y reepitelización de tejido con una mayor distribución de la deposición de colágeno. También se determinó en el tejido, por inmunohistoquímica, la distribución de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), involucrado en el periodo inicial de la cicatrización y, MMP-9 (metaloproteinasas de la matriz) un marcador de remodelación dérmica, los cuales aumentaron, mejorando el proceso de cicatrización de heridas.⁶¹

Por otro lado, el producto herbal Catuama®, comercializado en Brasil hace 20 años, el cual es un tónico medicinal hidroalcohólico de cuatro especies medicinales: *Trichilia catigua* (28.23%), *Paullinia cupana* (40.31%), *Ptychopetalum olacoides* (28.23%) y *Zingiber officinalis* (3.26%), cuyos principales componentes son la cafeína, β -sitosterol y lupeol, a la dosis de 50, 100 y 200 mg/kg, administrado por vía i.g., inhibieron la alodinia mecánica intraplantar inducida por una inyección plantar de AFC (20 μ L) en diferentes tiempos. A todas las dosis probadas, Catuama® inhibió significativamente la alodinia mecánica inducida por CFA, aunque solo la dosis de 200 mg/kg fue eficaz en la reducción de la respuesta nociceptiva (65 %) hasta las 24 h.⁶²

3. ANTECEDENTES.

3.1. Potencial antiinflamatorio de la familia *Cleomaceae*.

La familia *Cleomaceae*, de acuerdo con la descripción taxonómica de Iltis & Cochrane, incluye de 12 a 24 géneros. Entre ellos se encuentran: *Andinocleome* Iltis & Cochrane; *Podandrogyne* Ducke, *Mitostylis* Raf.; *Physostemon* Mart. & Zucc.; *Tarenaya* Raf.; *Cleoserrata* Iltis; *Hemiscola* Raf.; *Peritoma* DC.; *Corynandra* Schrad. Ex Spreng.; *Polanisia* Raf; *Gynandropsis* DC. y *Cleome* L.

Esta familia comprende alrededor de 300 especies (spp), herbáceas o arbustivas con distribución cosmopolita; son muy abundantes en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En Guerrero, México se reconocen 8 géneros y 13 spp. Los géneros mejor representados son *Physostemon*, *Andinocleome* y *Cleoserrata*. En la reserva de la biosfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México, se distribuye el género *Polanisia* y, en Tabasco, México, se ha reportado el género *Cleoserrata*.

Algunos géneros (*Cleome*, *Corynandra*, *Gynandropsis* y *Tarenaya*) han mostrado actividad antinociceptiva, antioxidante y antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda y en crónica (modelo de artritis experimental). Además, se reportó su uso en la medicina tradicional para tratar enfermedades en las que hay un proceso inflamatorio, como enfermedades reumáticas, dolor de oído, dolor de estómago, fiebre y heridas en la piel.¹¹

Por ejemplo, el extracto de MeOH de las hojas de *Tarenaya spinosa* (Sin. *Cleome spinosa*) de origen silvestre y producida por proceso biotecnológico, fueron probadas en un modelo de carragenina a dosis de entre 1 y 50 mg/kg, administrados por vía intraperitoneal (i.p.); ambos extractos mostraron efecto antiinflamatorio y uno mostró inhibición del edema entre

40-50% en la tercera hora, efecto similar al observado con el medicamento de referencia (INDO, 10 mg/kg, administrado por vía i.p. 55-60%).⁶³

El extracto de EtOH (200 y 400 mg/kg, por i.g.) y las fracciones de éter dietílico, EtOAc y n-butanol (C₄H₁₀O) de las partes aéreas de *C. rutidosperma* a 200 mg/kg mostraron efecto antiinflamatorio en el modelo de carragenina a las 3 h. El extracto de EtOH a una dosis de 200 mg/kg redujo el volumen (0.4 mL) y las tres fracciones mostraron valores entre 0.39-0.44 mL, con respecto al control diclofenaco (12.5 mg/kg), que mostró una reducción de 0.31 mL. Además, tanto el extracto (a 200 y 400 mg/kg) como las fracciones a 200 mg/kg, también mostraron efecto inhibitorio en el modelo de inflamación crónica de AFC en ratas, al ser administrados por vía i.g. durante 30 días. En este ensayo, el extracto a 400 mg/kg redujo el tamaño del edema con 0.48 mL; las fracciones a 200 mg/kg

redujeron el tamaño del edema con valores entre 0.44-0.60 mL. El efecto del extracto y las fracciones fue menor con respecto al fármaco de referencia diclofenaco (12.5 mg/kg) con 0.41 mL.⁶⁴

También el extracto MeOH de *Corynandra chelidonii* (Sin. *Cleome chelidonii*) de la planta completa fue evaluado en el modelo de carragenina a una dosis de 200 mg/kg administrado por vía i.g. Este mostró una inhibición del 54.6% del edema en comparación con el fármaco de referencia aspirina (10 mg/kg, i.g.), el cual inhibió el 60.6% a las 3 h.⁶⁵ Este extracto y sus fracciones de CHCl₃ y AcOEt se probaron a una dosis de 50 mg/kg/i.g. en el mismo modelo. A las 4 h mostraron efecto antiinflamatorio significativo con 66.67, 89.33 y 100% de inhibición, respectivamente. Este efecto fue similar a la INDO (100% de inhibición a 10 mg/kg).⁶⁵ El extracto de acetona de las hojas de *Gynandropsis gynandra* (Sin. *Cleome gynandra*) mostró efecto antioxidante *in vitro* por los métodos de ABTS, DPPH y disminuyó la producción de óxido nítrico *in vitro*; el extracto EtOH disminuyó los niveles de TNF- α en el modelo de artritis inducida con AFC en ratas.⁶⁶⁻⁶⁷

3.2. Componentes químicos aislados de la familia *Cleomaceae* con efecto antiinflamatorio.

De extractos orgánicos de algunas especies de la familia *Cleomaceae* se han aislado e identificado diversos metabolitos secundarios del tipo polifenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, carbohidratos/glucósidos, alcaloides, esteroides, saponinas y terpenos, entre otros. Algunos de estos compuestos (**1-13**) aislados han resultado activos y otros aún no cuentan con estudios de efecto biológico (Tabla 1).⁶⁸⁻⁶⁹

A partir del extracto MeOH de las partes aéreas de *Cleome droserifolia* se obtuvieron dos flavonoides activos, identificados como 5,4'-dihidroxi-6,7,8,3',5'-pentametoxiflavona (**14**) y 5,4'-dihidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxiflavona (8-metoxicirsilineol) (**15**). Estos compuestos redujeron la producción de NO, activados con LPS en macrófagos peritoneales que fueron producidos por *Bacillus Calmette-Guérin*. El compuesto **14** (a 10 μ g/mL) inhibió la producción de NO en un 60%, el cual resultó más activo que la genisteína (control positivo), que suprimió la producción de NO en un 41% a 20 μ g/mL, mientras que el compuesto **15** fue menos activo en la producción de NO.⁶⁹

Del extracto MeOH de las semillas de *C. viscosa* se obtuvo una mezcla de cleomiscosinas A-C (**16-17**), las cuales inhibieron la producción de NO, citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias en modelos *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, en ratones sanos se les administró la mezcla de cleomiscosinas a 10, 30 y 100 mg/kg/día (solubilizada en carboximetilcelulosa al 0.5% y administrada por vía intravenosa) durante 14 días consecutivos; posteriormente, se aislaron macrófagos y esplenocitos peritoneales. En el sobrenadante del cultivo de macrófagos peritoneales de ratón estimulados con LPS (1 μ g/mL), aumentó la expresión de IL-6, TNF- α y NO; la mezcla de

cleomiscosinas a 10 y 30 mg/kg disminuyó los niveles de NO con valores de 122.51 y 129.23 nM/mL, respectivamente, en comparación con los macrófagos de control LPS, con 312.31 nM/ mL. Además, el mediador proinflamatorio IL-6 en el control de LPS-macrófagos aumentó (2033.67 pg/mL) y en los animales que recibieron la mezcla de cleomiscosina a 10 mg/kg disminuyó (1067.58 pg/ mL). Asimismo, esta mezcla a 10 y 30 mg/kg inhibió la producción de TNF- α en cultivo de macrófagos con valores de 286.87 y 299.06 pg/ mL, respectivamente, respecto al control de macrófagos LPS (430.97 pg/ mL).⁷⁰

En esplenocitos murinos estimulados con concavalina A (Con-A, 5 μ g/ mL), el nivel de expresión de IL-4 en el sobrenadante fue de 235.47 pg/ mL, y la mezcla de cleomiscosinas a 10 mg/kg aumentó la producción de IL-4 con valores de 327.50 pg/mL. Estos autores llevaron a cabo un estudio adicional para confirmar la expresión de mediadores proinflamatorios (TNF- α e IL-6) en suero y toxicidad aguda, utilizando un modelo *in vivo* de toxicidad letal generado por el tratamiento con LPS (250 μ g/kg). Los cumarinolignoides A-C se administraron a 10 y 30 mg/kg por vía i.g. durante 14 días; después de la última administración se inyectó LPS a los ratones. La mezcla de compuestos inhibió la producción de mediadores proinflamatorios y redujo la mortalidad de animales. A dosis de 10 mg/kg se presentó el 16.66 % de mortalidad (1 de 6 animales murió); a dosis de 30 mg/kg se observó el 66% de mortalidad, con 4 animales muertos de 6, en comparación con el control de LPS donde murieron todos los animales (6 de 6).⁷⁰

En *C. viscosa* se ha encontrado lupeol (**18**), un compuesto con efecto antiartrítico en el modelo de AFC en ratas administrado a una dosis de 50 mg/kg por vía i.g. durante 4 semanas, con disminución significativa en el nivel de TNF- α , IL1 β , IL-6 y aumento de IL-10 en suero.⁷¹

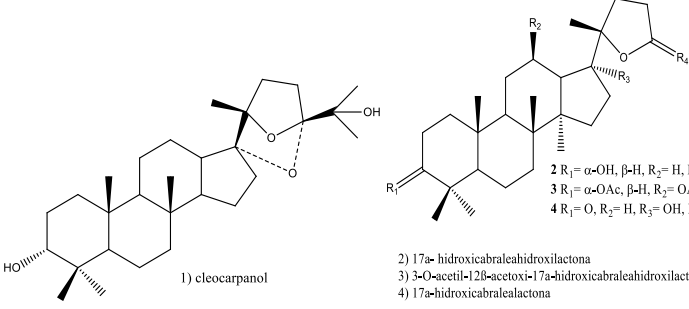
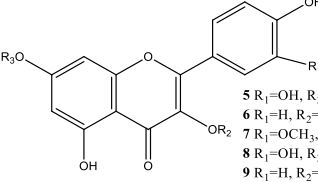
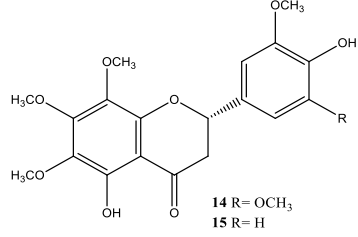
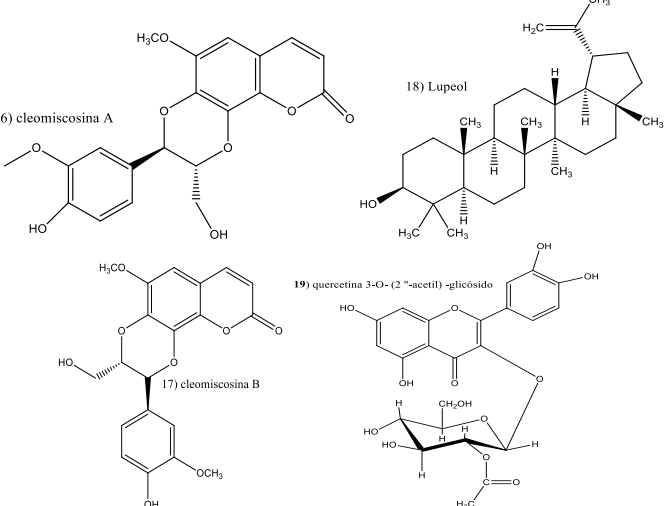
Además, a partir del extracto MeOH de flores frescas de *C. viscosa* se aisló quercetin-3-O-(2''-acetil)-glicósido (**19**); esta flavona, a 100 y 200 mg/kg administrados por vía i.p., mostró efecto antiinflamatorio (51.7 y 45% de inhibición en la segunda fase, 3 h en el modelo de carragenina); el efecto se comparó con FBZ a 100 mg/kg/i.p. con un 70% de inhibición.⁷²

Otros compuestos aislados en *Cleome chrysantha* Decne fue el β -sitosterol y daucosterol.⁷³ Estos esteroides, junto con el ácido linoleico son metabolitos secundarios aislados en el extracto MeOH del apio, salvia y eucalipto con propiedades antiinflamatorias. Los extractos MeOH de estas especies administradas por vía i.g. por 14 días en un modelo de AFC, mostraron efecto antiinflamatorio entre el 47 y 62%.⁷⁴ Algunos compuestos de la familia *Clemaceae* han sido aislados, sin embargo, muchos de ellos no cuentan con evaluaciones biológicas. Por ejemplo, a partir de *Cleome khorassanica* Bunge & Bien. ex Boiss. se obtuvo 3-oxo-4-oxa-A-homo-25,26,27-trinordammarano-24,20-lactona,

20,25-dihidroxi-3-oxodammarano y 5-hidroxi-3,6,7,8,3',4',5'-heptametoxiflavona⁷⁵ de *Cleome rutidosperma* se aisló el ácido 2-etil-ciclohex-2-eno-6-hidroxi-metilen-1-carboxílico y el ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-oico.⁷⁶ A partir de *Corynandra chelidonii* (Sin. *Cleome chelidonii*) fueron aislados una serie de cleomesidos de quercetina y camferol con efecto antioxidante, con $CI_{50} = 17.7 \mu M$, resultando más activos que el ácido ascórbico ($CI_{50} = 45.9 \mu M$).⁷⁷

De forma general, los aceites esenciales de algunas especies de los géneros *Cleome*, *Cleoserrata*, *Corynandra* y *Tarenaya* contienen principalmente ácidos grasos: oleico, linoleico y palmítico, así como el fitol; algunos han sido responsables del efecto antimicrobiano.

Tabla 1. Componentes químicos aislados de algunos géneros de la familia *Cleomaceae*.

Especie	
<p><i>Cleome amblyocarpa</i> Barratte & Murb. (Sin. <i>Cleome africana</i> Botsch)^{78,79}</p>	 <p>1) cleocarpanol</p> <p>2) 17a- hidroxicabraleahidroxilactona 3) 3-O-acetil-12β-acetoxi-17a-hidroxicabraleahidroxilactona 4) 17a-hidroxicabralealactona</p> <p>2 R₁= α-OH, β-H, R₂= H, R₃= OH, R₄= O 3 R₁= α-OAc, β-H, R₂= OAc, R₃= OH, R₄= O 4 R₁= O, R₂= H, R₃= OH, R₄= O</p>
<p><i>Cleome arabica</i> L.⁸⁰</p>	 <p>5 R₁=OH, R₂= glucosil, R₃= ramnosil 6 R₁=H, R₂= glucosil, R₃= ramnosil 7 R₁=OCH₃, R₂= glucosil, R₃= ramnosil 8 R₁=OH, R₂=ramnosil, R₃= ramnosil 9 R₁=H, R₂=ramnosil, R₃= ramnosil 10 R₁= OCH₃, R₂=ramnosil, R₃= ramnosil 11 R₁=OH, R₂= glucosil, R₃= H 12 R₁=H, R₂= glucosil, R₃= H 13 R₁= OCH₃, R₂= glucosil, R₃= H</p> <p>Glicosidos de flavona</p>
<p><i>Cleome droserifolia</i> (Forssk.) Delile ⁶⁹</p>	 <p>14 R = OCH₃ 15 R = H</p> <p>14) 5,4'-dihidroxi-6,7,8,3',5'-pentametoxiflavona 15) 5,4'-dihidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxiflavona [8-metoxicirsilinoel]</p>
<p><i>Corynandra viscosa</i> (L.) Cochrane & Iltis (Sin. <i>Cleome viscosa</i> L.)^{72,81,82}</p>	 <p>16) cleomiscosina A</p> <p>17) cleomiscosina B</p> <p>18) Lupeol</p> <p>19) quercetina 3-O-(2'-acetyl)-glicosido</p>

3.3. Antecedentes biológicos, químicos y etnobotánicos de *C. serrata*.

Cleoserrata es un género segregado del género *Cleome* de acuerdo con datos morfológicos y al número de cromosomas que presenta ($n=12$). Está constituido por cinco especies: *Cleoserrata bahiana* Iltis & M. B, *C. serrata* (Jacquin) Iltis, *C. paludosa* (Willdenow ex Eichler) Iltis ex Soares Neto & Roalson, *C. melanosperma* (S.Watson) Roalson & Soares Neto y *C. speciosa* (Rafinesque) Iltis, las cuales están distribuidas desde México hasta Argentina. Sin embargo, solamente dos especies han sido reconocidas formalmente como *Cleoserrata*: *C. serrata* y *C. speciosa*.^{83, 84}

C. serrata (Sin. *Cleome serrata* Jacq.) se distribuye en Centroamérica, Norteamérica y las Antillas. En México se ha reportado en Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz. Es comúnmente conocida como “mastuerzo” o “zumkak” y es empleada para el tratamiento de las infecciones de la piel e infecciones bacterianas. Alamilla-Fonseca *et al.* (2018) describieron que, en el estado de Tabasco, México, las hojas se utilizan para el tratamiento de la “úlceras del chiclero” (infección provocada por *Leishmania* spp.), la cual produce lesiones inflamatorias cutáneas. Los curanderos mayas de la localidad de “La Chontalpa” tuestan las hojas secas (5-10) en comal y las trituran para generar un polvo que es aplicado sobre la herida, cubriendo con vaselina (5-10 días). En la localidad Cunduacán, Tabasco, es utilizada como infusión para lavar las heridas (durante 7 días), cubriendo con cerumen.^{12,13} En Panamá los grupos amerindios: Kuna, Ngöbe-Buglé y Teribe emplean la especie vegetal en baños de agua caliente y en Kuna para el tratamiento de la mordedura de serpiente.¹⁴

McNeil *et al.* (2012) reportaron 14 compuestos en el aceite esencial de las partes aéreas de *C. serrata* obtenido por hidrodestilación, siendo el (Z)-phytol (53%), di (2-etilhexil)-ftalato (14.7%) y piperonal (11.5%) los mayoritarios. El aceite (1.0 mg/disco) mostró moderada efecto antimicrobiano *in vitro* contra *Escherichia coli* y *Streptococcus pyogenes*, evaluado en el método de difusión en disco.⁸⁵

Recientemente se ha descrito que el extracto $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 1:1 de las hojas, raíces y semillas de *C. serrata* tiene efecto contra amastigotes y promastigotes de *Leishmania mexicana*, con una $\text{DL}_{50}=60.11$ y 23.2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Además, inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de 5, 50 y 500 μg con un diámetro de inhibición de 9, 7 y 5 mm, para *S. aureus* y 9 mm para *P. aeruginosa*, diferente a la ampicilina (20 μg), con un 21.0 mm de inhibición. Se reportó la presencia de alcaloides, esteroides, terpenos, flavonoides y fenoles por análisis cualitativo. Sin embargo, en la actualidad no se han caracterizado los componentes químicos de *C. serrata* responsables del efecto biológico.¹³

La evaluación preliminar (datos no reportados) del extracto CH₂Cl₂:EtOH (1:1) de las hojas de *C. serrata*, colectada en Coatepec, Veracruz, México, mostró efecto antiinflamatorio agudo al ser administrado por vía tópica (2 mg/oreja), inhibiendo el 63% el edema auricular en el ensayo de TPA.

Por vía i.g. (300 mg/kg) mostró 40% de inhibición del edema plantar inducido con carragenina. Actualmente no existen reportes sobre el efecto antiinflamatorio y antioxidante de las hojas de *C. serrata*. En este contexto, y con el fin de contribuir en la búsqueda de una alternativa terapéutica con efecto antiinflamatorio, en este trabajo se aporta información sobre el potencial antiinflamatorio y antioxidante de las hojas de *C. serrata*, su toxicidad aguda y subaguda, y el perfil fitoquímico de los extractos.

4. JUSTIFICACIÓN.

El proceso inflamatorio crónico y el incremento del estrés oxidante están involucrados en la aparición y el mantenimiento de muchos trastornos, como la AR, enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, diabetes tipo 2, enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Las terapias antiinflamatorias actuales en algunos padecimientos no son muy efectivas y provocan diversos efectos secundarios; además son prolongadas y de elevado costo; por ejemplo; las enfermedades reumáticas son las causas médicas más comunes de ausencias prolongadas del trabajo, al provocar discapacidad, requieren atención médica y tratamientos a largo plazo.

Hoy en día es necesario contribuir en la búsqueda de sustancias activas con menos efectos adversos y tóxicos, tanto a corto como a largo plazo. Los fármacos antiinflamatorios más empleados actualmente son los AINES y son responsables del 30% de los ingresos hospitalarios por reacciones adversas y los GC a bajas dosis causan efectos secundarios graves.

A través de estudios fitoquímicos y farmacológicos de extractos de plantas medicinales se ha logrado descubrir compuestos bioactivos que son antiinflamatorios, inmunomoduladores y antioxidantes, como curcumina, colchicina, resveratrol, capsaicina, epigallocatequina-3-galato y quercetina, entre muchos otros.

Algunas especies de la familia *Cleomaceae* se utilizan para el tratamiento de procesos inflamatorios como las enfermedades artríticas y biosintetizan compuestos bioactivos (como acetato de lupeol, 8-metoxicirsilineol, cumarinolignoides) con efecto antiinflamatorio, antioxidante y/o inmunomodulador. La mayoría de las especies de la familia carecen de estudios fitoquímicos, farmacológicos y biológicos que avalen su eficacia e inocuidad. Esta familia es muy importante ya que se considera un modelo para el estudio filogenético de la vía fotosintética C3-C4, tiene

importancia ecológica en estudios de polinización, algunas especies son empleadas como suplementos nutricionales por su alto contenido de aminoácidos, aceites esenciales y polifenoles.

Una especie importante es *C. serrata*; la única especie dentro del género que cuenta con dos estudios sobre su efecto biológico como *antileishmanicida* y antimicrobiana. Esta especie posee escasos reportes sobre sus componentes químicos y no cuenta con estudios sobre su efecto antiinflamatorio y toxicológico. La especie *C. serrata* se considera importante en Cuba por ser hospedera de mariposas y en México es empleada en la medicina tradicional de Tabasco para el tratamiento de úlceras generadas por *leishmania* spp.

Actualmente el género *Cleoserrata* es un género segregado del género *Cleome*, por lo que el estudio fitoquímico puede contribuir a encontrar marcadores quimiotaxonómicos que pueden usarse para establecer una clasificación más sensible, además existe la posibilidad que estos componentes químicos puedan ser de importancia medicinal y estén relacionados con otras especies dentro del género *Cleoserrata* que no tienen investigaciones fitoquímicas y biológicas.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN GENERAL

¿Cuál será el efecto antiinflamatorio, antioxidante y la DL₅₀ de los extractos de diferente polaridad y/o fracciones de *Cleoserrata serrata* en modelos de inflamación aguda y crónica?

PREGUNTAS PARTICULARES

1. ¿Cuáles son los componentes químicos responsables del efecto biológico mostrado por los extractos orgánicos de *C. serrata*?
2. ¿Cuál es el potencial antiinflamatorio, antioxidante y tóxico de los extractos de *C. serrata*?
3. ¿Cuál es la eficacia de los extractos de diferente polaridad de *C. serrata* como antiinflamatorios?

6. HIPÓTESIS

Dado que la evaluación preliminar del extracto CH₂Cl₂:EtOH (1:1) (CHS) de las hojas de *C. serrata* mostró efecto antiinflamatorio agudo; entonces el extracto CHS y los extractos de diferente polaridad (Hex, CH₂Cl₂, y MeOH) de *C. serrata* tendrán compuestos con efecto antiinflamatorio en modelos de inflamación aguda y crónica (artritis experimental) con baja o nula toxicidad aguda.

7. OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial antioxidante y antiinflamatorio; así como contribuir al conocimiento de su perfil fitoquímico y de seguridad toxicológica de las partes aéreas de *C. serrata*.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener cuatro extractos orgánicos (CHS, Hex, CH₂Cl₂, y MeOH) a partir de las hojas y partes aéreas de *C. serrata* por maceración.
2. Determinar el efecto antiinflamatorio agudo *in vivo* en los modelos de carragenina y TPA de los extractos (CHS, Hex, CH₂Cl₂, MeOH y *p*CHS).
3. Determinar el efecto antioxidante por el método colorimétrico de DPPH de los extractos orgánicos (CHS, Hex, CH₂Cl₂, y MeOH) y las muestras (*p*CHS y *H*MeOH)
4. Realizar el fraccionamiento químico de los extractos activos CHS y Hex por métodos cromatográficos.
5. Determinar el efecto antiinflamatorio agudo *in vivo* en el modelo de carragenina y TPA de las fracciones primarias o muestras (*H*MeOH, *Amz*, *r*CHS) del extracto orgánico más activo.
6. Identificar los constituyentes químicos mayoritarios en los extractos, *p*CHS y las fracciones de CHS con efecto biológico.
7. Determinar la toxicidad aguda *in vivo* de los cuatro extractos orgánicos (CHS, Hex, CH₂Cl₂, y MeOH).
8. Determinar el efecto antiinflamatorio en el modelo de inflamación crónica de artritis inducida con adyuvante completo de Freud del extracto activo (CHS).

9. MATERIALES Y MÉTODOS (OBJETIVOS).

Figura 1. Metodología empleada para el extracto CHS

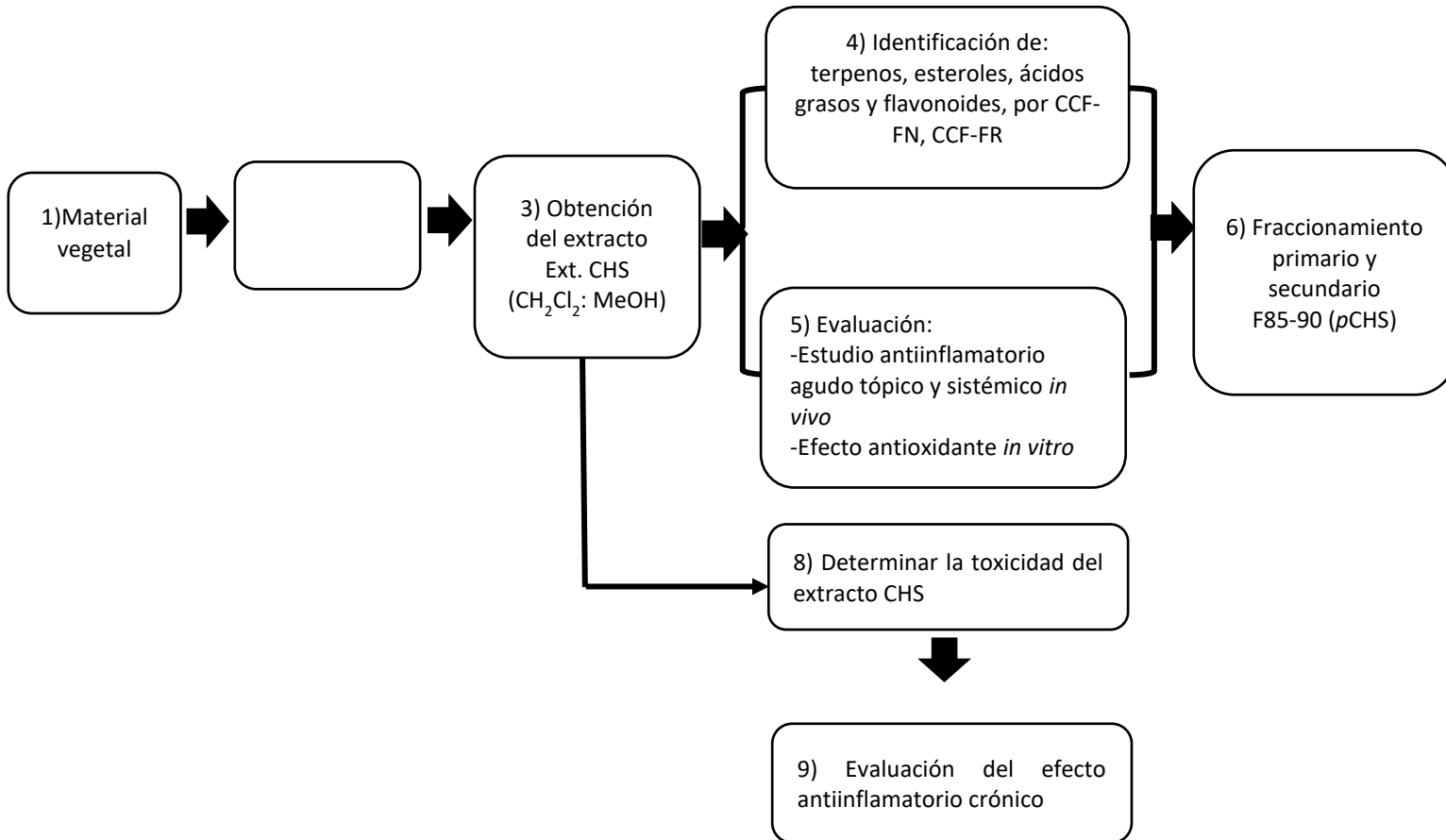
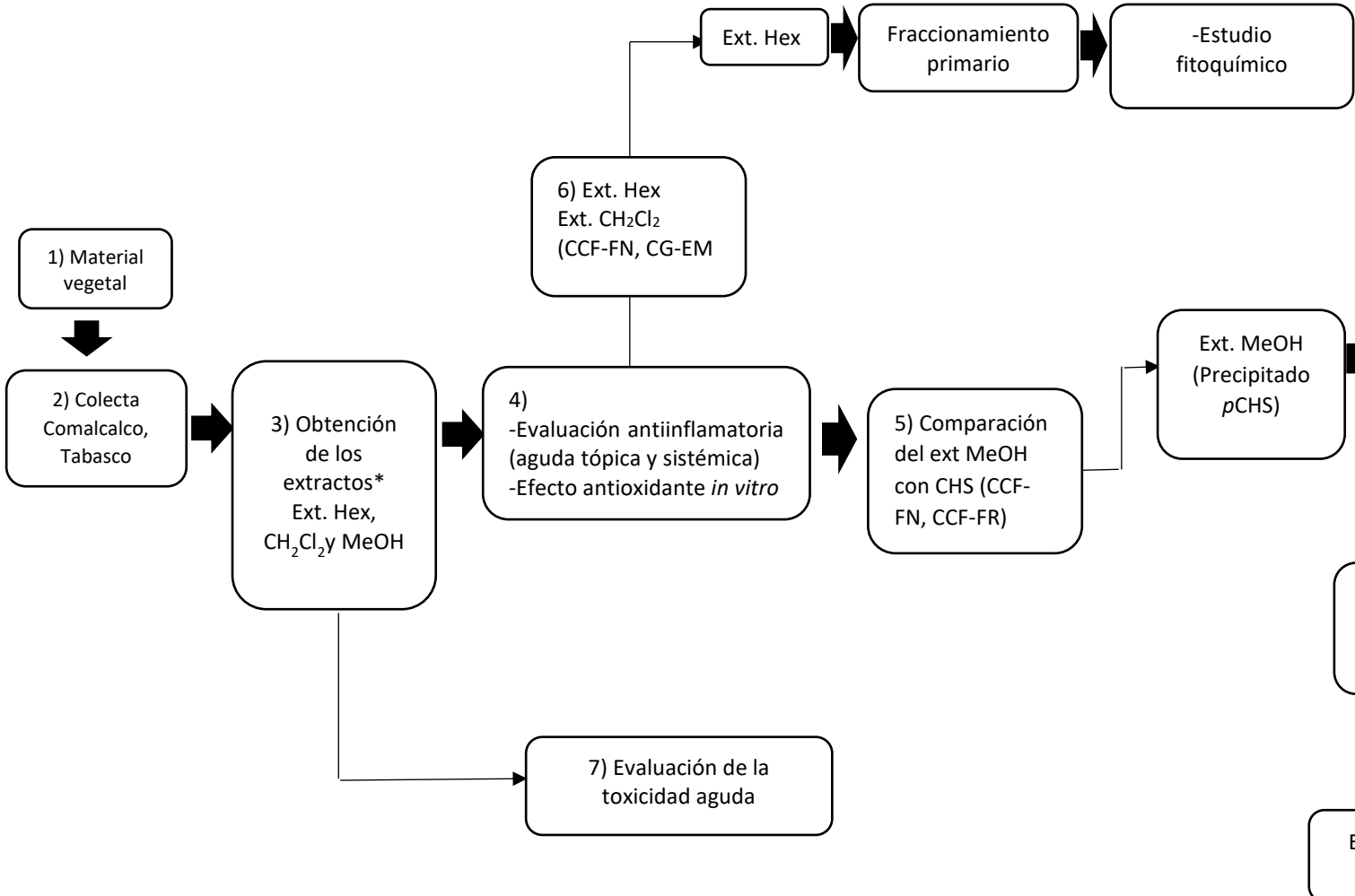


Figura 2. Metodología empleada para los extractos orgánicos.



*Maceración con y sin agitación
** Actividad biológica

9.1. Objetivo 1. Colecta y preparación de los extractos orgánicos CH₂Cl₂:EtOH 1:1 (CHS) y Hex.

Extracto CH₂Cl₂:EtOH 1:1 (CHS).

C. serrata se colectó en el municipio de Coatepec, Veracruz, México, en julio de 2017. Un ejemplar fue depositado en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM) para su identificación y resguardo con la clave IMSSM-16307. Las partes aéreas se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente y se molió en una licuadora convencional. El extracto CH₂Cl₂:EtOH (1:1) se obtuvo a partir del material vegetal (198.9 g) por proceso de maceración (tres veces) a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó en un rotaevaporador a presión reducida. La clave final para este extracto fue CHS.

Extractos de Hex, CH₂Cl₂ y MeOH.

Se realizó una nueva colecta de la planta en el municipio de Comalcalco, Tabasco, México, en agosto de 2018 y un ejemplar se depositó en el herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, con clave de registro FEZA-17841. Las partes aéreas (429 g) se dejaron secar a la sombra a temperatura ambiente y se molieron en una licuadora. Este material se maceró con hexano (Hex) durante 7 días. Posteriormente, este mismo material vegetal se maceró con CH₂Cl₂ y después con MeOH; cada extracción se realizó durante 7 días a temperatura ambiente, sin agitación. Cada extracción se realizó por tres veces y el solvente se eliminó en un rotaevaporador a presión reducida.

De manera adicional, 578.44 g de material vegetal fue macerado con Hex, CH₂Cl₂ y MeOH en forma sucesiva con agitación constante, cuya duración de maceración fue de 30 min. El disolvente fue filtrado a vacío. Este proceso se repitió cuatro veces para cada disolvente de manera individual. Del extracto MeOH se obtuvo un precipitado amarillo (*p*CHS) durante el proceso de eliminación del disolvente.

9.2. Objetivos 2 y 5. Evaluación del efecto antiinflamatorio agudo *in vivo*.

Se utilizaron ratones macho Balb/C (23 ±2 g de peso) provenientes del bioterio del CMN Siglo XXI, IMSS, los cuales se mantuvieron en condiciones de luz-obscuridad de 12 h, a una temperatura controlada (24±2°C), con humedad del 40-70% y con alimento y agua *ad libitum*. El manejo de los animales se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) (Especificaciones técnicas para la producción, el cuidado y uso de animales de laboratorio), modificada en 2016. El proyecto fue aprobado por el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS con número de registro CNIC-IMSS R-2018-785-059.

Las muestras (extractos, fracciones, *p*CHS, *H*MeOH, *Amz*, *r*CHS) fueron evaluadas en los modelos antiinflamatorios de acuerdo con la Fig.1 y 2. La obtención de las muestras será descrita más adelante.

9.2.1. Modelo de edema plantar inducido con carragenina.

La inflamación fue inducida por inyección vía subcutánea en el cojinete plantar de la pata de ratones con carragenina (2%, 20 µL). Como fármaco de referencia se empleó la INDO (10 mg/kg, Sigma ó Fluka). Las muestras se solubilizaron en H₂O:Twen 80 (9:1) y las dosis evaluadas fueron las siguientes:

En primer lugar, fue evaluado el extracto CHS se evaluó a la dosis de 50, 150 y 300 mg/kg y los extractos Hex, CH₂Cl₂, MeOH, posteriormente se evaluaron el precipitado *p*CHS, *r*CHS y *Amz* a dosis de 50, 100, 150 mg/kg. Las fracciones primarias de CHS a dosis de 150 mg/kg; *H*MeOH se evaluarón a 25, 50 y 100 mg/kg.

Las muestras se administraron por vía intragástrica (i.g.) una hora antes de la administración de la carragenina. Los animales se dividieron al azar y se agruparon como sigue: Grupo I: Control carragenina (vehículo); Grupo II-V: carragenina + muestra a evaluar; Grupo VI: carragenina + INDO. Se tomaron medidas del edema subplantar con un micrómetro digital (marca Mitutoyo) a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 7 h). El porcentaje de inhibición del edema fue determinado comparando las mediciones del edema en los distintos tiempos (**Et**) con respecto a la medición basal al tiempo cero, antes de inyectar la carragenina (**Eo**).

El porcentaje de inhibición del edema se determinó siguiendo la siguiente fórmula ⁴⁹:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(\text{Et} - \text{Eo}) \text{ Control carragenina} - (\text{Et} - \text{Eo}) \text{ Grupos tratados}}{(\text{Et} - \text{Eo}) \text{ Control carragenina}} \right] * 100$$

9.2.2. Modelo de edema auricular inducido con 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA).

Este ensayo se realizó de acuerdo con lo descrito previamente.⁴⁹ Las muestras se disolvieron en acetona y las muestras más polares en acetona:MeOH (1:1). Estas se evaluaron a dosis de 0.5, 1 y 2 mg/oreja. Como fármaco de referencia se empleó INDO (2 mg/oreja). Los animales se dividieron al azar y se agruparon como sigue: Grupo I: Control de vehículo; Grupo II-V: TPA + muestra a evaluar (CHS, Hex, CH₂Cl₂ MeOH, *p*CHS, *H*MeOH, *Amz* y *r*CHS), Grupo V: TPA + INDO.

Al grupo control se le administró por vía tópica en la oreja derecha por ambos lados una solución de TPA (2.5 µg/oreja) disuelto en acetona (25 µL) (**Ws**). En la oreja izquierda se le administró 25 µL de acetona (**Wo**). Los grupos tratados recibieron una aplicación tópica en la oreja derecha de TPA

(Ws') y 30 min después se les aplicó las muestras problema o el fármaco de referencia disuelto en 50 µL del vehículo. La oreja izquierda de cada ratón solo recibió 25 µL de acetona (Wo') de forma tópica. Seis horas después, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para tomar una biopsia de 6 mm de diámetro de ambas orejas. El tamaño del edema se determinó de la diferencia de pesos (mg) del tejido tratado (oreja derecha), respecto del tejido no tratado (oreja izquierda).

Los porcentajes de inhibición del edema fueron calculados de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\frac{(Ws - (Wo)_{\text{control}}) - (Ws' - Wo')_{\text{tratados}}}{Ws - (Wo)_{\text{control}}} \right] * 100$$

9.3. Objetivo 3. Evaluación del efecto antioxidante *in vitro* de los extractos CHS, Hex, CH₂Cl₂, MeOH, de pCHS y HMeOH.

Este ensayo se realizó de acuerdo con el método de Brand-Williams, modificado por Miliauskas *et al.* (2004)⁸⁶ El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Sigma-Aldrich, D9132, 1.78 mg) se disolvió en 50 mL MeOH (9 x 10⁻⁵ M) a temperatura ambiente al momento de usarlo y protegido de la luz. Posteriormente, se mezclaron 2.9 mL de la solución de DPPH con 100 µL de la muestra problema (en primer lugar, fueron evaluados los extractos CHS, Hex, CH₂Cl₂ y posteriormente las muestras pCHS y HMeOH) previamente disuelto en MeOH a diferentes concentraciones (5000 a 500 µg/mL). La mezcla se dejó reaccionar 30 min a temperatura ambiente y se procedió a medir su absorbancia a 517 nm, la cual correspondió a la lectura de la muestra (AM). Como control positivo se empleó quercetina (150 a 25 µg/mL). El blanco de reacción fue MeOH (3 mL) y el control MeOH/DPPH (0.1:2.9 mL). El experimento se realizó por duplicado y los datos se extrapolaron en la curva patrón para calcular la concentración inhibitoria media (CI₅₀).

9.4. Objetivo 4. Fraccionamiento químico de los extractos activos CHS y Hex por métodos cromatográficos.

9.4.1. Fraccionamiento del extracto CHS por CC-FN.

El extracto CHS (10 g) se sometió a un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de fase normal (CC-FN), empacada con gel de sílice (60 M 0.063-0.200 mm Merck Millipore) en proporción 1:20. La columna se eluyó con Hex, AcOEt, EtOH y mezcla de estos con polaridad creciente. Cada fracción obtenida (500 mL) fue concentrada y monitoreada mediante cromatografía en capa fina de fase normal (CCF-FN) y fase reversa (CCF-FR), utilizando cromatofolios de gel de sílice 60 F₂₅₄, y 60 RP-18 F₂₅₄ Merck Millipore, respectivamente. Las CCF de estas fracciones fueron reveladas con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 10% y las fracciones de mayor polaridad fueron reveladas con

H₂SO₄ 10% o NP/PEG (difenilboriloxietilamina/polietilenglicol etanólico 4000). Las fracciones con perfil similar fueron reunidas.

Se realizó una segunda CC-FN con 10 g del extracto CHS en las mismas condiciones en las que se llevó a cabo el primer fraccionamiento. Fueron eliminadas las fracciones F8, F30-35, F40-51, F101-102 por bajo rendimientos. A partir de las fracciones más polares (117-129) se obtuvo un precipitado verde-café (4.33 g), el cual mostró un perfil similar al precipitado *p*CHS obtenido del extracto MeOH en CCF-FR, por lo que se le puso la misma clave. En la muestra *p*CHS se observó la presencia de polifenoles, por lo que un siguiente paso fue buscar sistemas de elusión para CCF-FN y FR para las fracciones más polares, los cuales se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Sistemas de elusión para compuestos polares.

Sistema de elusión	Identificación	Autor
CHCl ₃ :MeOH (9:1) FN	Aglicona isoflavonas	Alam <i>et al.</i> (2017) ⁸⁷
CHCl ₃ :CH ₃ COOH:H ₂ O (30:15:2), FN	Flavonoides polares, agliconas	Harborne (1989) ⁸⁸
C ₄ H ₁₀ O:CH ₃ CN:H ₂ O (4:1:5), FN	Flavonoides <i>Cleome</i>	DeepaShree <i>et al.</i> (2014) ⁸⁹
C ₄ H ₁₀ O:CH ₃ COOH:H ₂ O (TBA, 30:10:3), FN	Flavonoides polares	Harborne (1989) ⁸⁸
C ₄ H ₁₀ O:CH ₃ COOH:H ₂ O (BAW, fase superior), FN	Flavonoides polares, glucosidos Antocianinas	Harborne (1989) ⁸⁸
MeOH, MeOH:CH ₃ CN (1:1), FR		
H ₂ O:CH ₃ CN (7:3 o 7.5:2.5), FR	Ácidos fenólicos	Romani <i>et al.</i> (1994) ⁹⁰
CHCl ₃ :acetona:ácido fórmico (75:17:8), celulosa y FN	Flavonoides <i>Cleome</i>	Kasem y Fathy (2016) ⁹¹

*FN: fase normal, FR: fase reversa

9.4.2. Fraccionamiento por CC-FN del extracto Hex.

Se tomaron 15.09 g del extracto de hexano (Hex) y se sometieron a CC-FN en gel de sílice (proporción 1:20), eluyendo con Hex, CHCl₃ y MeOH y mezcla de ellos. Este proceso permitió obtener 122 fracciones primarias de 400 mL, que se agruparon según su perfil cromatográfico en CCF-NP y luego se combinaron en 22 grupos de fracciones (I-XX). Las fracciones fueron comparadas con estándares de referencia. Las fracciones primarias (III, V, VI, IX, XIII, XV, XVII, XIX, XX) se sometieron a análisis GC-MS. Se obtuvieron principalmente esteroides y triterpenos. La fracción primaria XV, eluida con Hex: CHCl₃ 1:1 (1,71 g) se sometió a CC-FN, obteniendo 57 fracciones que se agruparon de acuerdo con su perfil cromatográfico, obteniendo cuatro grupos: XV-a (F1-31, 15 mg), XV-b (F32-39, 317 mg), XV-c (F40-43, 559,7 mg) y XV-d (F44-57, 495,4 mg).

9.5. Objetivo 6. Identificar los constituyentes químicos mayoritarios de las fracciones primarias de CHS y extractos (CHS, Hex, CH₂Cl₂, y MeOH (*p*CHS)) con mayor efecto biológica.

A continuación, se describirán las metodologías empleadas para la identificación de los componentes químicos.

9.5.1. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de los extractos Hex y CH₂Cl₂ y de algunas fracciones poco polares (I columna) del extracto CHS.

Se analizaron cuatro fracciones primarias obtenidas del extracto CHS y los extractos Hex y CH₂Cl₂ por CG-EM. El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890 N) acoplado a un espectrómetro de masas Jeol MS-GCMATE II. La columna de CG empleada fue HP5 de 30 m de largo x 0.32 mm de diámetro, la temperatura programada fue de 40-310°C con una velocidad de calentamiento de 8°C/min; el gas portador fue He (7psi, 1 mL/min), la ionización de los componentes de la muestra se realizó en el modo de impacto electrónico (EI, 70 eV). El porcentaje relativo de cada constituyente de la fracción se expresó como porcentaje con respecto al área del pico. Cada espectro obtenido fue comparado con la base de datos de referencia de los estándares del equipo (NIST Mass Spectrometry Data Center).

9.5.2. Detección de los constituyentes químicos de las fracciones polares: primaria F85-90, precipitado 117-129 y *p*CHS.

La fracción primaria 85-90 (I columna) y el precipitado 117-129 (II columna) fueron comparados con el precipitado obtenido del extracto MeOH (*p*CHS) por CCF-FR. Estas muestras mostraron un perfil similar, indicando la presencia de polifenoles al ser revelado con H₂SO₄ al 10%, por lo que fueron reunidos (clave final *p*CHS). La muestra *p*CHS fue comparada con diversos estándares: naringenina, tilianina, camferol, quercetina, ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico y rutina, empleando como sistema de elusión H₂O:CH₃CN 7:3 en CCF-FR.

La muestra *p*CHS se analizó por UPLC-DAD-MS/MS, empleando un cromatógrafo (Acquity Arc, Waters). La columna empleada fue LUNA OMEGA C18 (150 x 2.1 mm), tamaño de partícula 1.6 µm, Phenomenex; la temperatura programada fue de 40°C, con un flujo de 0.18 mL/min. El sistema de elución fue Fase A: Ácido fórmico al 0.1 %, Fase B: CH₃CN, Fase C: MeOH. La elución se realizó en modo gradiente bajo las siguientes condiciones: 0 → 25 min, 70% A, 15% B, 15% C; 25 → 26 min, 50% A, 25% B, 25% C; 27 → 40 min, 90% A, 5% B, 5% C. La detección UV-Vis fue a 330 nm; con una ventana espectral de 200 a 600 nm, la detección ESI (-) TOF se realizó con una ventana espectral de 100–1000 m/z. Esta técnica permitió confirmar la presencia de polifenoles.

9.5.2.1. Reacción de acetilación del precipitado *p*CHS y su fraccionamiento.

La muestra *p*CHS (259.5 mg) se acetiló con piridina (2.59 mL) y anhídrido acético (2.59 mL) con calentamiento ($\approx 55-56$ °C) durante 22 h. Posteriormente se adiciono agua y se realizó una extracción líquido-líquido con AcOEt (tres veces). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 , se concentró al vacío y se fraccionó por CC-FN empacada con sílice gel (proporción 1:50), eluyendo con Hex, AcOEt, MeOH y mezcla de estos. Se colectaron 140 fracciones de 15 mL y fueron monitoreadas mediante CCF-FN; las fracciones con perfil similar se reunieron y el disolvente se eliminó a presión reducida. Las fracciones 22-44, eluidas con Hex:AcOEt (6:4), se sometieron a proceso de purificación por CCF-FN preparativa de sílice gel 60 con zona de concentración (Merck Millipore). En cada placa se sembraron 15 mg (60 mg) y se eluyó con AcOEt:Hex 6:4 (dos veces). En las placas se observaron cuatro bandas con $R_f=0.17, 0.28, 0.43, 0.56$, las cuales adsorbían a $\text{UV}_{365 \text{ nm}}$; cada banda fue obtenida y desadsorbida con CHCl_3 :AcOEt 1:1 (dos lavados en agitación); posteriormente cada lavado se filtró y el disolvente se eliminó. Al compuesto con $R_f = 0.28$ se le realizó un análisis por RMN- ^1H en un equipo Jeol, Eclipse 300 MHz, a una frecuencia de 300 MHz; se empleó como disolvente CDCl_3 .

9.5.2.2. Reacción de acetilación del extracto MeOH y su fraccionamiento.

El extracto MeOH (2.71 g) se acetiló empleando las mismas condiciones recién descritas y se realizó una extracción líquido-líquido con AcOEt; se obtuvo 1.67 g del producto de reacción (61.62% rendimiento). El producto acetilado se sometió a CC-FN (sílice gel, proporción 1:50) y fue eluida Hex, AcOEt, MeOH y mezclas de estos. Se colectaron 78 fracciones de 150 mL y fueron monitoreadas mediante CCF; se reunieron las fracciones con perfil similar, obteniendo 11 grupos. El disolvente de cada fracción se eliminó a presión reducida. En la fracción 33 se obtuvo el octacetato de sucrosa, el cual se identificó por RMN- ^1H . Por otro lado, la fracción primaria 41-56 (110.6 mg) presentó 2 bandas con $R_f=0.75$ y 0.85 (coloración amarilla) en CCF-FN (sistema de elusión CH_2Cl_2 :acetona, 9.5:0.5, eluida cuatro veces) al revelar con H_2SO_4 al 10%, indicando la presencia de polifenoles; por lo que fue sometida nuevamente a CC-FN eluyendo con CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 :acetona (47:3) y acetona. Este último proceso permitió obtener 63 fracciones agrupadas en tres grupos de acuerdo con su perfil cromatográfico: F13, F14-15, F16-17; las fracciones 1-12 y 18-63 fueron eliminadas. El análisis de RMN- ^1H de la fracción secundaria 13 indicó la presencia de una mezcla compleja de flavonoides y en CCF se confirmó. Para separar esta mezcla se emplearon diferentes sistemas de elusión: CH_2Cl_2 :MeOH (9.5:0.5), CH_2Cl_2 :acetona (4.5:0.5), CH_2Cl_2 :AcOEt (9.5:0.5) y diferentes CCF (poliamida, celulosa y sílica gel impregnada con AgNO_3); sin embargo, ninguno de estos métodos permitió su separación.

Es importante mencionar que se realizó la acetilación de 1 g del extracto CHS, a partir del cual se obtuvieron 815 mg de una mezcla de reacción (81.5% rendimiento). Esta mezcla fue separada por CCF-FN, obteniendo 106 fracciones. Sin embargo, la acetilación del extracto CHS no permitió la separación de los componentes (resultados no reportados), debido a que los rendimientos fueron bajos y se observaron por CCF-FN mezclas complejas de coloraciones amarillas.

9.5.2.2. Reacción de hidrólisis ácida del extracto MeOH y CHS.

Se realizó una primera reacción de hidrólisis del extracto de MeOH (220.9 mg), empleando HCl 2N (50 mL); esta mezcla se sometió a reflujo a una temperatura de entre 80-88°C durante 2 h. Al final, la mezcla se dejó enfriar y se extrajo con CHCl₃ (tres veces); esta fase orgánica (*HMeOH*) se secó con Na₂SO₄ y se concentró en un rotavapor a presión reducida.

La muestra *HMeOH* (14.4 mg, con rendimiento del 7.87%) fue comparada con diversos estándares (Sigma Aldrich): isorientina, orientina, camferol, ácido ursólico, quercetina, escopoletina y β-sitosterol por CCF-FN, empleando el sistema de elución CHCl₃:MeOH (9:1). En la fase acuosa (FA) se buscó la presencia de azúcares (dextrosa, lactosa, fructosa, sacarosa) por CCF-FN empleando C₄H₁₀O:AcOEt:CH₃COOH:H₂O (40:30:20:10).

HMeOH se analizó por HPLC para determinar la presencia de camferol, empleando como referencia camferol puro. Fue utilizado un equipo Waters (Waters, EE. UU.) acoplado a un detector de diodos 996. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la gestión de la información de HPLC se realizaron mediante el software Empower 3 (Waters). La columna utilizada fue Phenomenex Luna® C18 (2) 100 Å, LC (250 x 4.6 mm, 5 μm). La temperatura programada fue de 40°C, con un flujo de 1 mL/min, y el volumen de inyección fue de 10 μL de muestra B (3.4 mg/mL). El sistema de elución fue modo gradiente con la siguiente composición; A: ácido fórmico al 0.1%, fase B: CH₃CN, fase C: MeOH; 0 → 25 min, 50% A, 25% B, 25% C; y de 25 → 32 min, 90% A, 5% B, 5% C. La detección se realizó a 330 nm con una ventana espectral de 200-400 nm. Cabe mencionar que se realizaron dos reacciones de hidrólisis más (255.7 mg y 504.1 mg del extracto MeOH) para obtener suficiente muestra de *HMeOH* para pruebas biológicas.

Posteriormente, se realizó modificaciones de temperatura y tiempo de la reacción de hidrólisis con la finalidad de aumentar el rendimiento. A partir de estas nuevas condiciones fueron identificados otros componentes químicos en la fase orgánica; por cada 1 g de extracto MeOH (1.107 g) se emplearon 25 mL de HCl 2N; la reacción se sometió a una temperatura de 150-160 °C con reflujo durante 4 h y la mezcla de reacción se extrajo con AcOEt, obteniendo la muestra *HMeOH*-2 (fase orgánica) cuyo rendimiento fue de 27.28%. Además, se realizó la hidrólisis ácida del extracto

CHS; para ello, se tomaron 1.14 g y mediante este proceso se obtuvo *HCHS* (714 mg), cuyo rendimiento fue de 62.3% respecto al extracto. La muestra *HMeOH-2* y *HCHS* fue comparada con estándares comerciales (Sigma Aldrich) como: campferol, quercetina, β -sitosterol y ácido *p*-cumárico por CCF-FN, empleando el sistema de elución CHCl_3 :MeOH (9:1). Ambas muestras (*HMeOH-2* y *HCHS*) presentaron un perfil químico similar, por lo que se reunieron y la clave final fue *HMeOH-2*.

9.5.2.3. Separación de azúcares, aminoácidos (aa) y glucosinolatos de los extractos CHS, MeOH y de *p*CHS por CC.

En los extractos CHS, MeOH y en *p*CHS se detectó la presencia de aa por CCF-FN al emplear algunos estándares comerciales de aa, como: lisina, alanina, glicina, glutamina, fenilalanina, la proteína vegana Birdman® y bebidas energéticas como Red Bull® y Boost Energy®, empleando como sistema de elución $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$:acetona: CH_3COOH : H_2O (35:35:10:20) en CCF-FN, y como agente revelador ninhidrina (30 mg ninhidrina, 10 mL $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ y 0.3 mL de CH_3CN).^{92,93} Además, se realizó la búsqueda de azúcares en estas mismas muestras (CHS, MeOH y *p*CHS), empleando estándares de sacarosa, galactosa, dextrosa, glucosa, D-(+)-lactosa, fructosa, D-(+)-xilosa, maltosa y ramnosa, y como sistema de elución $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$:AcOEt: CH_3COOH : H_2O (40:30:20:10). La CCF se reveló con H_2SO_4 al 10%. Para la detección de glucosinolatos se empleó $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$:EtOH: H_2O (4:1:5) y como agente revelador nitrato amoniacal (1 g AgNO_3 + 2.5 mL amonio, la mezcla fue aforada a 1 L de H_2O).^{94,95} Dado que en el extracto MeOH y en *p*CHS se detectaron principalmente compuestos muy polares, como polifenoles, azúcares y aa por CCF, al realizar la acetilación de estas muestras y analizarlas por CCF se detectaron azúcares y polifenoles acetilados. Con el fin de separar estos constituyentes presentes en estas muestras se realizó una CC empacada con Sepabeads.

En primer lugar, se realizó una prueba preliminar para la muestra menos compleja (*p*CHS). Esta se sometió a la CC empacada con Sepabeads SP-207 (SUPELCO; tamaño de partícula; malla 20-60). Esta resina (fue hidratada por 30 min con agitación) se colocó en una columna de vidrio y posteriormente *p*CHS (272.3 mg) se disolvió en agua y se depositó en la CC previamente empacada con SP-207/ H_2O , donde se retuvo por 15 min; posteriormente se eluyó sucesivamente con H_2O , H_2O :MeOH (1:1), MeOH y acetona; mediante este proceso se colectaron siete fracciones de 50 mL. Cada fracción fue concentrada a presión reducida hasta sequedad. En las fracciones F1 y F2 (eluidas con H_2O) se obtuvo un precipitado blanco con punto de descomposición 198-203 °C, soluble en H_2O ; la fracción tres (eluida con H_2O) fue eliminada porque no se detectó ni azúcares ni polifenoles al realizar la CCF; las fracciones F4-5 eluidas con H_2O :MeOH (1:1) mostraron una coloración amarilla

y al realizar la CCF se observó la presencia de una mezcla compleja de polifenoles y por último, en las fracciones F6 (eluida con MeOH) y F7 (eluida con acetona) se observaron compuestos más polares.

Este mismo proceso se realizó dos veces para *p*CHS. En una se empleó 1.89 g y en la segunda 1.59 g. Cabe señalar que la SP-207 fue lavada con suficiente agua destilada antes de sembrar cada muestra. En estas repeticiones, la CC se eluyó únicamente con H₂O, MeOH y acetona, y se colectaron fracciones de 125 mL, las cuales se agruparon de acuerdo con sus similitudes cromatográficas; algunas fracciones fueron eliminadas. Las fracciones de la I columna (1.89 g) y II segunda CC (1.59 g) fueron comparadas por CCF-FN y se reunieron en S1 (H₂O), S2 (H₂O), S3 (cambió a MeOH), S4 (MeOH, acetona). Estas columnas ya no se eluyeron con la mezcla de H₂O:MeOH (1:1) debido a que los polifenoles se obtuvieron en la fracción donde se llevó a cabo el cambio de polaridad entre H₂O y MeOH.

Los azúcares fueron detectados en las fracciones eluidas con H₂O: F1-2 y S1 de *p*CHS, y en las muestras R1 y R2 (del ext. MeOH) y se comparó su R_f con estándares comerciales, empleando CCF-FN con sistema de elusión C₄H₁₀O:AcOEt:CH₃COOH:H₂O (4:3:2:1) y como revelador H₂SO₄ al 10%. La detección de aa se realizó en las mismas fracciones eluidas con H₂O. Para esto fue empleado el sistema de elusión de C₄H₁₀O:acetona:CH₃COOH:H₂O (35:35:10:20) y revelado con ninhidrina, al comparar el R_f con estándares comerciales. Estas últimas fracciones que contienen azúcares y aminoácidos se les puso la clave final Amz. Los polifenoles se detectaron en las fracciones eluidas con MeOH, H₂O:MeOH (1:1) y acetona; estas fueron detectados por CCF-FR con el sistema de elución H₂O:CH₃CN (7:3) y revelado con H₂SO₄ al 10%. Las muestras con perfil similar de polifenoles en CCF fueron reunidas y se puso la clave *r*CHS (F4-5 y S2 obtenidas de *p*CHS y R4 del ext. MeOH).

9.5.2.4. Desarrollo del método analítico por HPLC para la separación de polifenoles presentes en *p*CHS y extracto MeOH.

Un siguiente paso fue desarrollar las con

diciones analíticas por HPLC para la separación de polifenoles presentes en las muestras *p*CHS y extracto MeOH. Se empleó la columna Phenomenex Luna[®] C18 (2) 100 Å, LC (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm) con una temperatura de 40°C, un flujo de 1 mL/min. Se emplearon 2mg de *p*CHS diluido en EtOH: H₂O (la muestra fue sonicada hasta que se disolvió). Se emplearon dos condiciones: Método A: ácido acético al 0.1% (fase A) pH 3; CH₃CN (fase B); MeOH (fase C) en gradiente: 0 → 5 min, 95% A, 5% B, 0% C; 5 → 10 min 80% A, 10% B, 10% C; 10 → 20 min, 60% A, 20% B, 20% C; 20 → 40 min 0% A, 100% B, 0% C; 40 → 41 min 95% A, 5% B, 5% C y la detección fue a 330 nm, con una

ventana espectral de 200-400 nm. El tiempo de corrida fue de 45 min, con un volumen de inyección de 10 µL. Método B: se emplearon los mismos solventes sólo se modificó las condiciones de gradiente: 0 → 2.5 min; 90% A, 10% B, 0% C; 2.5 → 10.5 min 50% A, 50% B, 0% C; 10.5 → 18.0 min 0% A, 100% B, 0% C; 18.0 → 35 min 90% A, 10% B, 0% C.

Ninguna de estos métodos permitió la separación adecuada de los componentes, por lo que cambiamos las condiciones. Método C: sistema de elución en ácido acético al 0,1% (fase A); CH₃CN (fase B); MeOH (fase C) con el siguiente sistema de gradiente A:B:C en proporción 50:25:25, de 0 → 27 min; y A:B:C 90:5:5, 27 → 32 min. El tiempo de corrida fue de 32 min, con un volumen de inyección de 10 µL y la detección de los compuestos se realizó a 280 nm. La columna utilizada fue Phenomenex Luna® C18 (2) 100 Å, LC (250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm) con una temperatura de 40°C, un flujo de 1 mL/min. Bajo estas últimas condiciones se analizó la muestra con clave *r*CHS que contiene polifenoles. Los picos en esta muestra se veían con poca resolución.

El extracto MeOH presentó un perfil similar a *p*CHS en cuanto al contenido de polifenoles, azúcares y aa al ser analizado por CCF-FN y CCF-FR pero con mayor contenido de clorofila. Para eliminar la clorofila se tomaron 17.72 g del extracto MeOH y se lavaron con acetona (cuatro a cinco veces) hasta eliminar la coloración verde. De este proceso se obtuvo un precipitado (insoluble en acetona), con clave IA (12.38 g, rendimiento de 69.82 %) y una parte soluble en acetona denominado SA, con rendimiento de 19.52 % (3.46 mg). En la muestra IA (12.38 g) se detectó la mezcla de polifenoles, azúcares y aa por CCF y fue sometido a la CC/SP-207 eluyendo con H₂O, MeOH y acetona, obteniendo 12 fracciones de 125 mL. Cada una de estas fracciones fueron agrupadas de acuerdo con su perfil en cinco grupos (R1-R5). Las fracciones que presentaron perfiles similares en azúcares y aa fueron reunidas (R1, R2 y R3) cuya clave final fue Amz y aquellas que mostraron similitud a los polifenoles fueron reunidas con la muestra denominada *r*CHS.

9.6. Objetivo 7. Ensayo de toxicidad aguda (DL₅₀).

Se realizó de acuerdo con lo descrito en la Norma 423 de la OECD con algunas modificaciones. El género *Cleoserrata* no tiene reportes que informen sobre su toxicidad por lo que se decidió emplear grupos de 5 ratones macho Balb/C (n=5). Las dosis elegidas para evaluar la toxicidad fueron de 0.5, 1 y 2 g/kg. De acuerdo con la OECD, los animales fueron administrados en primer lugar a la menor dosis por vía i.g, dependiendo de las observaciones y estableciendo la seguridad del animal sobre la supervivencia, fue empleada la siguiente dosis y así sucesivamente en los grupos de animales independientes, estableciendo como dosis límite 2g/kg.

En primer lugar se evaluó el extracto CHS a dosis de 0.5, 1 y 2 g/kg y el control negativo (vehículo, Tween 80:H₂O, 1:9). Posteriormente, los extractos de diferente polaridad (MeOH, CH₂Cl₂ y Hex) fueron evaluados como sigue: Grupo I, control; los grupos II-IV, la muestra problema. El extracto MeOH se evaluó a las dosis de 0.5, 1 y 2 g/kg y los extractos CH₂Cl₂ y Hex a dosis de 2 g/kg; todos administrados por vía i.g. Los animales fueron observados durante las primeras 6 h y después diariamente por 14 días. Esto para detectar alteraciones potenciales en ojos, mucosas, piel, patrones de comportamiento, actividad motora, aparición de diarrea, letargo, sueño. Los animales se pesaron antes de iniciar el estudio y cada tercer día hasta finalizar el experimento. El día 14 los animales se sometieron a eutanasia por dislocación cervical. De acuerdo con la norma 423 de la OECD.

9.7. Objetivo 8. Inducción de Inflamación crónica con Adyubante de Freund Completo (AFC) 29 días.

El ensayo se realizó de acuerdo con lo descrito por Juárez-Vázquez *et al.* (2020)⁵² empleando ratones macho Balb/C (22 ±32 g). Se formaron cinco grupos de 10 animales c/u. La inflamación fue inducida mediante la inoculación subplantar de 25 µL de AFC sin emulsificar en la base de la pata izquierda los días 0 y 14 de un estudio de 28 días. El extracto se disolvió en Tween 80:H₂O (1:9) y se evaluó a dos dosis, que fueron administradas diariamente por vía i.g. a partir del día 7 al día 27 de estudio.

Grupo I: control, recibió el vehículo (Tween 80:H₂O, 1:9)

Grupo II: AFC (inoculación subplantar de 25 µL de AFC, los días 0 y 14)

Grupo III: FBZ 100 mg/kg/día solubilizado en tween 80:H₂O 1:9 más AFC (día 0 y 14)

Grupo IV: Extracto CHS 150 mg/kg/día más AFC (día 0 y 14);

Grupo V: Extracto CHS 300 mg/kg/día más AFC (día 0 y 14). Se realizó un registro del peso y medición del desarrollo del edema subplantar los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27 (**Et**) con un micrómetro digital (Mitutoyo) y el valor del día cero fue determinado como el día basal (**Eo**). La inhibición del porcentaje del edema en cada grupo se calculó empleando la fórmula descrita Gutiérrez-Rebolledo *et al.* (2018)⁵⁰

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{(\text{Et} - \text{Eo})\text{AFC} - (\text{Et} - \text{Eo})\text{tratados}}{(\text{Et} - \text{Eo})\text{AFC}} \right] * 100$$

El día 28 los animales se dejaron en ayuno y cuatro ratones de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical para la obtención de hígado, riñón, bazo, corazón, intestino delgado y estómago.

Los ganglios poplíteos se extrajeron, se pesaron y se obtuvo la diferencia de peso mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{(Gt - Go)AFC - (Gt - Go)\text{tratados}}{(Gt - Go)AFC} \right] * 100$$

Donde: Gt= ganglios con tratamiento, Go=ganglios sin tratamiento

Por otro lado, de un grupo de seis animales se obtuvo sangre por punción retro-orbital. Cada muestra se colocó en tubos con heparina para la obtención de suero (centrifugación 3500 rpm x 15 min TA).

9.8. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico fue empleado el programa SigmaPlot 12.5. El análisis de los datos para el modelo de inflamación subplantar inducido con carragenina y el modelo de edema auricular inducido con TPA se realizó mediante un ANOVA seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$), comparando con el control de carragenina o TPA. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguido de una prueba post hoc Student–Newman–Keuls (SNK) ($p < 0.05$). Los datos del modelo crónico de inflamación de AFC, ganancia de peso corporal, el peso y porcentaje de inhibición del edema en ganglios poplíteos, peso absoluto (g) y peso relativo de órganos (%), se analizaron por un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de posthoc SNK ($p < 0.05$). Para el análisis de los datos de ganancia de peso corporal en el ensayo de toxicidad aguda se realizó también un ANOVA de dos vías, seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$). Los datos en todos los experimentos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM).

9. RESULTADOS (OBJETIVOS).

10.1. Objetivo 1. Rendimiento de los extractos orgánicos (CHS, Hex, CH₂Cl₂ y MeOH) y de *p*CHS.

El extracto CHS (198.93 g) se obtuvo con buen rendimiento (31.6 %) respecto al material vegetal seco. En la Tabla 3 se describen el peso y el rendimiento de los demás extractos preparados vía maceración sin y con agitación. Los rendimientos obtenidos por ambos procesos fueron similares. Los extractos fueron reunidos de acuerdo con su similitud cromatográfica. Los extractos Hex, CH₂Cl₂, MeOH fueron comparadas con el extracto CHS (original) por análisis por CCF-FN y CCF-FR, observando perfiles similares para esteroides, ésteres de ácidos grasos, terpenos y polifenoles (Fig.3 A, B, C).

Tabla 3. Rendimiento de extractos orgánicos preparados a partir de *C. serrata*.

Extracto (hojas ^a)	Peso material vegetal (g)	Peso (g) extracto (% Rendimiento) *	
		Maceración sin agitación	Maceración con agitación
CHS	629.5 g	198.93 (31.6 %)	--
(partes aéreas)		(429 g de material vegetal)	(578.44 g de material vegetal)
Hex		6.59 g (1.53 %)	7.44 g (1.28 %)
CH ₂ Cl ₂		2.78 g (0.6 %)	5.23 g (0.90 %)
MeOH		25.87 (6 %)	15.44 g (2.66 %)
<i>p</i> CHS		-	4.33 (0.63 %)

* Rendimiento respecto a la planta seca; ^a550 g material vegetal seco

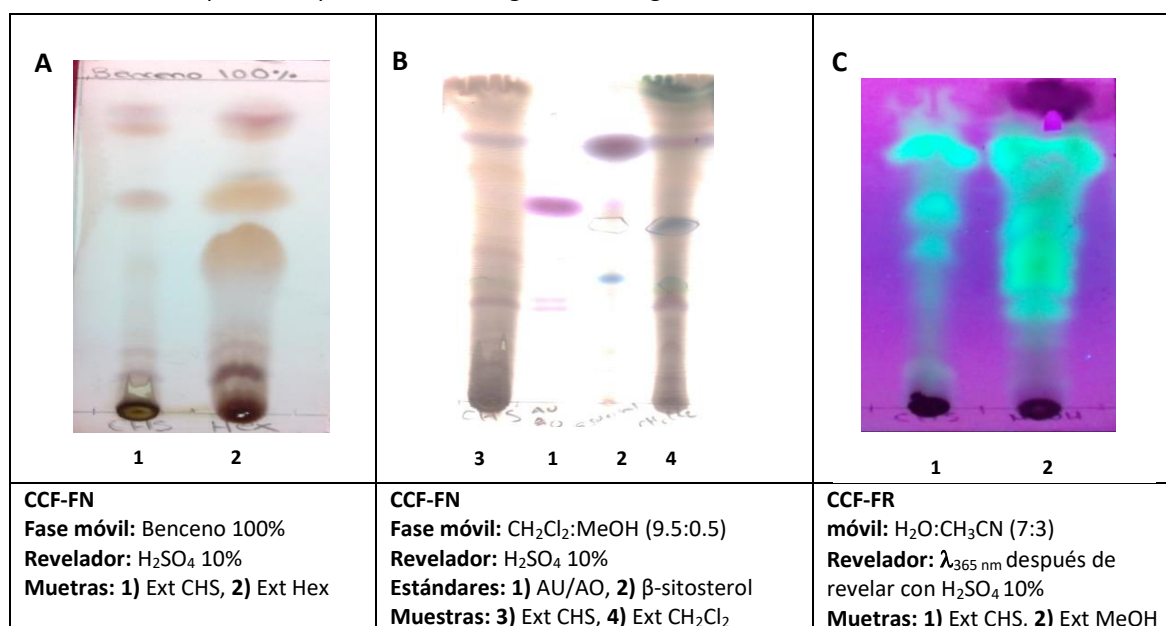


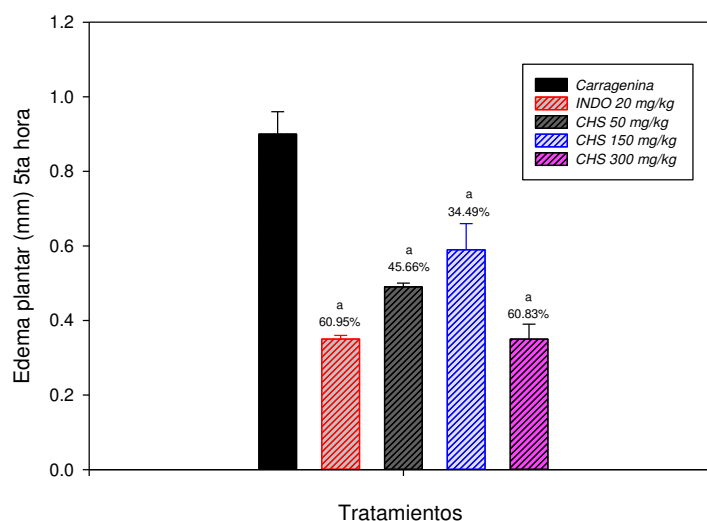
Figura 3. CCF-FN y CCF-FR comparativa de los extractos orgánicos (*C. serrata*) con el extracto original CHS. Se demuestra que en el extracto hex, CH₂Cl₂ y MeOH tienen un perfil cromatográfico similar al extracto CHS.

10.2. Objetivos 2 y 5: Efecto antiinflamatorio de los extractos (CHS, Hex, CH₂Cl₂ y MeOH), fracciones primarias CHS y las muestras HMeOH, Amz, rCHS).

10.2.1. Modelo carragenina

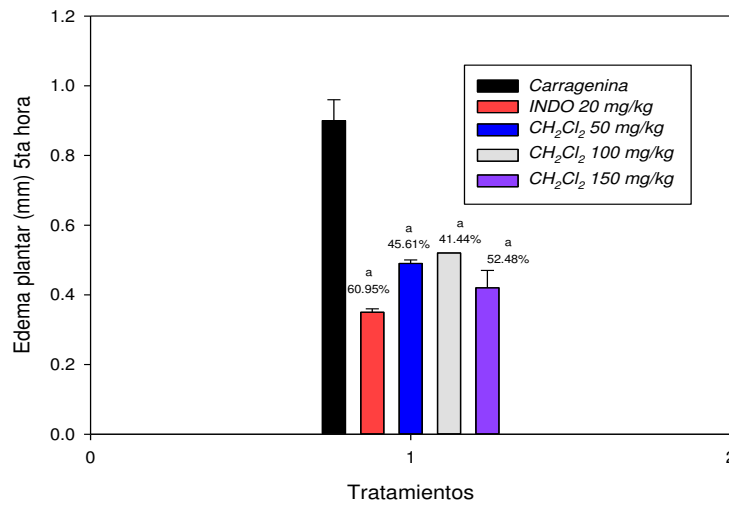
Se evaluó el efecto antiinflamatorio de los extractos y las fracciones con potencial efecto antiinflamatorio. De acuerdo con los diagramas (Fig. 1 y Fig. 2). El efecto antiinflamatorio en el modelo de carragenina a la 5 h se describe a continuación. El extracto CHS inhibió un 60.83% a 300 mg/kg (Gráfica 1). Los extractos CH₂Cl₂ y MeOH mostraron mejor efecto, ya que a las dosis probadas mostraron inhibición > 40% (Gráfica 2 y 3). El extracto Hex y pCHS mostraron una DE₅₀=131.46 (R²=0.93) y 64.89 mg/kg (R²=0.99), respectivamente (Gráfica 3).

Gráfica 1. Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de *C. serrata* en edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.



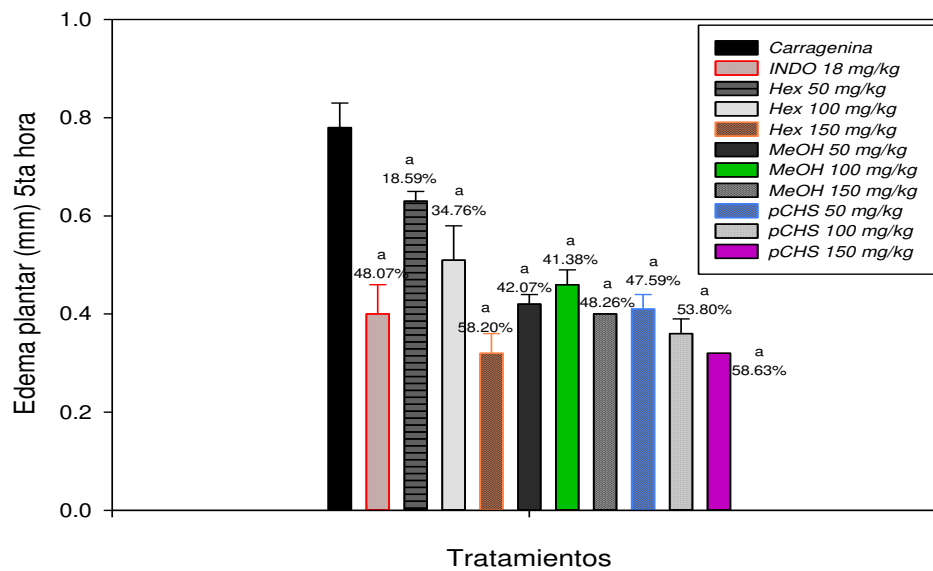
Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de una vía del edema plantar (mm), seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) diferencia^a vs carragenina; n=5.

Gráfica 2. Efecto antiinflamatorio del extracto CH_2Cl_2 de *C. serrata* en edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de una vía del edema plantar (mm), seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) diferencia^a vs carragenina; n=5.

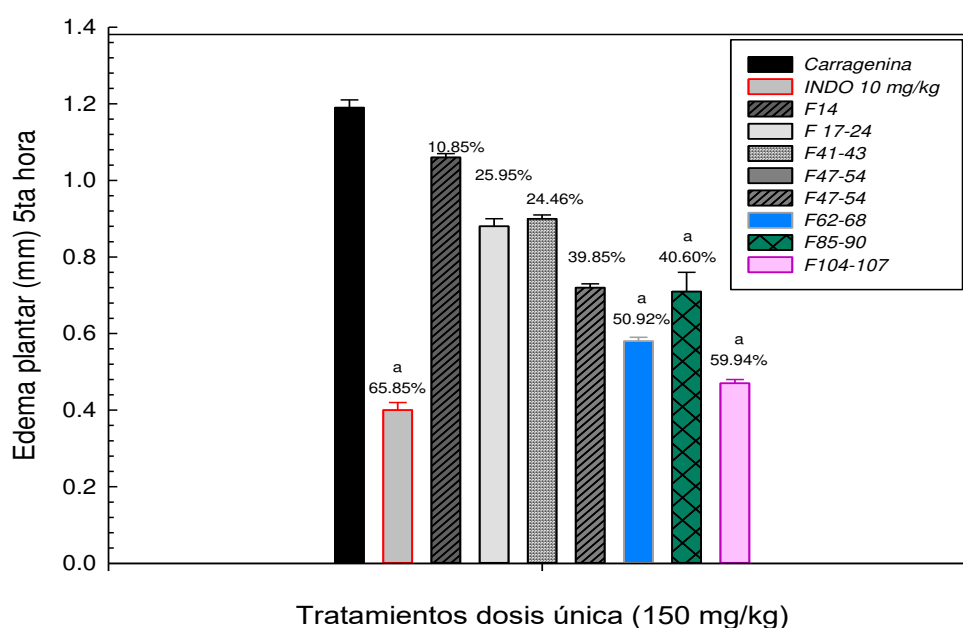
Gráfica 3. Efecto antiinflamatorio del extracto Hex, MeOH y el precipitado pCHS de *C. serrata* en edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de una vía del edema plantar (mm), seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) diferencia^a vs carragenina; n=5.

Por otro lado, las fracciones obtenidas del extracto CHS fueron evaluadas a la dosis de 150 mg/kg. Casi todas las fracciones (17-24, 47-54, 62-68, 85-90, 102-103, 104-107) resultaron activas, mostrando una inhibición $\geq 23\%$ (Gráfica 4). Los valores de la fracción 15-16 y 102-103, no se muestran en la gráfica, porque fueron evaluados en un ensayo independiente los valores obtenidos del edema plantar (mm) y % de inhibición fueron de 0.93 (15.75 %) y 0.84 (23.99), respectivamente y el control INDO con 0.51 (53.82%). Por lo tanto, las fracciones que mostraron menor efecto fueron: 14 (10.85 %), 41-43 (24.46%) y 15-16 (15.75%).

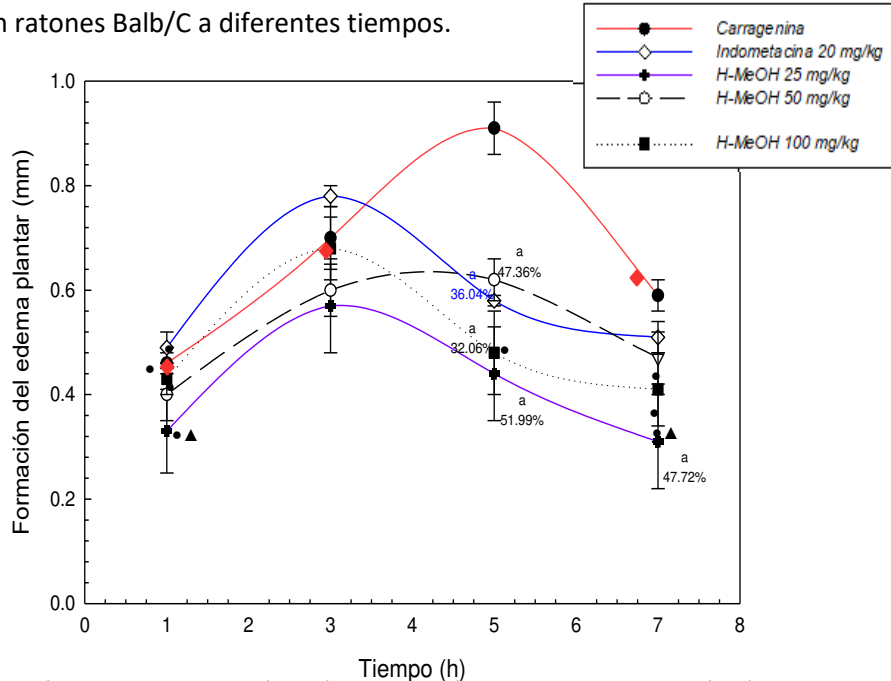
Gráfica 4. Efecto antiinflamatorio de las fracciones primarias del extracto CHS sobre el edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$), diferencia ^avs carragenina; n=5.

Con la finalidad de conocer los componentes del extracto MeOH se realizó un proceso de hidrolisis en la que se obtuvo la muestra HMeOH (mezcla de agliconas y escopoletina) (más adelante se describirá el proceso de obtención). Para conocer su efecto biológico, la muestra fue evaluada en el modelo de carragenina. El HMeOH a la dosis de 25 mg/kg y a la 5 hrs mostró un activad del 51.99% de inhibición; cabe señalar que mostró el efecto desde la primera hora (28.29%), 3 h (17.75%) y 7 h (47.72%), a diferencia de la INDO, que mostró el mayor efecto a las 5 hrs (36.04 %). Además, las dosis de 50 y 100 mg/kg mostraron leve efecto a las 5 hrs con 32.06 y 47.35%, respectivamente, con mayor efecto que la INDO, siendo del 36.04% (Gráfica 5).

Gráfica 5. Efecto antiinflamatorio de *HMeOH* en el modelo de edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a diferentes tiempos.

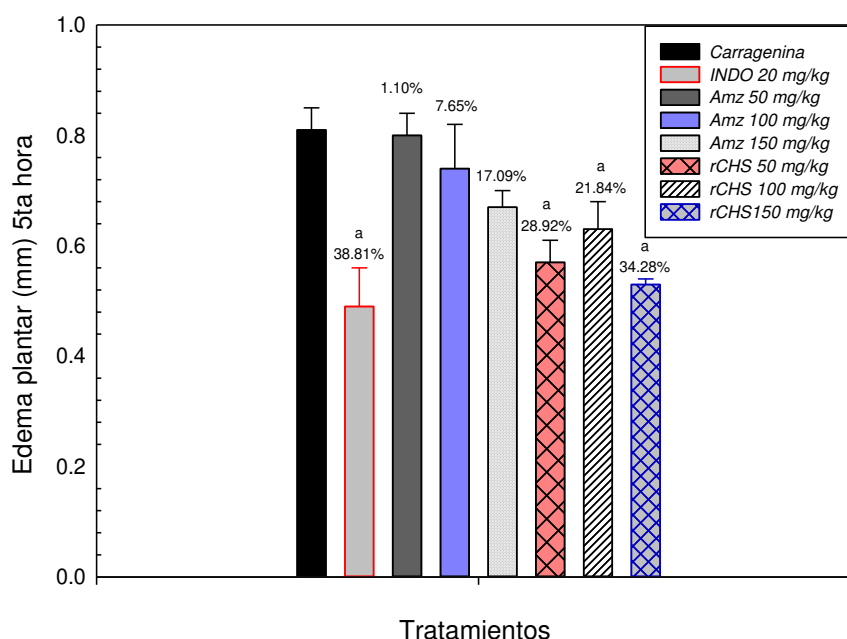


Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de dos vías (tratamientos y horas de cada tratamiento) seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$) diferencia ^avs carragenina; [•]vs 3 h; [♦]vs 5 h; [▲]vs 24 h; $n=5$.

Por otro lado, fueron evaluadas las muestras las muestras: *rCHS* (concentrado de polifenoles) y *Amz* (concentrado de aminoácidos), los cuales fueron obtenida del proceso de separación de polifenoles y azúcares del extracto MeOH y el precipitado *pCHS* (más adelante se describirá el proceso de obtención).

rCHS mostró efecto antiinflamatorio similar en todas las dosis probadas (50, 100, 150 mg/kg), con un 28.92, 21.84 y 34.28% de inhibición, respectivamente, y el fármaco de referencia INDO mostró un 38.81 % de inhibición (Gráfica 6). Por el contrario, la muestra *Amz* (mezcla de aa (aminoácidos) y azúcares) resultó poco activa (<17 % de inhibición) a las dosis evaluadas (50, 100, 150 mg/kg) (Gráfica 6).

Gráfica 6. Efecto antiinflamatorio de *r*CHS y *Amz* en el modelo de edema plantar inducido con carragenina en ratones Balb/C a las 5 hrs.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$), diferencia ^avs carragenina; $n=5$.

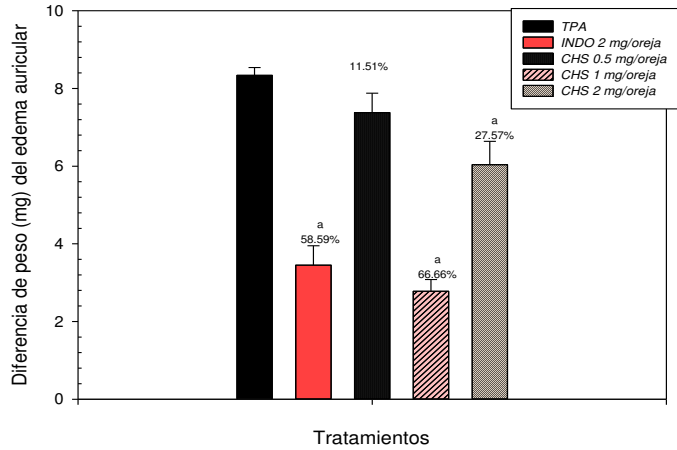
10.2.2. Modelo TPA.

El extracto CHS a 1 mg/oreja mostró 66.66% de inhibición del edema auricular; el efecto antiinflamatorio fue mejor al del control INDO (2 mg/oreja) con 58.59 % (Gráfica 7). Además, el extracto CH_2Cl_2 y *p*CHS mostraron efecto dosis dependiente con $\text{DE}_{50} = 0.79$ y 0.47 mg/oreja (Gráfica 8 y 9), respectivamente, siendo estas muestras más activas que el fármaco de referencia (INDO, $\text{DE}_{50}=1.82$ mg/oreja). El extracto Hex mostró moderado efecto antiinflamatorio a 0.5 y 1 mg/oreja, siendo de 45.1 y 41.07% de inhibición. Finalmente, el extracto MeOH, a las dosis probadas (0.5, 1 y 2 mg/oreja,) mostró menor efecto antiinflamatorio tópico, con 38.64, 53.77 y 46.75 % de inhibición. Cabe mencionar, que los extractos Hex y MeOH no presentaron efecto dosis dependientes (Gráfica 8).

Al evaluar las fracciones primarias del extracto de CHS, estas fueron más activas que el extracto original (27.57% a 2 mg/oreja). En este caso, las fracciones primarias 14, 15-16, 41-43, 47-54, 62-68, 85-90, 102-103 probadas a 2 mg/oreja mostraron más del 47% de inhibición y las fracciones F17-24

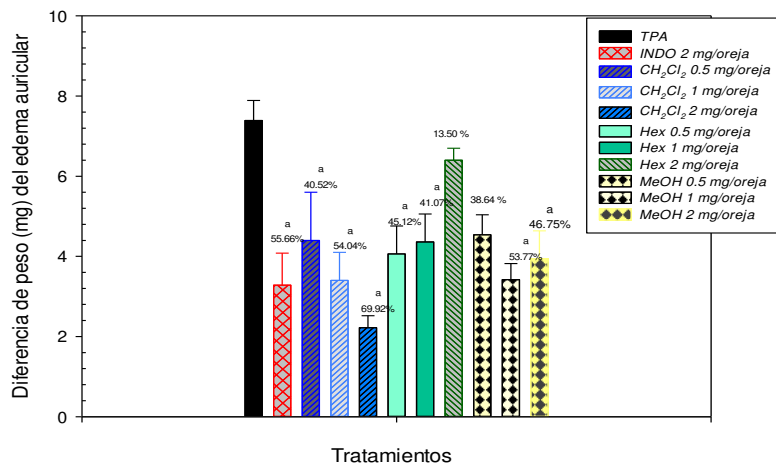
y 104-107 fueron menos activas, con 15.28 y 24.56 % de inhibición, respectivamente (Gráfica 10 y 11).

Gráfica 7. Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de *C. serrata* sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.



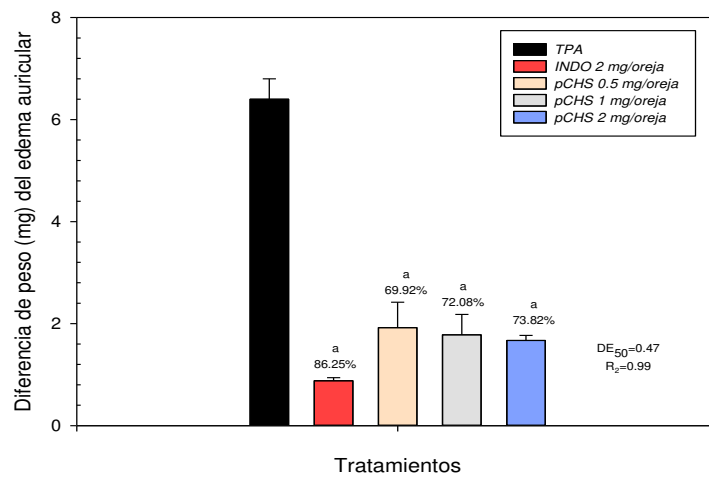
Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) ^avs TPA; n=5.

Gráfica 8. Efecto antiinflamatorio de los extractos de *C. serrata* sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb.



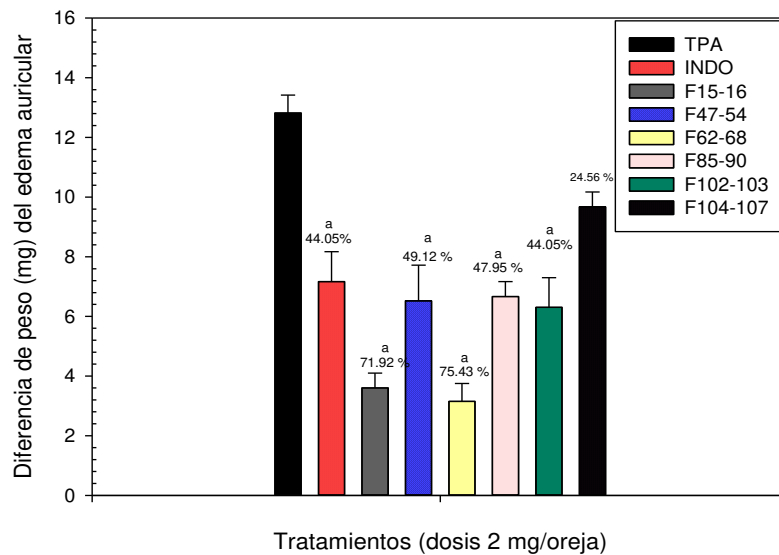
Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) ^avs TPA; n=5.

Gráfica 9. Efecto antiinflamatorio del precipitado pCHS de *C. serrata* sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.



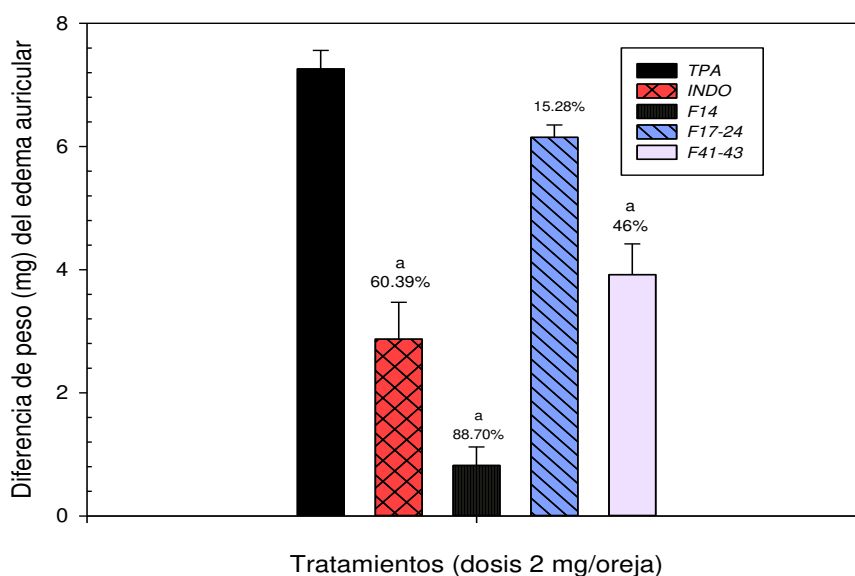
Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) ^avs TPA; n=5.

Gráfica 10. Efecto antiinflamatorio de las fracciones de CHS de *C. serrata* sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) ^avs TPA; n=5.

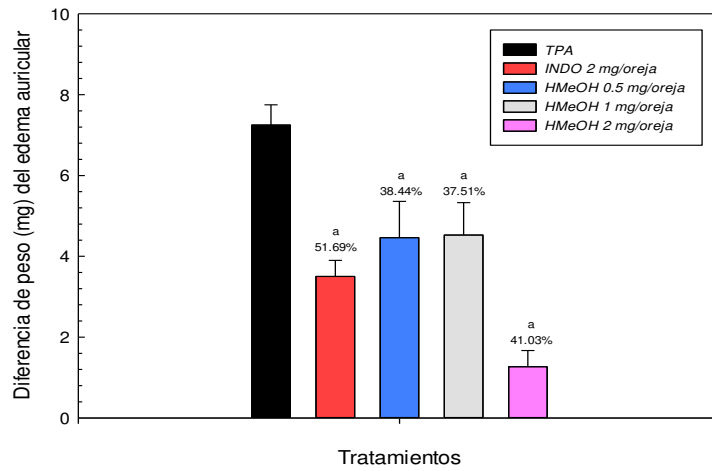
Gráfica 11. Efecto antiinflamatorio de las fracciones de CHS de *C. serrata* sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) ^avs TPA; n=5.

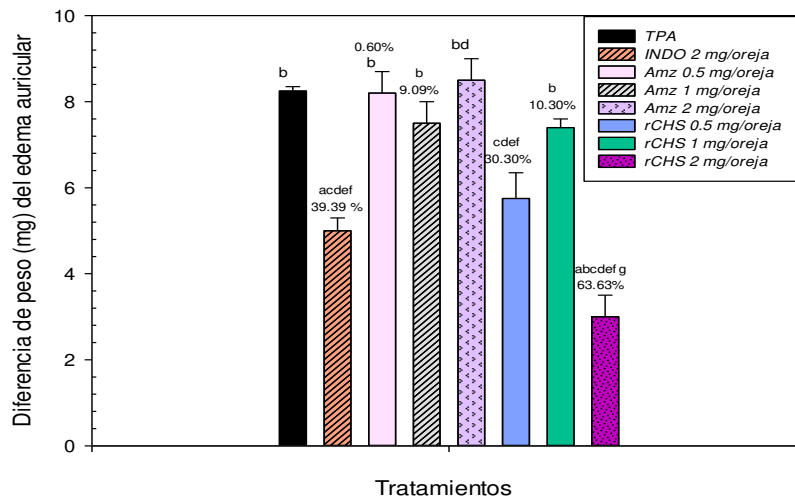
Por otro lado, el HMeOH resultó más activo, ya que inhibió entre un 37.51 al 41.03% a la dosis de 0.5 a 2 mg/oreja, sin presentar efecto dosis dependiente (Gráfica 12). La muestra rCHS (concentrado de polifenoles) a una dosis de 2 mg/oreja mostró mejor efecto en este modelo, con un 63.63 % de inhibición del edema, siendo mayor el mayor efecto que la INDO (2 mg/oreja, 39.39 %); a 0.5 mg obtuvo un efecto similar al fármaco antiinflamatorio (30.30 %), pero el efecto no fue dosis dependiente y la muestra Amz resultó con escaso efecto antiinflamatorio a 1 mg/oreja (< 9.09 % de inhibición) (Gráfica 13).

Gráfica 12. Efecto antiinflamatorio de HMeOH en el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett ($p < 0.05$) ^avs TPA; n=5.

Gráfica 13. Efecto antiinflamatorio de Amz y rCHS de *C. serrata* en el edema auricular inducido con TPA en ratones macho Balb/C.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$) ^avs comparado con el TPA; ^bvs INDO, ^cvs Amz 0.5, ^dvs Amz2, ^evs Amz1, ^fvs rCHS 1, ^gvs rCHS 0.5; n=5.

10.3 Objetivo 3. Efecto antioxidante por el método colorimétrico DPPH de los extractos Hex, CH₂Cl₂, MeOH y muestras *p*CHS y *H*MeOH.

El efecto antioxidante *in vitro*, determinado por el método colorimétrico DPPH, indicó que el extracto CHS muestra escaso efecto antioxidante (dependiente de la concentración). A la máxima concentración evaluada (5000 µg/mL), mostró un 26.9% de inhibición por lo que su Cl_{50} fue > 5 mg/mL; en cambio, el control positivo quercetina mostró una Cl_{50} = 92.135 µg/mL (Tabla 13). El extracto Hex y CH₂Cl₂ no mostraron efecto antioxidante, con una Cl_{50} > 5 mg/mL. El extracto MeOH de las partes aéreas de *C. serrata* mostró pobre efecto antioxidante con una Cl_{50} = 5842.63 µg/mL y *p*CHS mostró escaso efecto antioxidante, con Cl_{50} = 3736.53 µg/mL (Tabla 4). El producto de hidrólisis *H*MeOH tuvo mayor efecto antioxidante que los extractos y la muestra *p*CHS, con una Cl_{50} = 2338.05 µg/mL. Sin embargo, este efecto fue pobre al compararla con el estándar de quercetina Cl_{50} = 68.77 µg/mL.

Tabla 4. Efecto antioxidante de los extractos, *p*CHS y *H*MeOH de *C. serrata*

Muestra	Concentración [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	% inhibición del Radical DPPH	Cl_{50} [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
Quercetina	150	86.633 \pm 0.25	92.13
	125	71.402 \pm 0.002	
	100	56.963 \pm 0.005	
	75	39.730 \pm 0.062	
	50	21.286 \pm 0.011	
	25	5.776 \pm 0.020	
CHS	5000	26.93 \pm 0.004	> 5000
	4000	23.60 \pm 0.004	
	3000	18.30 \pm 0.005	
	2000	15.40 \pm 0.003	
	1000	10.25 \pm 0.008	
	500	8.73 \pm 0.010	
Quercetina	200	89.98 \pm 0.00	73.02
	150	78.12 \pm 0.01	
	125	71.78 \pm 0.00	
	100	54.41 \pm 0.00	
Extracto MeOH	5000	42.50 \pm 0.00	5842.63
	4000	32.78 \pm 0.00	
	3000	23.05 \pm 0.00	
	2000	15.7 \pm 0.00	
	1000	5.039 \pm 0.00	
<i>p</i> CHS	5000	49.37 \pm 0.02	3736.53
	4000	52.63 \pm 0.00	
	3000	39.89 \pm 0.00	
	2000	26.67 \pm 0.00	
	1000	12.92 \pm 0.00	
	500	2.253 \pm 0.00	
Quercetina	125	90.70 \pm 0.00	68.77
	100	77.21 \pm 0.00	
	75	65.04 \pm 0.00	
	50	27.09 \pm 0.01	
	25	14.98 \pm 0.01	
<i>H</i> MeOH	2500	50.23 \pm 0.01	2338.05
	2000	44.37 \pm 0.00	
	1500	34.55 \pm 0.00	
	1000	23.59 \pm 0.00	
	500	7.23 \pm 0.00	

Datos presentados como el porcentaje de inhibición del radical DPPH \pm EE de dos determinaciones independientes por duplicado (n=2), Solución stock de DPPH/MeOH a 9×10^{-5} M (35.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El extracto Hex y CH_2Cl_2 presentaron una $\text{Cl}_{50} > 5$ mg/mL. El *H*MeOH (hidrolizado obtenido del extracto MeOH), más adelante se describirá como fue obtenida esta muestra.

10.4. Objetivos 4, 5 y 6. Fraccionamiento e Identificación los constituyentes químicos mayoritarios de las fracciones primarias de CHS y extractos (CHS, Hex, CH₂Cl₂, y MeOH (pCHS)) con efecto biológico.

En los resultados del análisis por CG-EM del extracto Hex y CH₂Cl₂, el cual indica la presencia de γ -sitostetrol, palmitato de etilo y vitamina E con tiempo de retención (Rt)= 35.22, 22.42, 33.61/33.64 min, como componentes mayoritarios y los constituyentes minoritarios se describen en la misma Tabla 5. Estos compuestos se identificaron de acuerdo con su patrón de fragmentación y por comparación con lo descrito en la librería NIST.

Tabla 5. Compuestos detectados en los extractos Hex y CH₂Cl₂ mediante análisis de CG-EM.

MUESTRA	TR	NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA MOLECULAR	PESO	% ÁREA
Ext. Hex	22.42	Etil éster del ácido hexadecanoico (Palmitato de etilo)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	7.85
	24.39	Éster etílico del ácido 9,12-octadecadienoico (etil éster del ácido linoleico)	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	20.52
	32.97	γ -Tocoferol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	416	1.78
	33.61	Vitamina E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	6.30
	34.45	Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	400	3.81
	35.22	γ -Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	20.62
Ext. CH ₂ Cl ₂	22.25	Ácido n-hexadecanoico (Ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	9.96
	22.42	Etil éster del ácido hexadecanoico (Palmitato de etilo)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	3.05
	33.64	Vitamina E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	6.33
	34.68	Estigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	6.15
	35.22	γ -Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	30.19

10.4.1. Fraccionamiento primario del extracto CHS y análisis por CG-EM de algunas fracciones

El fraccionamiento químico del extracto CHS permitió obtener 107 fracciones, las cuales fueron reunidas en 21 grupos de acuerdo con su perfil cromatográfico (Tabla 6). Las fracciones F14, F15-16, F29-31, F47-54 y F62-68 fueron analizadas por CG-EM. La fracción primaria F14 (de baja polaridad) contiene principalmente ésteres de ácido graso y por análisis de CG-EM se detectó fitol (3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno-1-ol) como componente mayoritario, entre otros compuestos, y en la fracción 15-16 se detectó principalmente γ -sitosterol (Tabla 7). En las fracciones F25-38 se detectó β -sitosterol (Rf= 0.44) como compuesto mayoritario, cuyo Rf fue idéntico a la referencia comercial por CCF-FN (Fig. 4B).

El análisis por CG-EM de la fracción primaria F47-54 indicó la presencia fitol y ácido palmítico (Tabla 7). En las fracciones F55-59 a la F72-83 (polaridad intermedia) se observaron coloraciones

moradas características de esteroides por CCF-FN (Fig. 4C) y el análisis por CG-EM de la fracción 62-68 indicó la presencia de γ -sitosterol (clonasterol) como compuesto mayoritario (Tabla 7).

El análisis por CCF-FR de las fracciones polares F85-90 (1.87 g) y F91-F108 (1.41 g), eluidas con H₂O:CH₃CN 7:3, mostró la presencia de una mezcla compleja de polifenoles (Rf=0.75-0.51) con fluorescencia en UV_{365 nm} (Fig. 4D).

Tabla 6. Fraccionamiento primario del extracto CHS por CC-FN.

Sistema de Elución	Fracciones	Peso (mg)	Rendimiento%	Observaciones
Hex	7-13	3.6	0.036	
Hex:AcOEt (97:3)	14	171.9	1.719	Ésteres de ácido graso, fitol, isopropil linoleato
	15-16	116.3	1.163	
	17-24	249.8	3.12	
	25-26	15.5	0.155	
	27-28	19.2	0.192	
	29-31	47.7	0.477	
	32-40	205.4	2.59	
Hex:AcOEt (9:1)	41-43	329.7	3.297	F41-43-F72-83 CCF coloraciones moradas (terpenos)
	44-46	168.1	1.681	
Hex:AcOEt (8:2)	47-54	492.8	4.928	
Hex:AcOEt (7:3)	55-61	315.2		
Hex:AcOEt (1:1)	62-68	389.3	3.893	
Hex:AcOEt (75:25), AcOEt, AcOEt:EtOH (75:25)	69-84	172.1	1.721	
AcOEt:EtOH (75:25)	85-90	1878.1	18.781	F85-95, CCF coloraciones amarillas (polifenoles)
AcOEt:EtOH (75:25), AcOEt:EtOH (1:1)	91-101	670.2	6.702	
AcOEt:EtOH (1:1)	102-103	133.2	1.332	F102-103, F104-107 CCF coloraciones amarillas (polifenoles)
EtOH	104-107	223.1	2.231	
	Total:	8005.5		

Tabla 7. Compuestos detectados en las fracciones primarias de CHS mediante análisis de CG-EM.

Fracción primaria	TR	NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA MOLECULAR	PESO	% ÁREA
14	22.38	Étil éster del ácido hexadecanoico (Palmitato de etilo)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	5.83
	23.97	Éster metílico del ácido octadecanoico (Estearato de metilo)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	1.95
	37.1	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (fitol)	-	278	31.14
15-16	20.46	2-pentadecanona, 6,10,14-trimetil	-	250	2.79
	20.95	Fitol	-	278	1.77
29-31	35.28	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	45.65
	35.96	Estigmasta-3,5-dien-7-ona	C ₂₉ H ₄₆ O	410	5.09
	36.31	Estigmasta-4-en-3-ona	C ₂₉ H ₄₈ O	412	3.08
47-54	20.44	Derivado de acetato de fitol	-	123	51.20
	22.16	Ácido n-hexadecanoico (Ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	23.76
62-68	24.5	Ácido octadecanoico (Ácido esteárico)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	2.90
	33.58	(+)-ç-Tocoferol, O-metil	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	3.36
	35.16	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	13.87
	37.99	Estigmastano-3,6-diona, (5à)-	-	428	4.79

TR: Tiempo de Retención

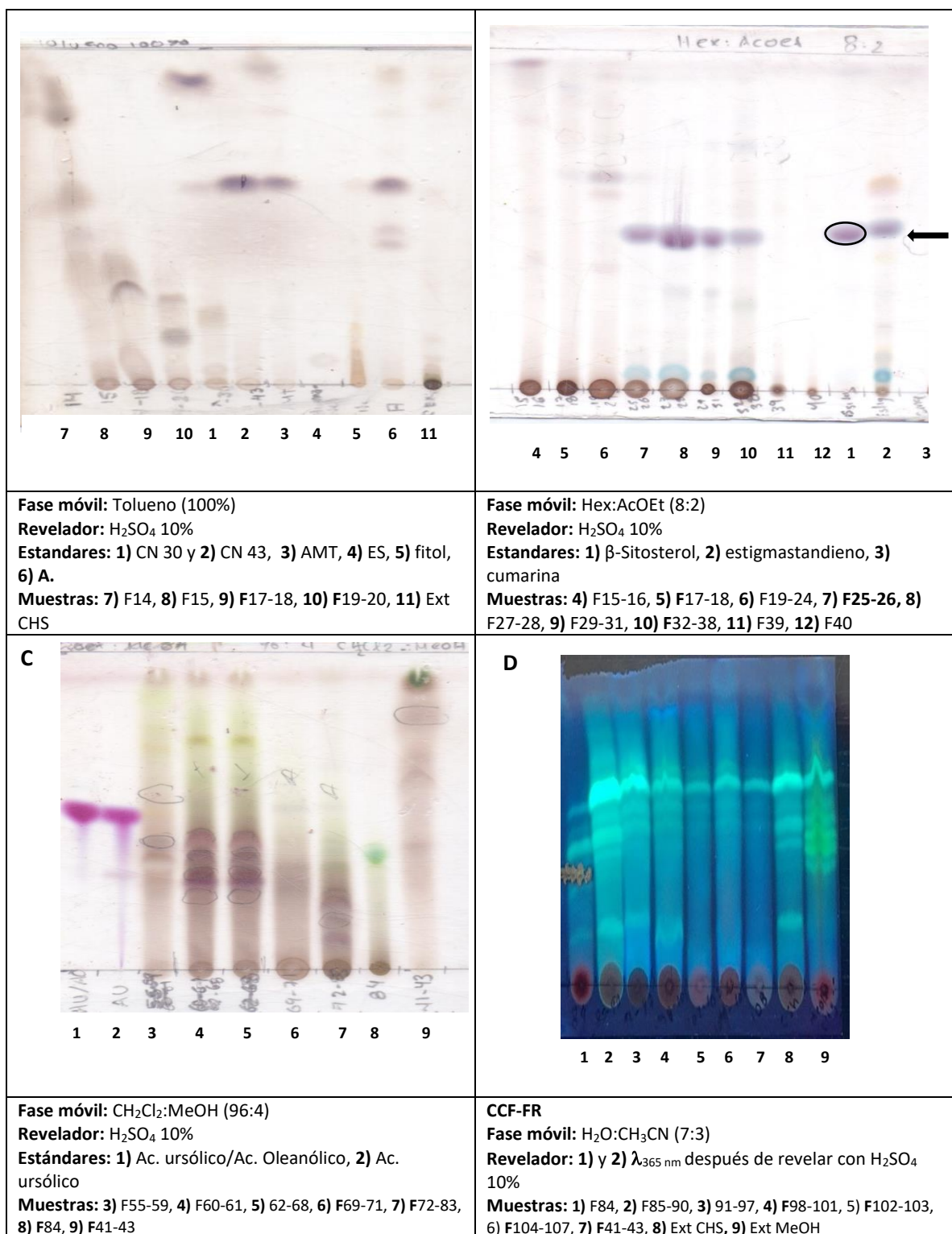


Figura 4. Perfil cromatográfico del fraccionamiento primario del extracto CHS (I CCF). A) Las fracciones F25-26, F27-28, F29-31, F32-38 muestran la presencia de ácidos grasos. B) Las fracciones F25-38 muestran presencia de esteroides, principalmente β-sitosterol. C) Las fracciones F41-43 a la F72-83 muestran presencia de terpenos. D). Las fracciones F85 a la F108 muestran la presencia de polifenoles en CCF-FR.

Por otro lado, los extractos de diferente polaridad fueron comparados por CCF-FN con las fracciones del extracto CHS. El extracto Hex tuvo una composición química similar a las fracciones menos polares (F14, F17-24) del extracto CHS (Fig.5A). El perfil del extracto CH₂Cl₂ fue similar a las fracciones de polaridad intermedia (62-68, 72-83) del extracto CHS, cuyo compuesto mayoritario fue el β -sitosterol con Rf=0.90 (Fig.4B) y el extracto MeOH mostró similitud con las fracciones más polares de CHS (F85-90), y con el precipitado *p*CHS (Fig.5C). Por otro lado, el extracto CHS mostró un triterpeno con un Rf=0.66 similar al acetato de lupeol (AL) (Fig.5D). Los extractos CHS y MeOH mostraron ácido clorogénico (Rf = 0.27), cuyo Rf fue similar al estándar comercial (Fig.4E) y β -sitosterol, con un Rf=0.39 (Fig.5F). En ambos extractos (CHS y MeOH), al emplear el sistema de elución C₄H₁₀O:EtOH:H₂O (4:1:5) en CCF-FN y como agente revelador nitrato amoniacal, se observó una coloración amarillo-café, lo que indicó la presencia de glucosinolatos.

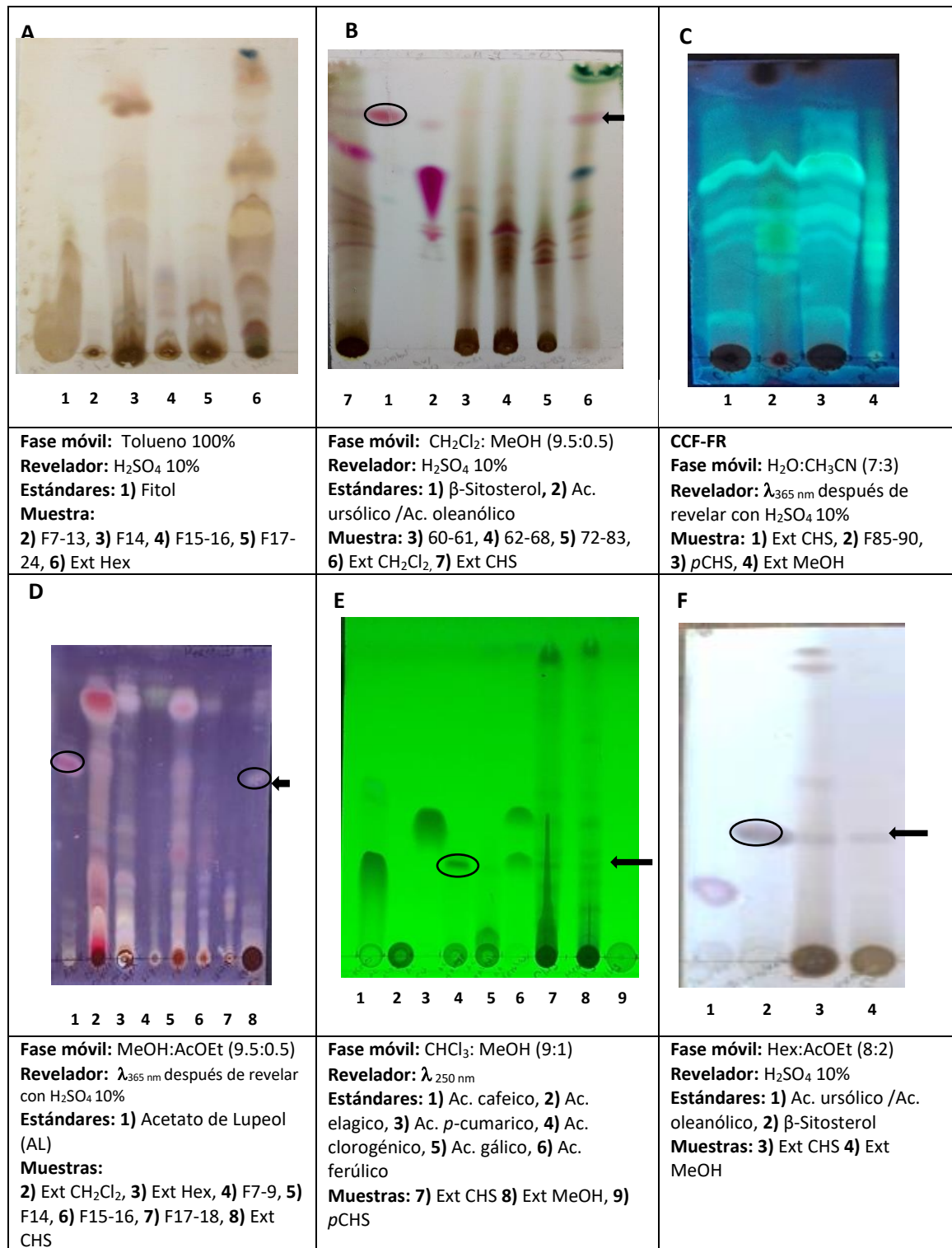


Figura 5. Cromatografía en capa fina de fase normal y fase reversa comparativa de los extractos Hex, CH₂Cl₂ y de MeOH de *C. serrata* con las fracciones primarias del extracto original CHS y estándares de referencia.

Dado el bajo rendimiento de las fracciones primarias, se realizó un segundo fraccionamiento por CC-FN a partir de 10 g de extracto CHS. De este proceso se obtuvieron 135 fracciones y se reunieron de acuerdo con sus perfiles cromatográficos en 36 grupos (Tabla 8). La comparación por CCF-FN de estas fracciones con las fracciones de la primera columna se muestra en la Fig 6A y B. Como se puede observar existe gran similitud entre las fracciones de baja polaridad por lo que estas fueron reunidas, y el compuesto mayoritario fue el β -sitosterol para las fracciones 29 a la 35 Fig 6A. Cabe señalar que entre las fracciones de polaridad intermedia se observó escasa similitud (Fig. 6B).

A partir de las fracciones polares F117 a 129 eluidas con AcOEt:EtOH (75:25, 1:1) y EtOH se obtuvo un precipitado verde-café (1.45 g) que al analizarlo por CCF-FR, se observó la presencia de polifenoles, con un Rf similar al de la fracción F85-90 (primer fraccionamiento, Fig.5C) usando como agente revelador H₂SO₄ 10% o NP/PEG. Además, su perfil cromatográfico fue parecido al precipitado del extracto MeOH, por lo que esta muestra se denominó *p*CHS. En CCF-FR se observaron cinco bandas y al menos dos bandas mayoritarias, la primera presentó un Rf= 0.46 y la segunda un Rf= 0.64, las cuales muestran fluorescencia al UV_{365 nm}.

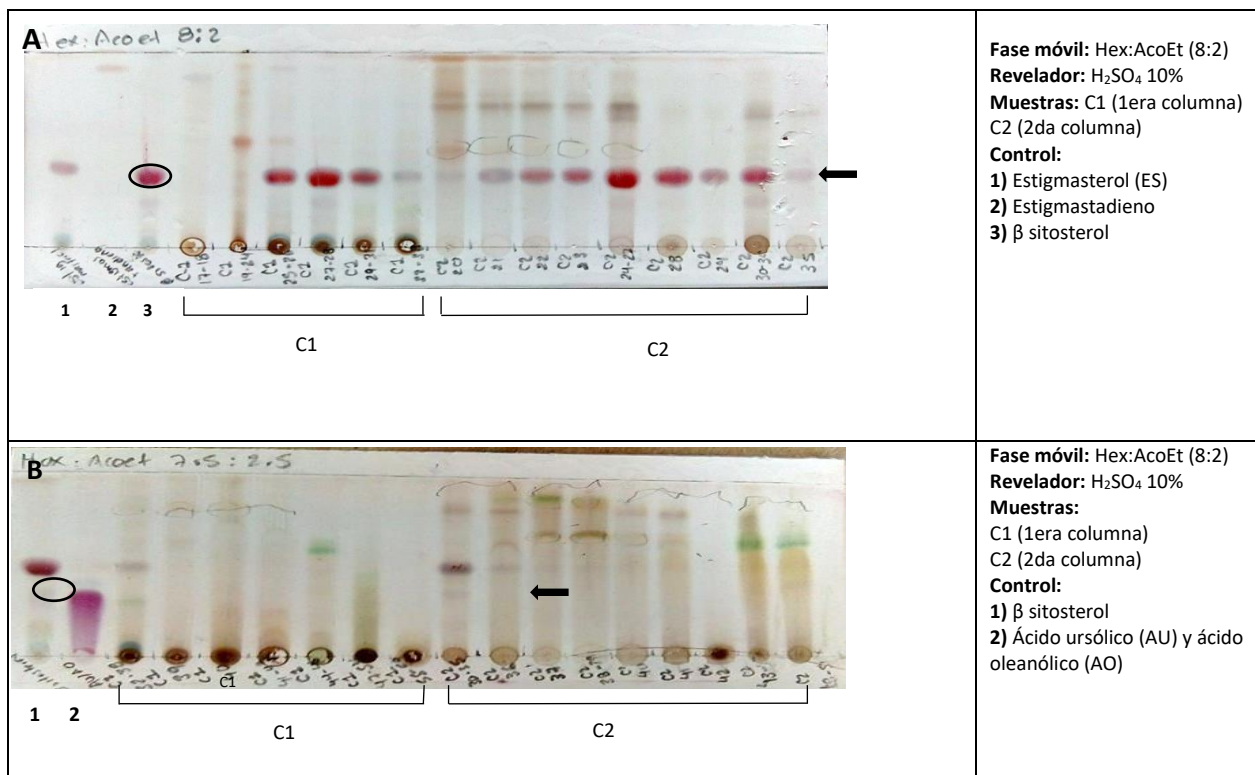


Figura 6. Cromatografía en capa fina de fase normal comparativa de las fracciones primarias del extracto CHS.

Tabla 8. Fracciones obtenidas del II fraccionamiento por CC-FN del extracto CHS de *C. serrata*

Sistema de Elusión	Fracción primaria	Peso mg	Sistema de Elusión	Fracción primaria	Peso mg
Hex	1 - 2	26.7	Hex:AcOEt (1:1)	72-75	62.7
	3 a 6	5.8		76 – 80	466.9
Hex:AcOEt (97:3)	7	318.4		81 – 83	67.6
	9 - 11	82.4		84 – 86	132.2
	12 - 14	97.6	AcOEt:Hex (75:25)	87	55.9
	15 - 16	44		88 – 89	93.6
	17-19	39.3		90 – 91	169.7
	20 - 27	74.8		92 -93	146.5
	28 - 29	17.5	AcOEt	94 – 95	224.4
Hex:AcOEt (9:1)	36	49.9	AcOEt:EtOH (75:25)	103 – 105	121.1
	37 - 39	147		106	479.2
	52 - 53	35.8		107	229.4
Hex:AcOEt (8:2)	54 -56	122.5		108-111	395
	57 - 58	59.6		112	83.1
	59-63	3123.1		115-129	336.6
	64 - 65	50		EtOH	130 a
Hex:AcOEt (7:3)	66-71	276.5	132		46.1
			133		
			MeOH	134-135	369.8
			Precipitado amarillo	Peso total	12212.1
				117-129	1450
				<i>p</i> CHS	

10.4.2. Detección de componentes químicos presentes en la muestra *p*CHS

El precipitado *p*CHS fue comparado por CCF-FR con diferentes referencias de polifenoles (naringenina, tilianina, camferol, flavona glucosilada, quercetina y rutina), en donde se confirmó la presencia de rutina ($R_f = 0.33$), empleando el sistema de elución $H_2O:CH_3CN$ (7:3). El extracto MeOH, también exhibió la presencia de este compuesto (Fig. 7A). Además, esta muestra se analizó por UPLC-DAD-MS/MS y en el cromatograma se observó un pico mayoritario con tiempo de retención (TR) = 19.4 min, con espectro UV a 264 y 348 nm y peso molecular $[M-H]^- = 755.20$ ($C_{33}H_{39}O_{20}$), este espectro de UV es característico de polifenoles (Fig. 7B). En el cromatograma también se observaron al menos tres compuestos en menor cantidad, con TR = 23.10, 26.97 y 27.60 min.

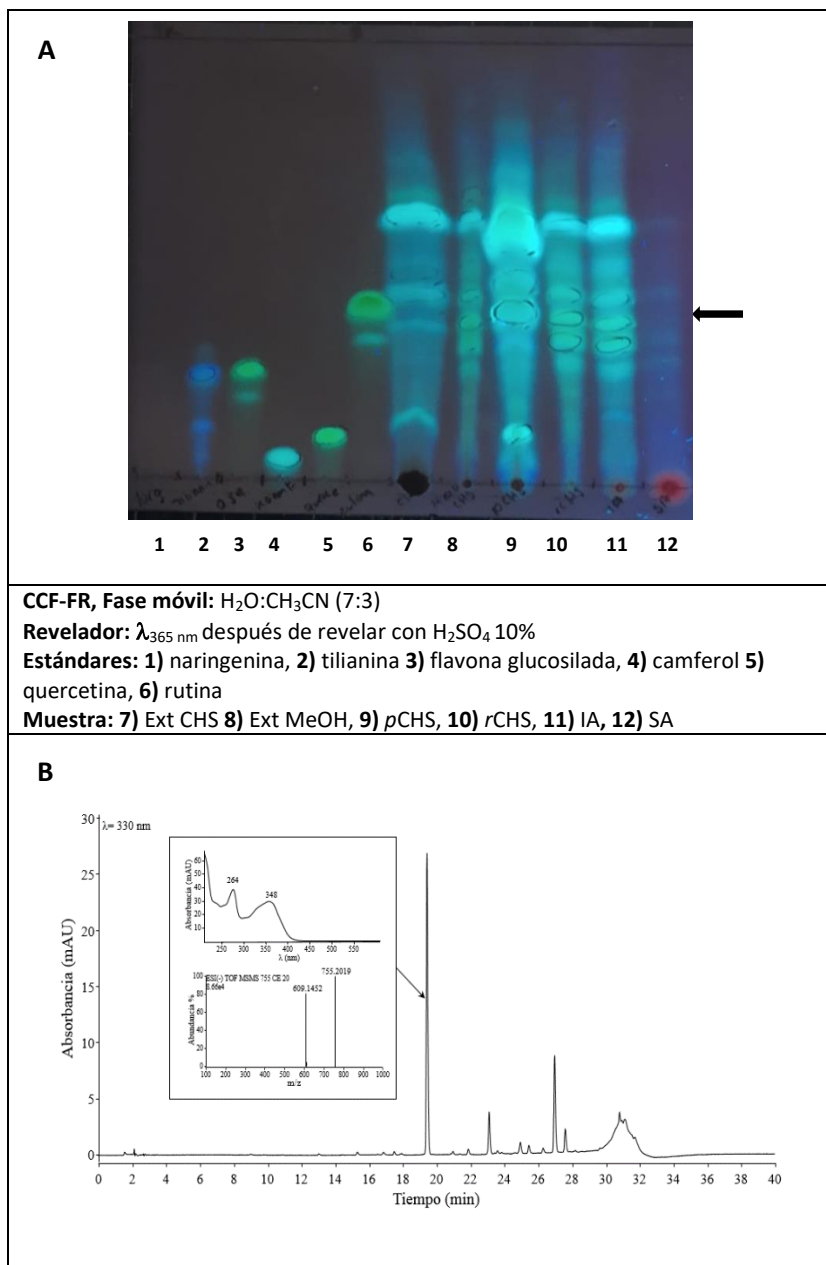


Figura 7. A) CCF-FR comparativa de las muestras pCHS, rCHS, de CHS y MeOH de *C. serrata* con algunos polifenoles de referencia. B) Cromatograma UPLC-DAD-MS/MS de pCHS

10.4.3. Acetilación de *p*CHS y su fraccionamiento.

El precipitado *p*CHS (259.5 mg) se acetiló y, de este proceso, se obtuvieron 199.4 mg de un precipitado café con rendimiento de 76.84 %. Al realizar la CCF-FN se observó una mezcla compleja de al menos tres compuestos mayoritarios, al emplear como sistema de elución AcOEt:Hex (6:4) (Fig. 8A y B). Dada la complejidad de la mezcla, esta fue sometida a CC-FN. De este proceso se obtuvieron 140 fracciones, las cuales fueron reunidas en 12 grupos (Tabla 9). En todas las fracciones secundarias se observó la presencia de coloraciones amarillas características de polifenoles acetilados (Fig 8A y B). La fracción secundaria F24-44 (55.6 mg) mayoritaria fue purificada por CCF-FN, eluyendo la placa dos veces en el sistema de AcOEt:Hex (6:4), obteniendo 4 bandas (A, Rf=0.17; B, Rf=0.28; C, Rf= 0.43; D, Rf=0.56); cada banda fue desadsorbida y la banda B (con mayor grado de pureza) fue analizada por RMN-¹H (Fig. 8D).

Tabla 9. Fraccionamiento químico por CC-FN del precipitado *p*CHS acetilado.

Sistema elusión	Fracciones	Peso (mg)
Hex:AcOEt (8:2)	2,10	5.1
Hex:AcOEt (6:4)	11,15	18.4
	16-23	10.8
	24-44	55.6
	45-48	9.6
	49-60	20.6
Hex:AcOEt (5.5:4.5)	61-70	8.5
Hex:AcOEt (1.1)	71-77	3.85
AcOEt:Hex (7:3)	88-102	11.4
	103-114	11.5
	115-137	15.8
MEOH:AcOEt (7:3)	138-140	5.4
	Total	176.55

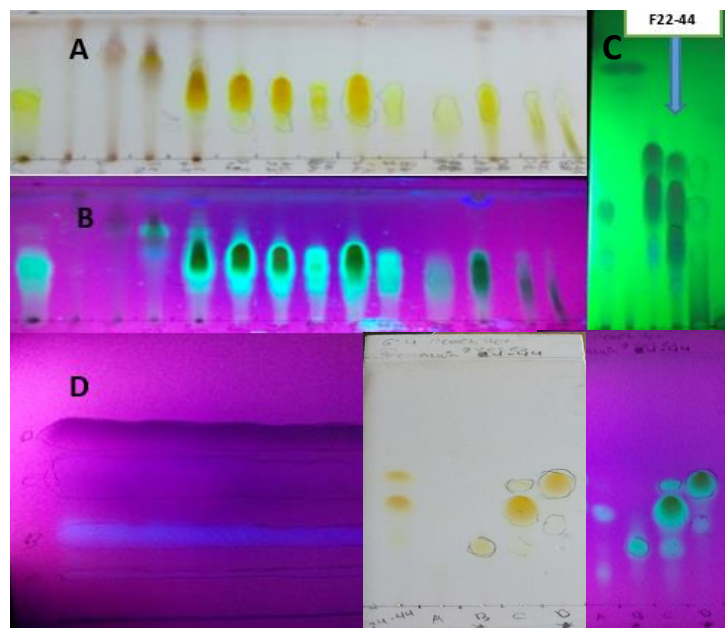


Figura 8. CCF-FN de las fracciones secundarias obtenidas por CC-FN del precipitado *p*CHS acetilado. A) Monitoreo de las fracciones por CCF-FN, reveladas con H₂SO₄ 10%; B) CCF observado a $\lambda_{365\text{ nm}}$. C) La fracción 22-44 fue sometida a CCF-FN tipo preparativa (sistema de elución AcOEt:Hex, 6:4, eluida dos veces), placa observada en $\lambda_{365\text{ nm}}$, D). CCF-FN preparativa con las 4 bandas (A, Rf=0.17; B, Rf=0.28; C, Rf= 0.43; D Rf=0.56) obtenidas de la fracción 22-44, siendo B (Rf = 0.28) la que presentó mayor pureza.

En el espectro de RMN-¹H (banda B) se observaron señales que indican la presencia de un glucoflavonoide acetilado. La señal en 12.91 ppm corresponde al hidroxilo unido al C-5, formando un puente de hidrógeno con el carbonilo del C-4 del anillo C del núcleo base (Fig. 9). A continuación, se describen las señales que corresponden a un núcleo flavonoide. Por otro lado, se observaron señales en 2.50-2.0 ppm que corresponden a los protones que se asignan a residuos de acetato (CH₃COO) unidos al azúcar.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 12.91 (1H, s, OH), 8.09 (2H, d, J= 8.9 Hz, H-2' y H-6'), 7.29 (2H, d, J= 9.0 Hz, H-3' y H-5'), 7.29 (1H, d, J= 2.1 Hz, H-8), 6.84 (1H, d, J= 2.1 Hz, H-6), 5.58 (1H, d, J = 1.8 Hz, H-1'').

Son necesarios estudios de RMN adicionales, como C¹³ y COSY, para indicar el tipo de azúcares y posición en la molécula base. Al parecer, la molécula corresponde a un derivado glucosilado de acacetina, cuyos azúcares deben estar unidos en los C-4' y -7.

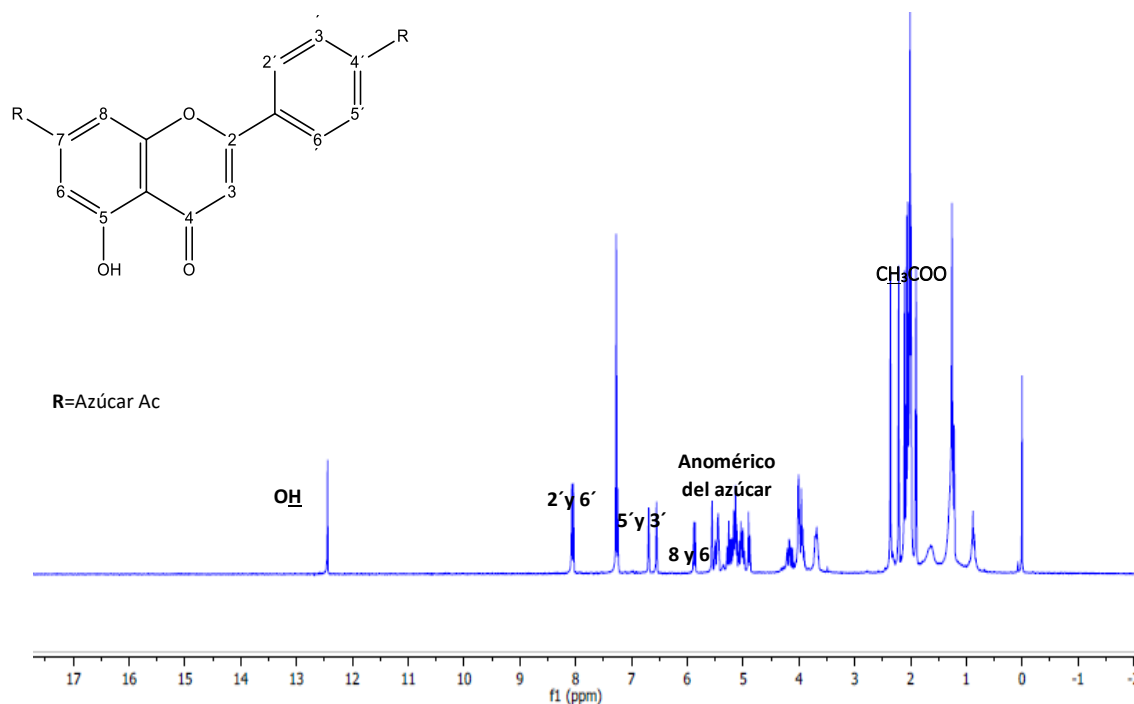


Figura 9. Espectro RMN-¹H (300 MHz) del compuesto mayoritario ($R_f = 0.28$) obtenido de la fracción primaria F24-44 de *p*CHS acetilado.

10.4.4. Fraccionamiento en CC-FN del extracto MeOH acetilado.

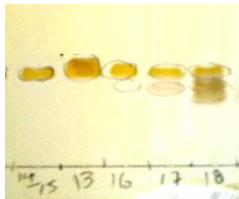
Dada la dificultad para purificar los polifenoles presentes en el extracto MeOH y en *p*CHS, se decidió realizar la acetilación del extracto MeOH con la finalidad de obtener polifenoles acetilados (menos polares). Para este proceso se tomaron 2.71 g del extracto MeOH (2.71 g) y se realizó una acetilación, obteniendo ≈ 1.67 g, con un rendimiento del 61.72%. El extracto MeOH acetilado (1.67 g) fue sometido a CC-FN; de este proceso se obtuvieron 78 fracciones que fueron agrupadas en 14 grupos de acuerdo con su perfil cromatográfico (Tabla 10). A partir de la fracción 5 a la 20, se observaron coloraciones moradas características de terpenos. En la fracción 32 a la 35 se obtuvieron 467 mg de octacetato de sucrosa con $R_f = 0.48$ e identificado por análisis de RMN-¹H. A partir de la fracción 36 a la 56 se observaron coloraciones amarillas complejas (Tabla 10).

Tabla 10. Fraccionamiento primario del extracto MeOH acetilado.

Sistema de elusión	Fracción	Mg	Rendimiento%	Observaciones
Hex:AcOEt 9:1	5 al 9	21.5	1.30	
Hex:AcOEt 9:2	10 al 13	11.7	0.71	
Hex:AcOEt 8:2	14 al 17	65.8	3.99	CCF coloración rosada (terpenos)
	18 al 20	21.2	1.28	
Hex:AcOEt 7:3	21-27	244.6	14.84	
Hex:AcOEt 6:4	28-31	35	2.12	Azúcares acetilados
	32	251.8	15.28	
	33	391.9	23.78	Octacetato de sucrosa
Hex:AcOEt 6:4, 1:1	34-35	41.3	2.50	
Hex:AcOEt 1:1	36 -38	68.8	4.17	CCF coloración amarilla (polifenoles)
	39-40	78.9	4.78	
AcOEt: Hex 6:4	41-56	110.6	6.71	
AcOEt:Hex 7:3, AcOEt, AcOEt:MeOH 9:1,8:2,7:3, MeOH	57-78	304.3	18.45	
Total		1647.4		

La fracción 41-56 (110.6 mg) se sometió a CC-FN, obteniendo 63 fracciones secundarias agrupadas en 5 grupos de acuerdo con su perfil cromatográfico (Tabla 11). Las fracciones 1-12 y 18-63 fueron eliminadas debido al bajo rendimiento. En las fracciones 13-17 se observaron coloraciones amarillas en la CCF-FN (Tabla 11). Estas fracciones se analizaron por CCF en placas de poliamida, celulosa y sílica gel impregnada con AgNO_3 y empleando diferentes sistemas de elusión para encontrar el mejor sistema para la separación de los constituyentes; sin embargo, estos sistemas no permitieron la separación adecuada de los compuestos. La fracción secundaria 13 (semipura) fue analizada por RMN ^1H , lo que confirmó una estructura con núcleo flavonoide previamente detectado en *p*CHS acetilado.

Tabla 11. Fraccionamiento secundario de la F41-56 por CC-FN.

Sistema de elusión	Fracción	Peso (mg)	Rendimiento	
CH_2Cl_2	13	19.6	17.01	
	14-15	24	20.83	
	16-17	12.3	10.67	
Total		115.2	100	Fase móvil: CH_2Cl_2 eluido dos veces Revelador: sulfato cerico

10.5.5. Fraccionamiento por CC-FN del extracto MeOH hidrolizado.

Se realizó una primera reacción de hidrólisis del extracto MeOH (220.9 mg), esta mezcla se sometió a reflujo a una temperatura de entre 80-88°C durante 2 h, lo que permitió obtener 17.4 mg (rendimiento 7.87%) de una mezcla de agliconas y azúcares, las cuales fueron recuperadas por extracción líquido/líquido, empleando CHCl₃ (clave HMeOH). La fase orgánica fue analizada por CCF-FN y se comparó con los estándares comerciales de flavonoides (orientina, isorientina, ácido clorogénico, quercetina y camferol). Uno de los constituyentes de HMeOH mostró un Rf=0.37 similar al camferol; además, se identificó β-sitosterol con Rf=0.82 (Fig.10A-1) y escopoletina con Rf=0.68 (Fig.10B-1) empleando un sistema de elusión de CHCl₃:MeOH (9:1). La escopoletina mostró un Rf=0.54 en un sistema CHCl₃:MeOH (9.5:0.5) (Fig. 10B-2). A partir del HMeOH se obtuvo un precipitado blanco que corresponde al glucositosterol con un Rf= 0.2 en el sistema de elusión de CH₂Cl₂:MeOH (9:1) (Fig. 10C-1 y 2).

Al modificar el tiempo de reacción y la temperatura a 150-160 °C, con la finalidad de aumentar el rendimiento, se obtuvieron 302 mg (27.28 % de rendimiento) de la muestra HMeOH-2 a partir del extracto MeOH (1.107 g), la cual es una mezcla de agliconas que corresponde a camferol (Rf=0.37), quercetina (Rf=0.20), escopoletina (Rf=0.68) y β-sitosterol Rf=0.82, en un sistema de CHCl₃:MeOH (9:1) (Fig.10A-1 y A-2). Además, se observó la presencia de ácido *p*-cumárico con un Rf=0.25 (Fig.11A). Es importante mencionar que la disminución de la temperatura entre 72-76 °C, con aumento en el tiempo de reacción a 3 h, no permitió que el extracto MeOH se hidrolizara completamente.

Con las nuevas condiciones de hidrólisis, fue empleado 1.14 g de extracto CHS y se obtuvo HCHS (714 mg, con rendimiento de 62.63 %), el cual presentó β-sitosterol (Rf=0.73), quercetina (Rf= 0.17), camferol (Rf= 0.3) y glucositosterol (Rf=0.2) (Fig.10-C). Por otro lado, la fase acuosa de la reacción de hidrólisis (FA) fue comparada por CCF-FN con azúcares de referencia (sacarosa, dextrosa, lactosa, fructuosa). En la CCF se observó que FA es una mezcla compleja de azúcares con Rf muy similar a los estándares empleados: dextrosa (Rf=0.39), fructuosa (Rf=0.39) y trazas de sacarosa Rf=0.28 (Fig.11-B). HMeOH (3.4 mg) fue analizado por HPLC y se confirmó la presencia de camferol (TR=31.21 min); además, se observaron dos componentes mayoritarios con TR=18.80 y 20.13 min, respectivamente (Fig 12). También se confirmó la presencia de escopoletina por HPLC (datos mostrados en el artículo).

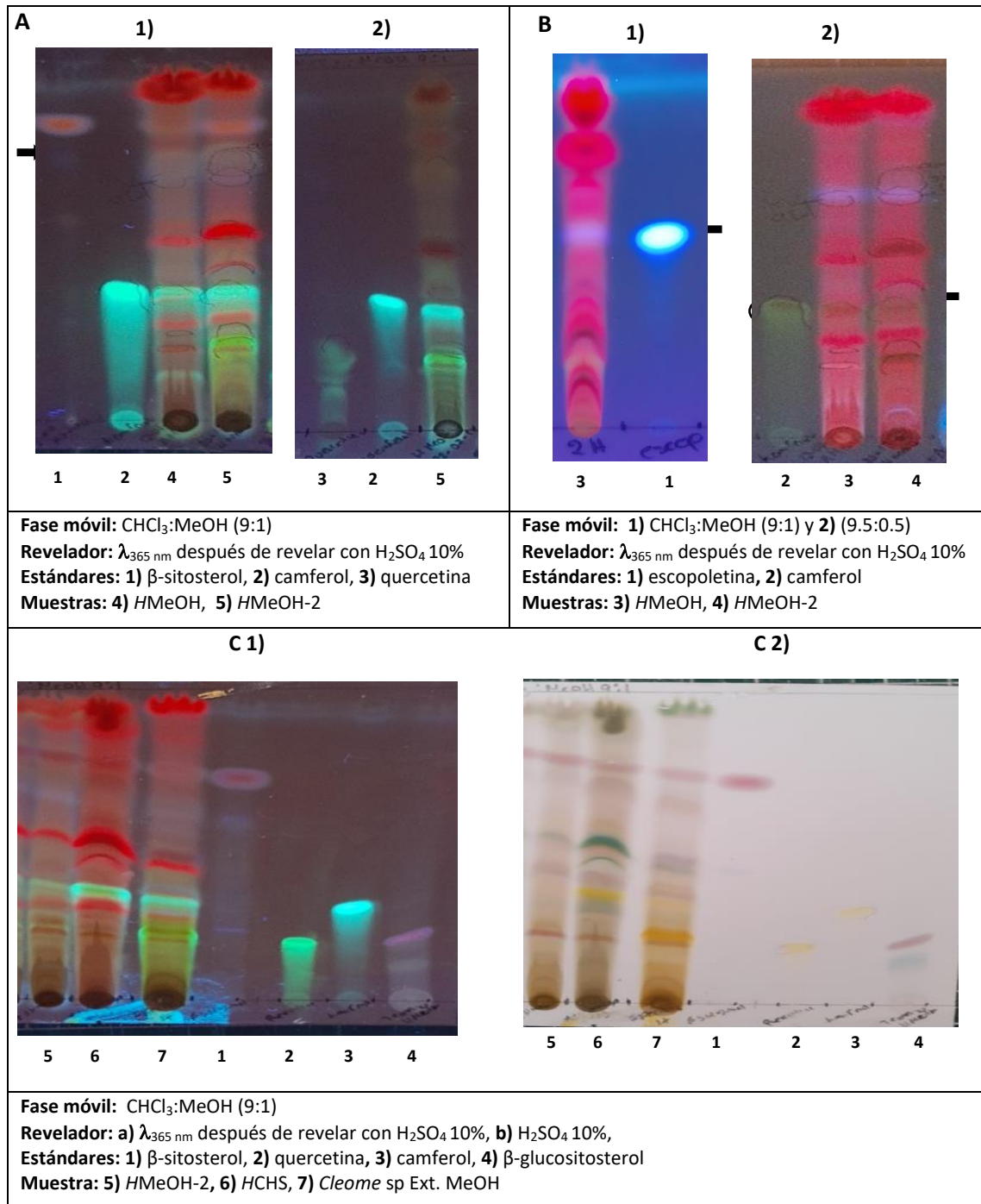


Figura 10. CCF-FN comparativa HMeOH y HCHS con diferentes estándares. A) HMeOH comparado con los estándares de camferol, quercetina y β-sitosterol. B) Detección de escopoletina en HMeOH. C) Detección de flavonoides y esteroides en HMeOH y HCHS.

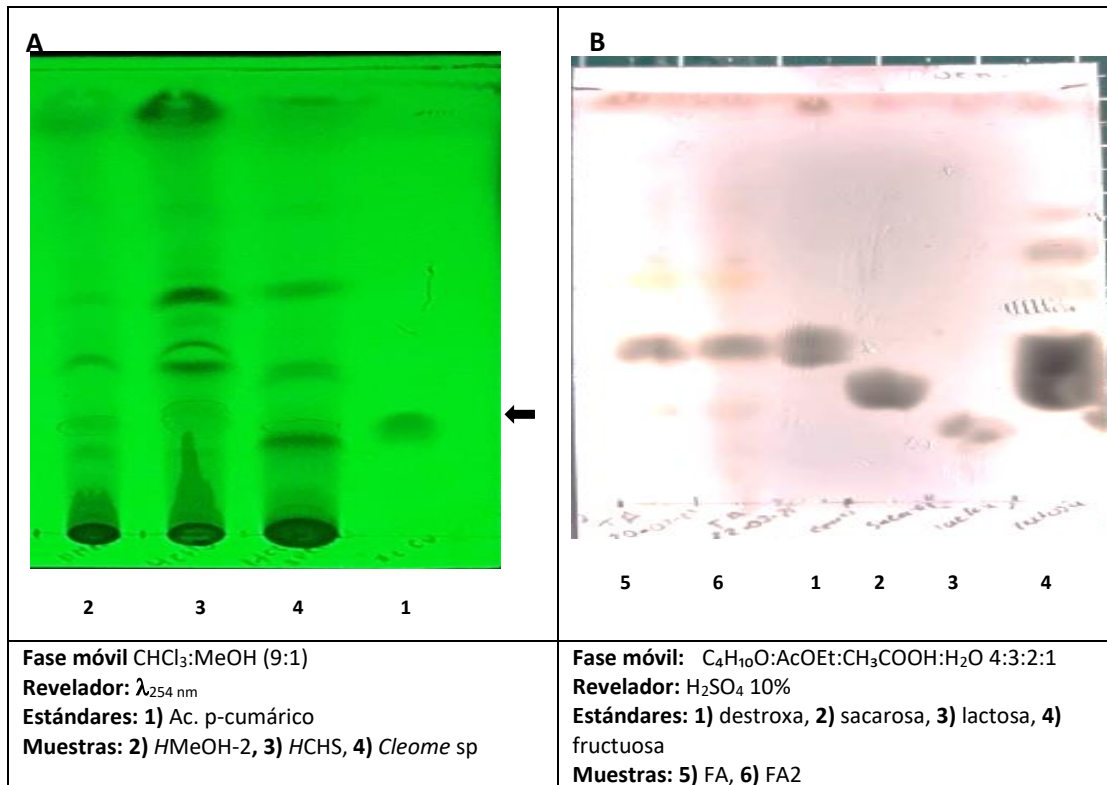


Figura 11. CCF-FN comparativa HMeOH y HCHS con diferentes estándares. A) Detección de Ac. *p*-cúmarico en HMeOH y HCHS. B) Comparación de la fracción acuosa con estándares de azúcares comerciales.

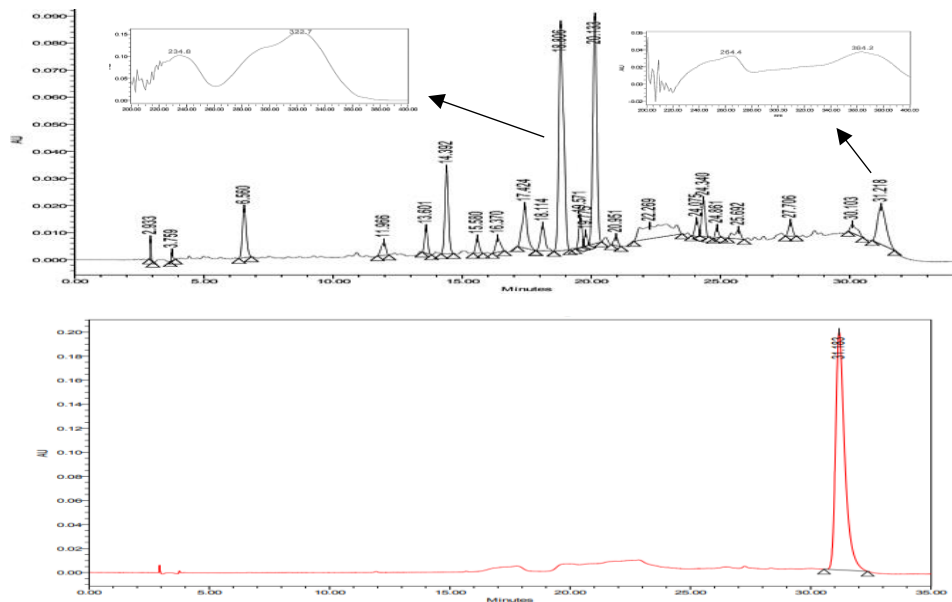


Figura 12. Cromatograma de HPLC de HMeOH (A) y del estándar comercial de camferol (B). La columna utilizada fue Phenomenex Luna® C18. El sistema de elución fue modo gradiente; A: ácido fórmico al 0.1%, fase B: CH₃CN, fase C: MeOH; 0 → 25 min, 50% A, 25% B, 25% C; y de 25 → 32 min, 90% A, 5% B, 5% C. La detección se realizó a 330 nm.

10.6.6. Identificación de aminoácidos y azúcares en el extracto CHS y MeOH por CCF-FN

Para la identificación aminoácidos en productos naturales fue empleada la técnica de ninhidrina por su alta sensibilidad. Sin embargo, la ninhidrina produce el mismo color púrpura, violeta a rosados con la mayoría de los aminoácidos ácidos, por lo que es necesario utilizar aminoácidos de referencia. El siguiente paso fue la detección de aa en los extractos polares CHS y MeOH por comparación del Rf con estándares comerciales. Cabe señalar que ambos extractos mostraron una similitud cromatográfica con las bebidas energizantes Boost® (contiene taurina) y Red Bull® (contiene taurina y L-carnitina). Además, se detectó fenilalanina, alanina (Rf= 0.41) y metionina (Rf= 0.58) (Fig. 13 A-1) y en el extracto MeOH se observó glicina (Rf= 0.31) (Fig. 13 A-1, A-2) en el sistema de elución C₄H₁₀O:acetona:CH₃COOH:H₂O (35:35:10:20). El extracto MeOH presentó un perfil similar a la proteína vegana Birdman® (la cual contiene alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina) (Fig. 13A-3). La comparación del extracto MeOH con algunos estándares de azúcares, indicó la presencia de sacarosa con Rf=0.16, entre otros azúcares (Fig. 13-B).

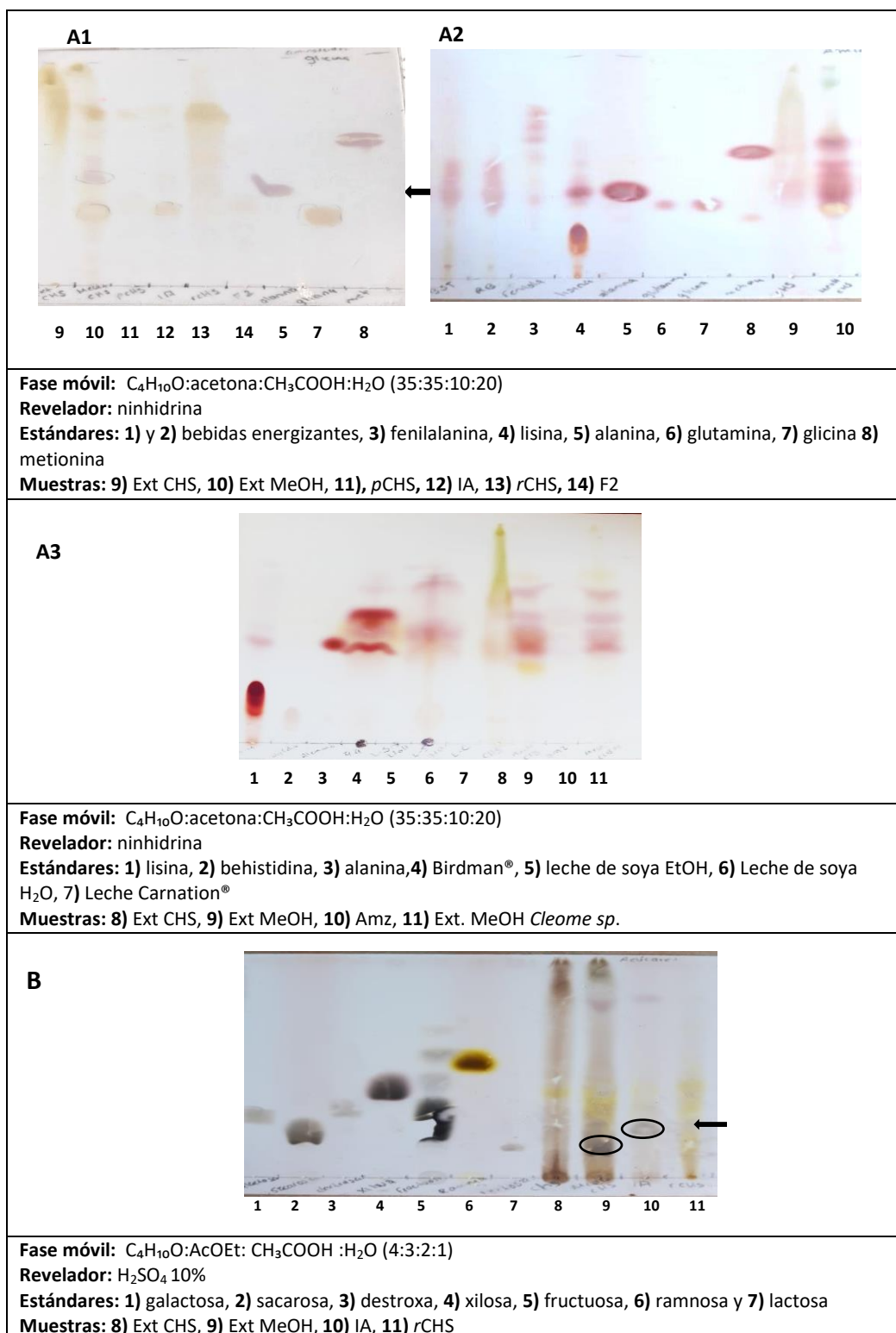


Figura 13. CCF-FN comparativa de los extractos CHS y MeOH de *C. serrata* con algunos estándares de aminoácidos (A) y azúcares (B).

10.7.7. Desarrollo del método analítico por HPLC para la separación de los polifenoles de las muestras *p*CHS, *r*CHS y del extracto MeOH.

Separación de azúcares y aa por Sepabeads

El fraccionamiento de *p*CHS a través de una CC/SP-207 (Tabla 12) permitió la obtención de dos grupos de compuestos mayoritarios (polifenoles y la mezcla de azúcares y aa), que fueron reunidas por presentar un perfil similar en CCF. Las fracciones ricas en aa y azúcares, S2 (1.06 g), R1 (1.81g) R2 (590 mg) y R3 (23 mg) eluidas con H₂O cuya clave es Amz, tuvieron un rendimiento mayor, siendo del 56.08, 20.30, 6.58 y 0.25%, respectivamente (Tabla 12, Fig. 14). Las fracciones eluidas con H₂O:MeOH (1:1) con clave *r*CHS, correspondieron a las reuniones de F4-5 (5.4 mg), S3 (276 mg) y R4 (835 mg), donde se obtuvo la mezcla de polifenoles (coloración amarilla), con rendimientos muy bajos (1.98, 7.93, 9.18 %, respectivamente) (Fig. 14A).

Por otro lado, la muestra IA, rica en polifenoles, azúcares (dextrosa, Rf= 0.34, sacarosa; Rf= 0.24) y aa pero con menos clorofila, fue obtenida a partir del extracto MeOH y del extracto CHS lavado con acetona (Fig. 14-A, B y C). Esta muestra fue fraccionada por CC/SP-207 y, mediante este proceso, se obtuvo la fracción SP3F6-7 (344 mg con rendimiento del 23.08%), con perfil similar a *r*CHS, por lo que estas se reunieron (*r*CHS= 1.11 g) (Fig. 14-A). En *r*CHS y en el extracto MeOH se detectó la rutina (Rf = 31), cuyo Rf fue igual al estándar comercial (Fig. 14-D).

Tabla 12. Fracciones obtenida de *p*CHS y del extracto MeOH (IA) por CC/SP-207.

Muestras	Sistema de elución	Clave	Peso/rendimiento	Observaciones
<i>p</i> CHS (272.3 mg) Preliminar	H ₂ O	F1-F2	5 mg (1.83%)	Trazas de azúcares (sacarosa)
	H ₂ O:MeOH (1:1)	F4-F5*	5.4 mg (1.98%)	polifenoles
	MeOH	F6	2mg (0.73%)	compuestos polares
	Acetona	F7	8.4 mg (3.0%)	compuestos polares
<i>p</i> CHS (1.89 y 1.59 g)	H ₂ O	S1	593 mg (31.37%)	aa
	H ₂ O	S2**	1.06 g (56.08%)	aa y azúcares (sacarosa)
	Cambio a MeOH	S3*	276 mg (7.93%)	polifenoles
	MeOH, acetona	S4	50.27 mg (1.43%)	trazas de polifenoles y compuestos polares
IA (Ext. MeOH) (8.96 g) Pendiente	H ₂ O	R1**	1.819 g (20.30 %)	aa y azúcares (sacarosa)
	H ₂ O	R2**	590 mg (6.58 %)	aa y azúcares (sacarosa)
	H ₂ O	R3**	23 mg (0.25 %)	trazas de aa y trazas de azúcares
	Cambio MeOH	R4*	835 g (9.18%)	Polifenoles
	MeOH/acetona	R5	1.916 (21.31%)	Trazas de polifenoles y comp. pol.

r*CHS= fracciones con polifenoles (1.11 g), Amz (aa y azúcares) (2.85 g).

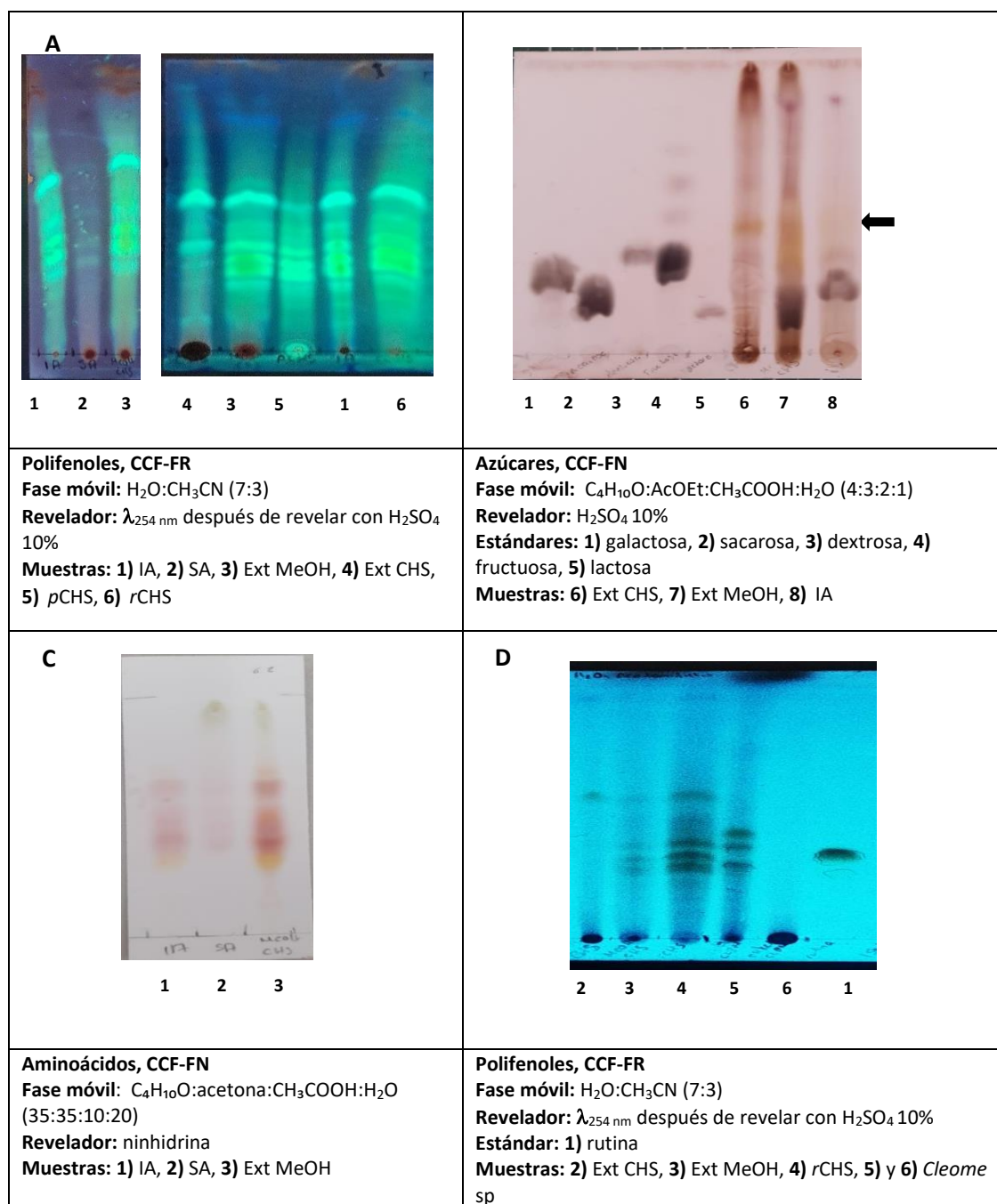


Figura 14. CCF-FN comparativa de la muestra IA, polifenoles, aa y azúcares.

La fracción S2 se obtuvo como precipitado blanco con $R_f = 0.31$, el cual fue similar al estándar de la sacarosa. En las muestras S1 y S2 (Tabla 12) se detectaron principalmente aa al revelar la CCF con ninhidrina; en este caso, se detectaron varios aa, dos de ellos presentaron $R_f = 0.4$ y 0.62 , similar a la alanina y metionina (estándares comerciales) (Fig.15 A y B). La muestra S2 contiene principalmente azúcares y aa. Las fracciones R1, R2 y R3 obtenidas de la muestra IA, mostraron un $R_f = 0.31$ similar a la sacarosa y se observó la presencia de otros azúcares; estas fracciones contienen aminoácido como alanina con $R_f = 0.32$, metionina con $R_f = 0.62$, histidina con $R_f = 0.08$ y glicina, con $R_f = 0.07$ (Figura 15 A y B). El efecto biológico de *r*CHS y Amz fue posteriormente evaluada.

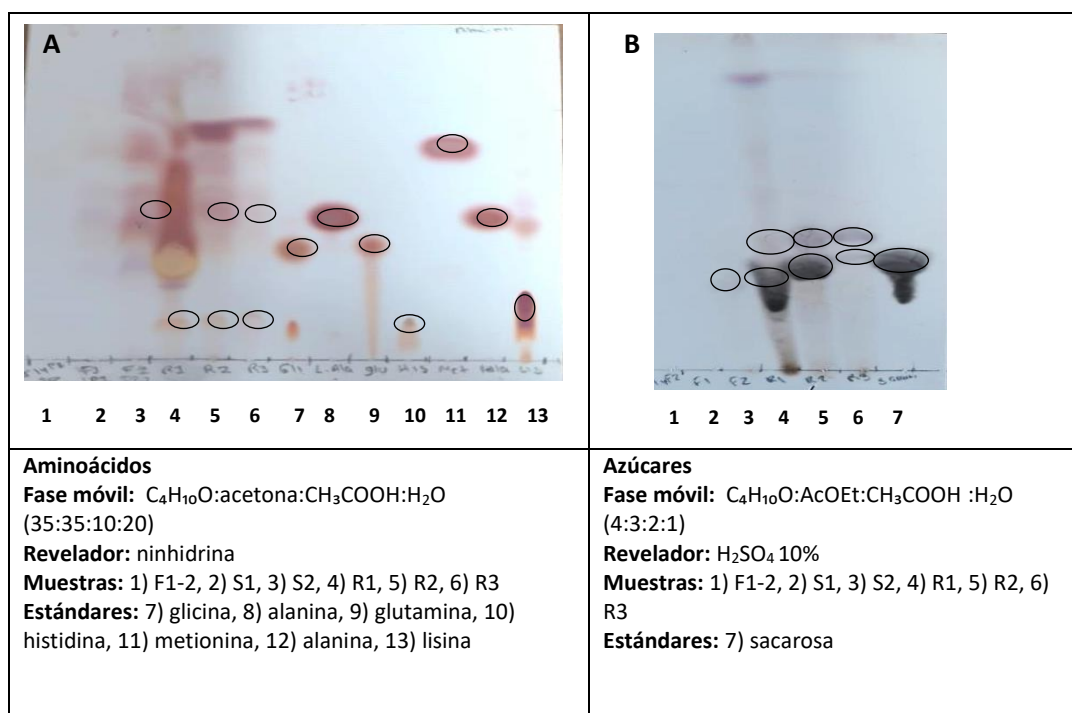


Figura 15. Detección de azúcares y aa en las fracciones obtenidas de *p*CHS y del extracto MeOH por CCF.

La muestra *p*CHS y la *r*CHS obtenida de *p*CHS por CC7/SP207 fueron analizadas por HPLC empleando el método C, el cual se describe en la metodología. Este método permitió una mejor separación y resolución de los constituyentes. Por lo que fue empleado para la separación de los componentes, sobre todo en la muestra *r*CHS.

10.8.8. Fraccionamiento primario del extracto Hex por CC-FN.

El fraccionamiento del extracto de Hex (15.09g) en CC-FN permitió obtener 122 fracciones, de 400 mL c/u, las cuales fueron agrupadas de acuerdo con su perfil cromatográfico en 22 grupos. El análisis por CCF de estas fracciones mostró la presencia de esteroides, ésteres de ácidos grasos y triterpenos (Tabla 13). La fracción secundaria XV con un rendimiento de 1.9 mg, se sometió a un fraccionamiento por CC-FN, obteniendo cuatro grupos de fracciones secundarias (XV-a, XV-b, XV-c, XV-d). En la fracción XV-a secundaria se identificó, β -amirina, acetato de lupeol, acetato de β -amirina, estigmastan-3,5-dieno, estigmastan-3,5-dieno y se encontró β -sitosterol en las fracciones secundarias XV-b y XV-c, y algunos ácidos grasos como el palmitato de etilo; se detectó ácido palmítico en la fracción XV-d.

Tabla 13. Fraccionamiento primario del extracto Hex por CC-FN.

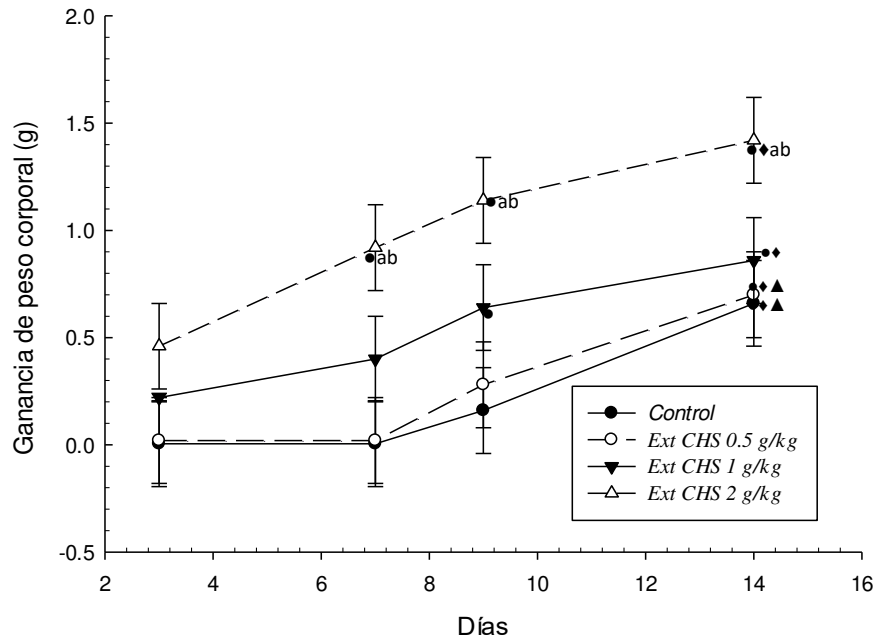
Sistema de Elusión	Fracciones	Peso (mg)	Rendimiento%	Observaciones
Hex	I (F1-2)	59.80	0.40	
	II (F3-7)	77.1	0.51	
Hex, Hex:CHCl ₃ (95:05)	III (F8-18)	10.90	0.07	
Hex:CHCl ₃ (95:05)	IV (F19-27)	6.40	0.04	
Hex:CHCl ₃ (9:1,8:2)	V (F28-30)	78.5	0.52	
Hex:CHCl ₃ (8:2)	VI (F31-35)	171	1.13	
	VII (F36-40)	124.30	0.82	
	VIII (41-44)	113.60	0.75	
Hex:CHCl ₃ (7:3)	IX (45-53)	549.20	3.64	
Hex:CHCl ₃ (6:4)	X (54-56)	192.90	1.28	
	XI (57-61)	53.50	0.35	
	XII (62-65)	52.50	0.35	
Hex:CHCl ₃ (1:1)	XIII (66-68)	115.40	0.76	
	XIV (69-71)	311.40	2.06	
	XV (72-78)	1956	12.96	La fracción XV a la XX tuvieron un perfil similar a β -sitosterol en CCF-FN
Hex:CHCl ₃ (4:6)	XVI (79-94)	3838.2	25.44	
Hex:CHCl ₃ (2:8)	XVII (95-96)	400.50	2.65	
	XVIII (97-99)	292.20	1.94	
CHCl ₃	XIX (100-107)	835.90	5.54	
CHCl ₃ :MeOH (8:2)	XX (108-113)	7220.90	47.85	
CHCl ₃ :MeOH (1:1)	XXI (114-117)	180.50	1.20	
CHCl ₃ :MeOH (3:7)	XXII (118-122)	104	0.69	

10.9. Objetivo 7. Determinación de la toxicidad aguda (DL₅₀) de los extractos de *C. serrata* en ratones Balb/C.

Los extractos CHS, Hex, CH₂Cl₂ y MeOH, evaluados a las dosis de 0.5, 1 y 2 g/kg en el ensayo de toxicidad, no se observaron signos de toxicidad, ni cambios macroscópicos en los órganos por lo que se consideran sustancias de Categoría 5 según el TG 423 de la OCDE. La DL₅₀ para estos extractos fue > 2000 mg/kg y < 5000 mg/kg. El extracto CHS a las dosis de 0.5, 1 y 2 g/kg presentó un incremento del peso corporal con un 0.70 g, 0.86 g, 1.42 g, respectivamente, en comparación con el control sano (0.66 g) (Gráfica 14). Los extractos Hex y CH₂Cl₂ mostraron una DL₅₀ > 2 g/kg. Cabe señalar que únicamente el extracto Hex, generó una ligera disminución del peso al día 12 y 14 (1.50 y 1.79 g vs 2.98 g), respecto al control (Gráfica 15).

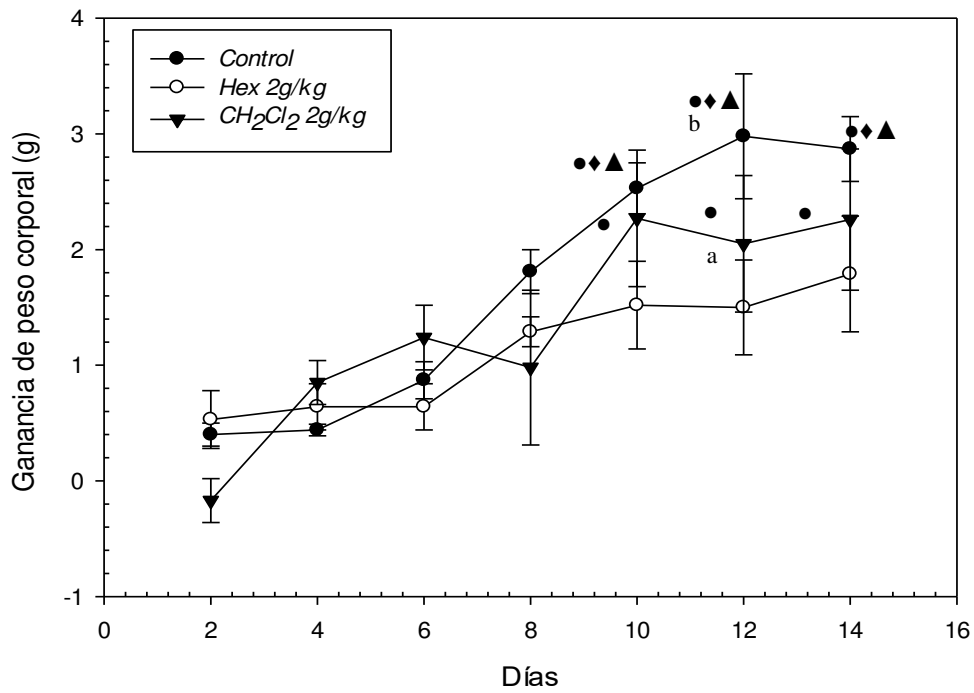
Durante el tiempo de experimentación, no se observó ningún signo de toxicidad, ni cambios macroscópicos en órganos (datos no presentados). Por otro lado, el extracto de MeOH fue evaluado a las dosis de 0.5, 1 y 2 g/kg; se observó que a 0.5 y 2 mg/kg no afectó la GPC, observando un comportamiento similar al control sano (Gráfica 16). Sin embargo, este extracto a 1 g/kg disminuyó la GPC en el día dos con una diferencia de -0.75 g, con respecto al grupo control (0.75 g). Esta disminución de la GPC puede estar relacionada con un aumento en la eliminación de moco en las heces de los ratones que recibieron el extracto.

Gráfica 14. Efecto del extracto CHS de *C. serrata* sobre el peso corporal de ratones Balb/C.



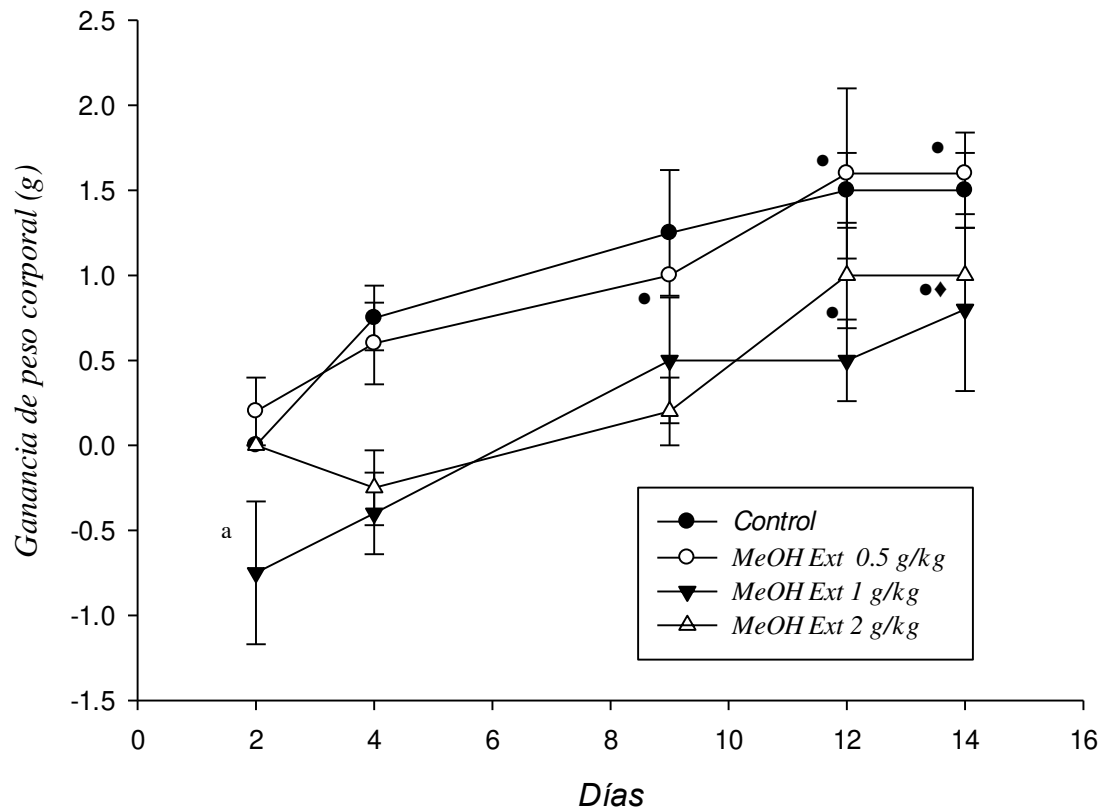
Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.5$); ^avs Vehicle group; ^bvs 0.5 g/kg; ^cvs 1 g/kg; ^{*}vs Day 3; [♦] vs Day 7; [▲]vs Day 9; n=5.

Gráfica 15. Efecto de los extractos Hex y CH₂Cl₂ de *C. serrata* sobre el peso corporal de ratones Balb/C.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba de post hoc SNK ($p < 0.05$); ^avs grupo vehículo; ^bvs Hex group ●vs Día 2; ◆vs Día 4; ▲vs Día 6; n=4.

Gráfica 16. Efecto del extracto MeOH de *C. serrata* sobre el peso corporal en ratones Balb/C.

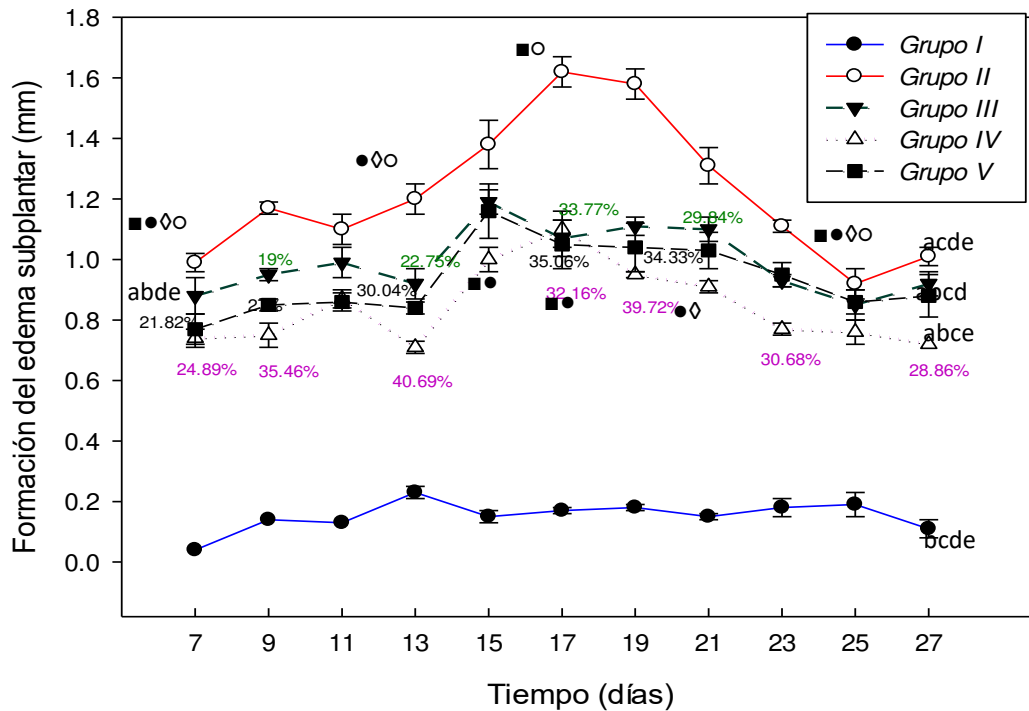


Media \pm error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA dos vías seguido de una prueba de post hoc SNK $p < 0.05$, ^avs grupo vehículo; ●vs Día 2; ◆vs Día 4; n=5.

10.10. Objetivo 8. Efecto antiinflamatorio en el modelo de AFC.

En la gráfica 17 se describe el efecto antiinflamatorio del extracto CHS sobre el edema plantar (mm) y los porcentajes de inhibición de inflamación (los datos completos del experimento se muestran en el Anexo 1 y 2). En este modelo, se indujo el proceso inflamatorio con 25 µL de AFC administrado el día 1 y 14, y se registró el tamaño del edema cada tercer día. En el grupo II (AFC) se observó incremento del tamaño del edema, alcanzando un incremento máximo (1.62 y 1.58 mm) los días 17 y 19. A partir del día 21, la inflamación en este grupo empezó a disminuir, siendo de 1.01 mm en el día 27. El control positivo, FBZ (grupo III), administrado diariamente a partir del día 7 al 28, mostró el mayor porcentaje de inhibición, siendo de 33.77 % (1.07 mm) y de 29.84% de inhibición (1.11 mm) en los días 17 y 19. Al día 27 se observó un 9.21% de inhibición (0.92 mm). Respecto a los porcentajes de inhibición, en el grupo IV que recibió el extracto CSH a 150 mg/kg (administrado a partir del día 7 al 27) se observó un 35.46 % (0.75 mm) al día 9, el día 13 inhibió en un 40.69 % (0.71 mm) y en el día 17 y 19 la inhibición fue de 32.16 y 39.72% (1.10 y 0.95 mm), respectivamente; al día 27, el porcentaje de inhibición fue de 28.86 % (0.72 mm). El grupo V recibió el extracto CSH a 300 mg/kg; este grupo presentó menor porcentaje de inhibición durante el periodo de administración, siendo de 30.04, 35.06 y 34.33% (0.84, 1.05 y 1.04 mm, respectivamente) en los días 13, 17 y 19, al final del experimento (día 27) el porcentaje fue del 13.02% (0.88 mm). En la Fig. 16 se observan las fotografías del edema plantar de los animales al finalizar el experimento.

Gráfica 17. Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de *C. serrata* de sobre el edema plantar (mm) y % de inhibición del edema plantar en ratones macho Balb/C determinado en el modelo de inflamación crónica.



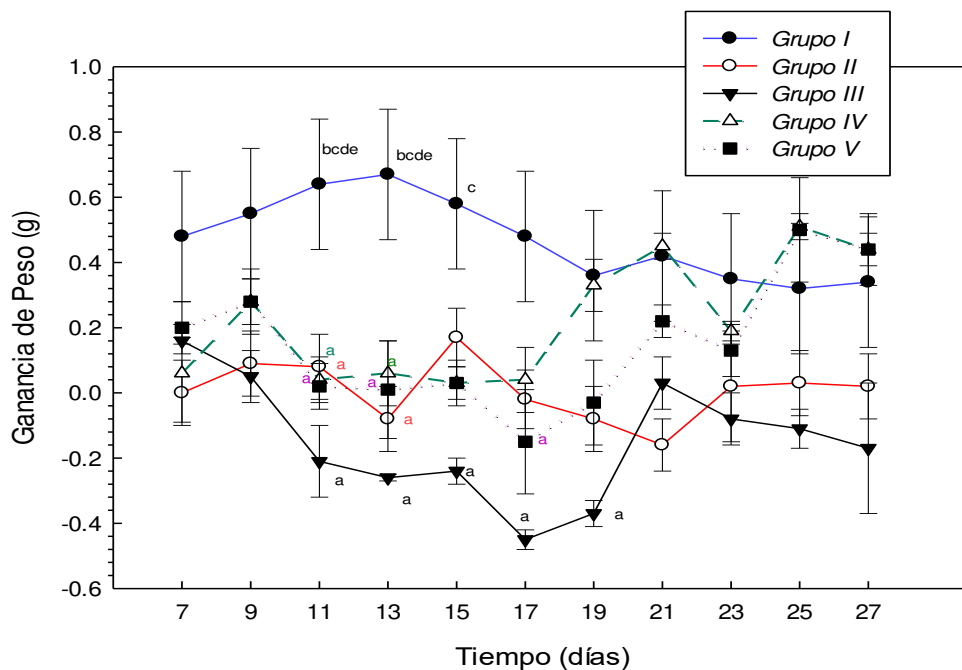
Los datos son expresados como la media \pm error estándar de la media (EEM). Los tratamientos fueron administrados por vía i.g diariamente a partir del día 7 al 27. Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$) ^avs comparado con el Grupo I; ^bvs Grupo II, ^cvs Grupo III, ^dvs Grupo IV, ^evs Grupo V; [■]vs día 9, [●]vs día 13, [◇]vs día 17, [○]vs día 19. AFC: adyuvante completo de Freund, FBZ: Fenilbutazona, n=6.



Figura 16. Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de *C. serrata* sobre el edema plantar (% de inhibición) en ratones macho Balb/C determinado en el modelo de inflamación crónica al día 27. Grupos: control (I), AFC (II), AFC+FBZ 100 mg/kg (III), AFC+CHS 150 mg/kg (IV), AFC+CHS 300 mg/kg (V). AFC: adyuvante completo de Freund, FBZ: Fenilbutazona.

En la gráfica 17 se muestra la ganancia de peso corporal (GPC) de los animales de experimentación (los datos completos del experimento se muestran en el Anexo 3). Como era de esperar, el grupo II con AFC (inflamación crónica) mostró pobre GPC, siendo < 0.17 g durante los 28 días. El grupo III, tratado con FBZ (100 mg/kg), generó mayor pérdida de peso del día 7 al 27, observándose valores de -0.21 a -0.45 g partir del día 11 al 17; en este periodo el grupo de sanos mostró ganancia de 0.48 a 0.64 g. Al día 27, esta pérdida fue de -0.17 g, respecto al grupo de sanos (0.34 g). En el grupo IV (tratado con el extracto CHS a 150 mg/kg se observó un incremento del peso corporal a partir del día 19 (0.33 g), 21 (0.45 g), 25 (0.51 g) hasta el día y 27 (0.44 g). Este incremento fue ligeramente mejor al del control sano. El grupo V, que recibió el extracto CHS a 300 mg/kg, mostró escaso incremento a partir del día 21 (0.22 g); al día 27, el incremento fue de 0.44 g, siendo este incremento igual al grupo IV y ligeramente mayor al del grupo I (sanos, 0.34 g)

Gráfica 18. Efecto del extracto CHS de *C. serrata* sobre la ganancia de peso corporal (g) en ratones macho Balb/C tratados por vía i.g. con el extracto CHS en el modelo de inflamación crónica.



Media \pm error estándar de la media (EEM). Los tratamientos fueron administrados por vía i.g. diariamente a partir del día 7 al 27. Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$) ^avs comparado con el Grupo I; ^bvs Grupo II, ^cvs Grupo III, ^dvs Grupo IV, ^evs Grupo V; AFC: adyuvante de Freund completo; FBZ: Fenilbutazona, $n=4$. Grupos: control (I), AFC (II), AFC+FBZ 100 mg/kg (III), AFC+CHS 150 mg/kg (IV), AFC+CHS 300 mg/kg (V).

En la Tabla 14 se describe el peso de los ganglios poplíteo y el porcentaje de inhibición que generaron los tratamientos al día 27. Se observa que el grupo II (AFC), presentó un peso promedio de 0.39 g, mientras que los grupos III (grupo FBZ) y IV (extracto a 150 mg/kg) mostraron una reducción en el tamaño del ganglio, siendo del 30.76% (0.27 g) y del 27.49%, respectivamente, con respecto al grupo II. El grupo V mostró una reducción del 15.34% (0.33 g).

Tabla 14. Efecto del extracto CHS de *C. serrata* sobre el peso (g) de los ganglios poplíteos y el porcentaje (%) de inhibición de ratones macho Balb/C con inflamación crónica inducida con AFC.

Grupo	Peso	% inhibición
I	0.001±0.00 ^{bcde}	(-)
II	0.39±0.01 ^{acde}	(-)
III	0.27±0.00 ^{abe}	30.04
IV	0.28±0.01 ^{abe}	27.49
V	0.33±0.01 ^{abc}	15.34

Media ± error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$) ^avs comparado con el Grupo I; ^bvs Grupo II, ^cvs Grupo III, ^dvs Grupo IV, ^evs Grupo V; AFC: adyuvante de Freund completo; FBZ: Fenilbutazona, n=4. Grupos: control (I), AFC (II), AFC+FBZ 100 mg/kg (III), AFC+CHS 150 mg/kg (IV), AFC+CHS 300 mg/kg (V).

En la Tabla 15 se describe el peso absoluto (g) de hígado, riñones, bazo y corazón. Los grupos II y V presentaron aumento en peso del hígado, con valores de 1.69 y 1.45 g, respectivamente, respecto al grupo I (1.35 g); el grupo III presentó un ligero incremento comparado con el grupo sano (1.41 g vs 1.35), sin embargo, el grupo III (1.41 g) y V (1.45 g), mostraron menor peso en comparación con el grupo II (1.69 g). en cambio, el grupo IV que recibió el extracto CSH a 150 mg/kg presentó un peso menor (1.24 g) al del control (1.35 g) y el grupo II (1.69 g).

El peso del corazón también incrementó en los mismos grupos (II y V), siendo de 0.20 g y de 0.18 g, respectivamente, con respecto al grupo I (0.15 g); en cambio, los grupos III (FBZ) y IV (extracto CSH, 150 mg/kg) presentaron peso similar (0.14 g) al control (0.15 g). Respecto al peso de riñones, el grupo II (AFC) presentó mayor peso que el grupo sano (0.48 g vs 0.40 g); los grupos III, IV y V presentaron un peso < 0.38 g valor similar al grupo sano (0.40 g); esto mismo se observó para el peso del bazo, siendo de 0.16 g y 0.15 g para el grupo II y V vs 0.12 g del control sano y el peso del bazo de los grupos III y IV fue de 0.10 g, valor cercano al grupo I (0.12 g). Cabe señalar que en este experimento ningún animal murió.

Tabla 15. Efecto del extracto CHS de *C. serrata* sobre el peso absoluto (g) y el peso relativo (%) de los órganos en ratones macho Balb/C.

Órgano/ Grupo	Peso absoluto (g)				
	I	II	III	IV	V
Hígado	1.35±0.07 ^{bd}	1.69±0.04 ^{acde}	1.41±0.01 ^{bd}	1.24±0.01 ^{abce}	1.45±0.03 ^{bd}
Riñones	0.40±0.02 ^{bd}	0.48±0.01 ^{acde}	0.38±0.00 ^{bd}	0.33±0.00 ^{abc}	0.37±0.00 ^b
Bazo	0.12±0.00 ^b	0.16±0.00 ^{acde}	0.10±0.00 ^b	0.10±0.00 ^b	0.15±0.02 ^b
Corazón	0.15±0.00 ^b	0.20±0.01 ^{acde}	0.14±0.00 ^{be}	0.14±0.00 ^{be}	0.18±0.00 ^{acd}
Peso animal (g) Día 27	27.5±0.9	29.58±0.2	25.27±0.4	24±0.6	24.29±0.4

Media ± error estándar de la media (EEM). Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$) ^avs comparado con el Grupo I; ^bvs Grupo II, ^cvs Grupo III, ^dvs Grupo IV, ^evs Grupo V; AFC: adyuvante de Freund completo; FBZ: Fenilbutazona, n=4. Grupos: control (I), AFC (II), AFC+FBZ 100 mg/kg (III), AFC+CHS 150 mg/kg (IV), AFC+CHS 300 mg/kg (V).

11. DISCUSIÓN

Los géneros *Cleoserrata*, *Cleome*, *Corynandra*, *Gynandropsis* y *Tarenaya* (pertenecen a la familia *Cleomaceae*) son empleados principalmente para el tratamiento de enfermedades con procesos inflamatorios e infecciosos. En estudios previos se ha reportado que algunas especies tienen efecto antioxidante (*in vitro*), antinociceptiva y antiinflamatoria *in vivo* en modelos de inflamación aguda y crónica (modelo experimental de artritis).^{63,73} En especial, el género *Cleoserrata* está compuesto por cinco especies (*C. bahiana*, *C. melanosperma*, *C. paludosa*, *C. serrata* y *C. speciosa*), de las cuales, únicamente *C. serrata* ha sido objeto de dos investigaciones.^{13,83,85} En general se conoce poco sobre su perfil fitoquímico y potencial biológico. En México, esta especie es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de la “úlceras del chiclero” (infección generada por *Leishmania*), la cual produce lesiones inflamatorias cutáneas. El extracto CH₂Cl₂:MeOH 1:1 de las hojas de *C. serrata* tiene efecto leishmanicida contra amastigotes y promastigotes y se ha detectado mediante pruebas cualitativas, esteroides, terpenos, flavonoides y polifenoles.¹³

El presente trabajo se discuten los resultados de acuerdo con el perfil fitoquímico mostrado por la especie *C. serrata* y su efecto biológico.

Perfil fitoquímico de la especie *C. serrata*.

Como primer paso en el desarrollo del presente trabajo se preparó el extracto CHS (CH₂Cl₂:EtOH 1:1) de las hojas de *C. serrata* por el método de maceración, el cual se obtuvo con buen rendimiento (31.6%). Este extracto se sometió a CC-FN y en las fracciones primarias se detectan principalmente ácidos grasos, esteroides, triterpenos y polifenoles. Este extracto se sometió a fraccionamiento por CC-FN, obteniendo fracciones con diferente grado de polaridad, conteniendo terpenos, esteroides y polifenoles. Esto concuerda con lo reportado por Alamilla-Fonseca *et al.* (2018)¹³, quienes describieron la presencia de este tipo de compuestos en el extracto CH₂Cl₂:MeOH 1:1 de *C. serrata* al realizar pruebas cualitativas.

En las fracciones primarias poco polares (14, 15-16, 29-31) del extracto CHS se detectó por CG-EM: fitol, éster etílico del ácido palmítico, γ -sitosterol, estigmasta-3,5-dien-7-ona y ácido palmítico (>5% de rendimiento) como compuestos mayoritarios. En la-fracción 47-54 y 62-68 se detectó un derivado del fitol y el ácido palmítico, como componentes mayoritarios. Cabe señalar que en las fracciones 25 a la 38 se detectó principalmente β -sitosterol. En el 2012, McNeil describió que el aceite esencial obtenido por hidrodestilación de las partes aéreas frescas de *C. serrata* (colectada en India) contenía 14 componentes, siendo el fitol (53.0%), di-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP) (14.7%) y piperonal (11.5%) los mayoritarios.⁸⁵ Además, el fitol es uno de los principales constituyentes

presente en los aceites esenciales de *Cleome burmanni*, *Cleome monophylla*, *Corynandra viscosa* (Sin. *Cleome viscosa*) y *Tarenaya spinosa* (Sin. *Cleome espinosa*); el ácido palmítico se ha reportado también en *Corynandra viscosa*.¹¹

Previamente se ha reportado el aislamiento de terpenos y esteroides en algunas especies de la familia *Cleomaceae*, como *C. arabica*, que presenta β -sitosterol; ^{11,80, 96} este compuesto fue mayoritario en las fracciones 25 a la 38, y en la fracción de polaridad intermedia 62-68 se encontró como componente principal γ -sitosterol (clionasterol).

La fracción polar y mayoritaria F85-90 contiene polifenoles. Al realizar una segunda CC del extracto CHS se obtuvo un precipitado en las fracciones 117-129 con perfil similar a la fracción F85-90 y al precipitado amarillo obtenido en el extracto MeOH, por lo que la muestra fue denominada *p*CHS. El extracto MeOH posee un perfil cromatográfico similar a *p*CHS. El análisis por UPLC-DAD-MS/MS del precipitado *p*CHS permitió detectar 3 picos, siendo uno de ellos el mayoritario (RT = 19.4 min) con peso molecular de 755.20 (C₃₃H₃₉O₂₀) y un espectro de absorbancia en UV característico de polifenoles (264 y 348 nm). Se emplearon diversas técnicas (CC-FN, CC-FR, tratamiento con carbón activado y CCF de tipo preparativa) para aislar e identificar los componentes de CHS; sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables debido a la complejidad de la muestra. Un siguiente proceso fue acetilar la muestra *p*CHS. Mediante esta reacción y después de un fraccionamiento por CC-FN se obtuvieron mezclas complejas de polifenoles acetilados. La fracción 24-44 (fracciones mayoritaria) fue sometida a CCF-FN preparativa y se obtuvieron 4 compuestos mayoritarios (A, R_f = 0.17; B, R_f=0.28; C, R_f= 0.43; D, R_f=0.56) con diferente grado de pureza; únicamente la banda B (8 mg) representó un compuesto casi puro que, al realizarle el análisis de RMN-¹H, mostró señales típicas para un glucoflavonoide del tipo de acacetina.⁹⁷ Este tipo de polifenoles son característicos de la familia *Cleomaceae*. Se han descrito glucoflavonoides llamados cleomesidos de las partes aéreas de *C. chelidonii*.⁷⁶

Por otro lado, con la finalidad de identificar los polifenoles del extracto MeOH, este fue acetilado, obteniendo un producto de reacción (1.67 g), que fue separado por CC-FN, identificando principalmente terpenos en las fracciones 5 a la 20; en las fracciones 32 a la 35, en mayor proporción, se identificó al octacetato de sucrosa y a partir de las fracciones 36 a la 56 se observó una mezcla compleja de polifenoles acetilados. La fracción secundaria 41-56 fue separada por CCF-FN, confirmando por RMN H¹ la presencia de un núcleo glucoflavonoide.

En el extracto MeOH y *p*CHS se detectó rutina. Este compuesto se ha reportado en el extracto EtOH de *Tarenaya spinosa* (*Cleome spinosa*), junto con apigenina y quercetina, así como ácido gálico,

catequina, ácido clorogénico, ácido cafeico, *p*-ácido cumárico. Además, se observan otras posibles señales en RMN-¹H, como azúcares, terpenos, flavonoides, cumarinas y alcaloides.⁹⁸

Dado el alto contenido de glucoflavonoides en el extracto MeOH, este fue objeto de hidrólisis ácida, lo que permitió la obtención de una fase orgánica denominada *HMeOH*; en esta última muestra se detectó camferol, escopoletina, β -sitosterol y glucositol, pero en estas condiciones la hidrólisis del extracto MeOH no fue completa. La presencia de camferol y escopoletina en *HMeOH* se confirmó por HPLC al comparar su TR con estándares comerciales. Dado que las condiciones de hidrólisis anteriores no fueron las recomendables, se modificó la temperatura y tiempo y se obtuvo la muestra, *HMeOH-2* y *HCHS* a partir del extracto MeOH y CHS, respectivamente. En estos productos de hidrólisis se identificó quercetina, β -sitosterol, ácido *p*-cumárico, escopoletina y camferol. Por análisis en HPLC se confirmó la presencia de camferol y escopoletina en *HMeOH-2*. En la fase acuosa de la reacción de hidrólisis se detectaron azúcares como destroxa, fructuosa y sacarosa. Estos resultados se correlacionan con lo reportado por Nguyen *et al.* (2017)⁷⁷, quienes reportaron principalmente glicósidos de flavona en el extracto MeOH de las partes aéreas de *Cleome chelidonii*. Por diferentes técnicas cromatográficas se obtuvieron glucósidos de flavonol, derivados esterificados de 3,7-O-diglicósidos de quercetina o caempferol. La parte glucosídica fue idéntica en los compuestos aislados y las configuraciones de los azúcares fueron obtenidos a partir de hidrólisis ácida y comparación con D-glucosa y ramnosa. Algunos compuestos identificados fueron quercetina 3-O- β -D-glucopiranosil-(1/2)- α -L-ramnopiranosil-7-O-(2-acetil)- α -L-ramnopiranosido (cleomesido D) y quercetina 3-O- β -D-glucopiranosil-(1/2)- α -L-ramnopiranosil-7-O-(2,4-diacetil)- α -L-ramnopiranosido (cleomesido E).⁷⁶ Por otro lado, Sharaf *et al.* (1997)⁹⁹ describieron que *Cleome droserifolia*, *C. amplyocarpa*, *C. brachycarpa* y *C. chrysantha* contienen glucósidos de flavonoide y, por hidrólisis ácida, se logró identificar camferol-ramnosa y quercetina-ramnosa o glucosa con glucosilación en la posición 7, así como glucósidos de flavanoles y flavonoides metilados.⁹⁹ Kasem y Fathy, 2016⁹¹ describieron que en los extractos EtOH y MeOH de las especies *Gynandropsis gynandra* (*Cleome gynandra*), *Corynandra viscosa* (*Cleome viscosa*), *Cleome paradoxa*, *Cleome scopasa* y *Cleome brachycarpa* contienen flavonoides, principalmente del tipo de quercetina y camferol. Por medio de HPLC, identificaron quercetina 7-ramnósido, quercetina-3-glucósido, camferol-3-O-glucósido, camferol 3-rutinósido presente en todas las especies y quercetina 3-rutinósido y camferol 3-glucósido-7-ramnósido solo se encuentran en *C. gynandra*, *C. viscosa*, *C. scopasa* y quercetina 7-rutinósido y quercetina 7-ramnósido se reportó para *C. gynandra*, *C. viscosa* y *C. paradoxa*. Quercetina 3,7-diramnósido solo está presente en *C. gynandra* y *C. viscosa* y

quercetina 3-glucósido-7-ramnósido en *C. viscosa* y *C. brachycarpa*, el camferol 3-ramnósido-7-glucósido en *C. viscosa*, *C. paradoxa* y *C. scopasa*, y el camferol 3-ramnósido-7-glucósido en *C. viscosa* y en *C. scopasa*. La presencia de estos polifenoles junto con la presencia de isoenzimas se considera útil como marcadores quimiotaxonómicos para establecer relaciones entre especies dentro de la familia *Cleomaceae*.

Además, en el extracto CHS, MeOH y *p*CHS se observaron azúcares y aa por CCF-FN, por lo que estos extractos fueron fraccionados por CC empacada con SP207; con este proceso se logró obtener tres grupos de compuestos: azúcares, aa (Amz) y polifenoles (*r*CHS). La fracción Amz, que contiene azúcares y aminoácidos fue mayoritaria y la fracción *r*CHS fue minoritaria. Los principales aa detectados en Amz fueron alanina, metionina, histidina y glicina, y mostró un perfil de aa similar al de las bebidas energizantes Red Bull® (arginina y taurina), Boost Energy®L (cafeína, taurina y ácido pantoténico) y la proteína vegana Birdman® (contiene alanina, arginina, ácido aspártico, etc); los principales azúcares detectados fueron la sacarosa, dextrosa y otros. La presencia de sacarosa se confirmó al obtenerlo como derivado acetilado del extracto MeOH acetilado. Uno de los glucoflavonoides detectados en la fracción rica en polifenoles (*p*CHS o *r*CHS) fue la rutina, al comparar su Rf con el de un estándar comercial; la rutina, al ser hidrolizada genera quercetina; esta aglicona fue detectada como un compuesto mayoritario en *H*MeOH-2 y *H*CSH. Estos hallazgos concuerdan con lo previamente reportado para algunas especies de la familia *Cleomaceae*. En este sentido, podemos mencionar que las semillas y hojas biosintetizan principalmente proteínas y lípidos, por lo que se les considera como nutracéuticos en comunidades de África y la India.¹⁰⁰

Las semillas y hojas de *Gynandropsis gynandra* contienen un perfil de aa comparable a las semillas oleaginosas y de leguminosas (haba de soja y maní). En la harina desengrasada de cuatro ecotipos de semillas de *G. gynandra* colectada de Zambia, África, se determinó la presencia de aa, siendo los más abundantes el ácido glutámico, arginina y ácido aspártico; en menor medida están presentes leucina, valina, glicina, prolina, fenilalanina, isoleucina, treonina, alanina, serina, lisina, tirosina e histidina. Los ácidos grasos más abundantes fueron oleico y linoleico, entre otros.¹⁰¹ Por otro lado, la harina desengrasada de las semillas de *Corynandra viscosa* contiene proteínas, vitaminas y minerales, y algunos aa como isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano, valina, arginina, histidina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, prolina y serina; con un perfil de aa similar al maní y contiene tioglucosinolatos como tiocapparina y tiocleomina.¹⁰² Estudios recientes indican que *Cleome brachycarpa*, empleada en la medicina

tradicional en varias regiones de Pakistan, tienen valor nutracéutico por su alto contenido fenólico.¹⁰³

Es posible que otros de los componentes polares presentes en el extracto MeOH de *C. serrata* sean los glucosinolatos, como glucocaparina y glucocleomina; estos compuestos han sido reportados para *Cleome chelidonii*, *C. viscosa* y *Tarenaya espinosa* (*Cleome spinosa*) y solo glucocaparina para *Gynandropsis gynandra*.¹⁰⁴

Respecto al efecto antioxidante se observó que el extracto MeOH (rico en glucoflavonoides, aminoácidos, azúcares y otros componentes polares) de las partes aéreas de *C. serrata* ($CI_{50} = 5842.63 \mu\text{g/mL}$) y el precipitado *p*CHS ($CI_{50} = 3736.53 \mu\text{g/mL}$) mostraron mejor efecto antioxidante que el extracto original (CHS, $CI_{50} = 10597.80 \mu\text{g/mL}$), pero este efecto antioxidante fue escaso respecto al control quercetina ($CI_{50} = 92.135 \mu\text{g/mL}$). Por el contrario, el producto de hidrólisis *H*MeOH mostró mejor efecto antioxidante ($CI_{50} = 2338.05 \mu\text{g/mL}$). El escaso efecto antioxidante de los extractos MeOH, CHS y *p*CHS quizás se debe a que contienen una mezcla compleja de polifenoles, los cuales son principalmente glucósidos de flavonoide, junto con azúcares y aa. Sin embargo, al realizar la hidrólisis ácida de estas muestras fue posible obtener la mezcla de camferol escopoletina, β -sitosterol y quercetina, principalmente. Es bien conocido que las agliconas (camferol y quercetina) tienen mayor efecto antioxidante; debido a que tienen grupos hidroxilo libres en su núcleo, lo que permite capturar radicales libres como el DPPH.⁸⁹ Nguyen *et al.* (2017)⁷⁷ reportaron que los glucósidos de flavona (cleomesidos) obtenidos de *Cleome chelidonii* poseen menor efecto antioxidante (captadora de radicales por DPPH) que su respectiva aglicona quercetina ($CI_{50} = 2.1 \mu\text{M}$), con una CI_{50} entre 14.7 a 49.7. El único glucósido de camferol aislado ($CI_{50} = 104.3 \mu\text{M}$) fue el menos activo. El autor sugiere que los glucosidos de flavonoide, al ser administrado por vía oral, se hidrolizan y degradan en el tracto digestivo permitiendo que puedan absorberse fácilmente, lo que favorece su efecto antioxidante *in vivo*. En el presente trabajo se observó que el producto de hidrólisis *H*MeOH ($CI_{50} = 2338 \mu\text{g/mL}$) de *C. serrata* mejoró su efecto antioxidante respecto al extracto MeOH o CHS ($CI_{50} = 10597.80 \mu\text{g/mL}$).⁷⁷ Cabe señalar que es la primera vez que se describe el efecto antioxidante para la especie medicinal *C. serrata*.

En un siguiente paso, se prepararon los extractos Hex, CH_2Cl_2 y MeOH por maceración sin y con agitación, cuyos rendimientos totales fueron bajos, siendo de 8.13 % y 4.84 %, respectivamente. Como se puede observar, el rendimiento fue mucho menor al del extracto original CHS (31.6 %). El extracto Hex presentó similitud con las fracciones primarias no polares del extracto CHS de las hojas de *C. serrata*; el extracto CH_2Cl_2 fue similar a las fracciones de polaridades intermedias y el extracto

MeOH mostró similitud con *p*CHS, que contiene glucoflavonoides, aa y azúcares. En los extractos Hex y CH₂Cl₂ se detectó por análisis de CG-EM la presencia de γ -sitosterol, vitamina E, éster etílico del ácido 9,12-octadecadienoico, palmitato de etilo, ácido palmítico y estigmasterol; estos compuestos mayoritarios fueron detectados previamente en las fracciones primarias de CHS. Estos compuestos no han sido reportados para esta especie. Ambos extractos resultaron sin efecto antioxidante (Cl₅₀ > 5 mg/mL).

En la fracción secundaria XV-a del extracto Hex de *C. serrata* se identificó, β -amirina, acetato de lupeol, acetato de β -amirina, estigmastan-3,5-dieno, y en las fracciones secundarias XV-b y XV-c se identificó β -sitosterol, y algunos ácidos grasos como el palmitato de etilo y ácido palmítico en la fracción XV-d. A la fecha se ha descrito que en las fracciones de Hex y AcOEt del extracto MeOH de la especie *Cleome paradoxasa* contiene α -amirina, estigmasterol y sitgmasterol-3-O- β -D glucopiranosido, además de quercetin-3-O- β -D-glucopiranosido (isoquercetrina). En las semillas de *C. viscosa*, *C. chelidonii*, *C. gynandra*, *C. speciosa* y *C. simplicifolia* se describió la presencia de ácidos octadecadienoico y hexadecanoico por análisis de CG-EM. *C. viscosa* presentó 49.66% del ácido hexadecanoico (en mezcla de ésteres etílico y metílico) y 48.85% del éster etílico de ácido hexadecanoico en *C. simplicifolia*; *C. chelidonii*, 21.08% y *C. gynandra*, 24.57% y en *C. speciosa* 24.59%. En el aceite esencial de estas especies (excepto *Cleome viscosa*) se encontró (Z,Z) ácido 9,12-octadecadienoico como principal ácido graso en varias formas de éster (metil-etil éster, 2 hidroxil-1-(hidroximetil) etil éster, metil éster y etil éster) y en aceite de semilla de *C. viscosa* se encontraron derivados de ácido octanoico.¹⁰⁵

Efecto antiinflamatorio de *C. serrata*

Respecto al efecto antiinflamatorio, los extractos CHS, CH₂Cl₂ y MeOH, al ser administrados por vía oral en el modelo de carragenina, mostraron más del 34.49 % de inhibición del edema a las 5 hrs a partir de 50 mg/kg; sin embargo, el efecto no fue dosis dependiente. En cambio, el extracto Hex y *p*CHS mostraron un efecto dosis dependiente con DE₅₀=131.46 y 64.89 mg/kg, respectivamente. Todas las muestras resultaron con efecto antiinflamatorio, siendo *p*CHS (contiene glucoflavonoides, azúcares y aa, principalmente) el que mostró mejor efecto en este modelo; Se infiere que todos los compuestos que biosintetiza la especie *C. serrata* contribuyen a este efecto biológico.

Además, la mayoría de las fracciones primarias del extracto CHS de las hojas de *C. serrata* [F47-54 (39.85%), F62-68 (50.92%), F85-90 (40.60%) y F104-107 (59.44%)], probadas a una dosis de 150 mg/kg vía i.g., presentaron mayor efecto antiinflamatorio que el extracto CHS en el modelo de carragenina. El resto de las fracciones probadas presentó efecto entre un rango de 10.85 a 26% de

inhibición; estos resultados confirman que casi todos los compuestos presentes en CHS son responsables del efecto antiinflamatorio sistémica. Cabe destacar que los compuestos mayoritarios detectados en estas fracciones son γ y β -sitosterol, vitamina E, éster etílico del ácido linoleico, palmitato de etilo, ácido palmítico, fitol, estigmasterol y acetato de lupeol. En la literatura se ha descrito que muchos de estos compuestos tienen efecto antiinflamatorio, como el fitol.¹⁰⁶ el cual, a 75 mg/kg, inhibe 51.8 % la inflamación al ser administrado por vía i.p. en el modelo de carragenina a las 4 h; en un modelo de peritonitis, al ser administrado por vía i.p a la misma dosis, redujo los niveles leucocitarios, TNF- α e IL-1. El acetato de lupeol en el modelo de TPA, administrado por vía tópica, mostró una DE₅₀ de 1.76 mg/oreja, mejor que la referencia INDO= 0.91 mg/oreja. En el modelo de carragenina administrado por vía intragástrica a dosis de 100 y 150 mg/kg mostró el 37.5 a 37.7 % de inhibición del edema plantar a las 5 hrs.⁵³

Por otro lado, HMeOH (mezcla de agliconas obtenida por hidrólisis ácida del extracto MeOH y CHS) mostró un 51.99 % de inhibición a las 5 hrs y a la dosis más baja (25 mg/kg), siendo mejor este efecto que el fármaco de referencia (INDO); cabe destacar que la inhibición de la inflamación se observó desde la primera hora (28.29 %) y se mantuvo hasta las 7 hrs. A las dosis de 100 mg/kg inhibió en menor porcentaje y el efecto se mantuvo hasta las 24 h (22.76 %). El efecto no fue dosis dependiente. Dentro de las agliconas detectadas por HPLC y/o CCF en HMeOH están el camferol, quercetina, ácido *p*-cumárico, escopoletina y β -sitosterol; estos compuestos pueden ser los responsables del efecto antiinflamatorio que muestra HMeOH. Se ha reportado que la quercetina-3-O-(2''-acetil)-glicósido (aislado de *C. viscosa*) a dosis de 100 y 200 mg/kg, administrados por vía i.p., tienen efecto antiinflamatorio del 51.7 y 45% a las 3 hrs.⁷²

En el ensayo de edema auricular inducido con TPA, el extracto CH₂Cl₂ y *p*CHS mostraron un efecto dosis dependiente, con una DE₅₀ = 0.79 y 0.47 mg/oreja, respectivamente; ambas muestras resultaron más activas que el fármaco de referencia (INDO, 60.39 % de inhibición). También los extractos MeOH y Hex y la muestra HMeOH resultaron muy activos (> 38.64 de inhibición) a las dosis ensayadas (0.5, 1 y 2 mg/oreja), pero sin efecto dosis dependiente. Además, casi todas las fracciones primarias del extracto CHS de las hojas de *C. serrata* resultaron más activas que el extracto original, siendo los porcentajes de inhibición entre 15.28 hasta 88.70% a la dosis de 2 mg/oreja; las fracciones que resultaron más activas que el extracto original CHS e INDO (63 y 60.39%, respectivamente, a 2 mg/oreja) fueron F14, F15-16 F62-68; en estas fracciones se detectó como compuestos mayoritarios al palmitato de etilo, fitol, γ -sitosterol y por CCF-FN se detectó β -sitosterol. Estos mismos compuestos liposolubles fueron detectados en el extracto Hex y CH₂Cl₂ en diferente cantidad, junto

con ácido palmítico y vitamina E, entre otros constituyentes, los cuales pueden ser los responsables del efecto antiinflamatorio tópico que mostraron los extractos liposolubles. Uno de los componentes químicos presentes en los extractos y fracciones poco polares es el fitol. Este compuesto a una dosis de 75 mg/kg inhibió la inflamación en modelos de edema plantar, inducido por diferentes agentes flogísticos como carragenina, el compuesto 48/80, histamina, bradicinina y PGE₂. En el modelo de carragenina, el fitol a una dosis de 75 mg/kg vía i.p. mostró un efecto inhibitorio máximo del 51.8% a las 4 hrs; en el modelo de edema inducido por el compuesto 48/80 inhibió el 64.8% el tamaño del edema; histamina (64.4%), bradicinina (74.3% y PGE₂ (56.6%).¹⁰³ Además, en un modelo de peritonitis inducido por carragenina, el fitol a 75 mg/kg administrado por vía i.p. inhibió la migración celular y disminuyó la producción de TNF- α e IL-1 β en exudados peritoneales a las 4 hrs después de la inyección del estímulo.¹⁰³

El extracto hexánico de la especie *C. serrata* contiene principalmente ácidos grasos en su mayoría parecidos al ácido hexadecanoico. En un estudio de cinética enzimática se encontró que este ácido inhibe la fosfolipasa A (2) de manera competitiva, ocupando el sitio activo de PLA2 y evitando la unión del sustrato; esta enzima está involucrada en el paso inicial en la formación de potentes mediadores inflamatorios, validando el uso de aceites medicinales ricos en ácido n-hexadecanoico para el tratamiento de síntomas reumáticos de manera tópica.¹⁰⁷

La especie *C. serrata* también contiene vitamina E y el fitol. Estos compuestos suprimieron ligeramente el crecimiento de células al ser administrados por vía i.p. (0.19 μ mol/ratón/día) en ratones Balb/C singénicos con tumor inducido por células de fibrosarcoma Meth A. Las especies del género *C. serrata* podrían ser de utilidad en el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer.

108

La muestra *p*CHS resultó ser una mezcla compleja de glucoflavonoides (entre estos esta la rutina), polifenoles (ácido clorogénico, ácido *p*-cumárico), azúcares y aminoácidos, entre otros. Es bien conocido que la rutina, el ácido clorogénico y ácido *p*-cumárico tienen efecto antiinflamatorio en el modelo de carragenina. Se ha reportado que la rutina administrada por vía intramuscular a una dosis de 100 mg/kg en el modelo de edema plantar inducido por carragenina después de 6 hrs inhibió el 29.94% el edema; además, las concentraciones terapéuticas eficaces fueron mantenidas hasta 24 hrs después de su administración.¹⁰⁹

Esta mezcla compleja de polifenoles está presente en pequeñas cantidades en los extractos MeOH y CHS. Además, estos extractos (CHS y MeOH) y *p*CHS contienen una mezcla de azúcares y aminoácidos. Dada la complejidad del extracto MeOH, este fue sometido a una reacción de

acetilación y de hidrólisis ácida. En el producto de hidrólisis (*HMeOH*) se obtuvo camferol, quercetina, escopoletina, ácido *p*-cumárico y β -sitosterol. Estos compuestos pueden ser los responsables del efecto antiinflamatorio tópico que mostró *HMeOH*.

Se ha descrito que la escopoletina reduce el tamaño del edema en un 16.7, 34.6 y 59.6% a dosis de 50, 100 y 200 mg/kg, respectivamente, al ser administrada por vía i.p., 30 min antes del aceite de crotón.¹¹⁰ Además, se ha descrito que los flavonoides (flavanona, naringenina, apigenina, quercetina), que son 5,7-dihidroxi-flavonoles que tienen grupo (s) hidroxilo en el anillo B y biocanina A (isoflavona) poseen efecto antiinflamatorio *in vivo* del 14 al 52% de inhibición del edema auricular inducido por aceite de crotón en una dosis de 2 mg/oreja.¹¹¹ Con el fin de separar la mezcla compleja de flavonoides glicosilados, azúcares y aminoácidos de los extractos MeOH, CHS y *p*CHS, estos fueron fraccionados por CC/SP, lo cual permitió obtener dos fracciones (*r*CHS y Amz). *r*CHS es rica en glucoflavonoides y Amz contiene azúcares y aminoácidos; ambas fueron evaluadas en los modelos de carragenina y TPA. Al ser administrado por vía oral en el modelo de carragenina, *r*CHS fue moderadamente activo, inhibiendo el proceso inflamatorio en un rango de 21.84 al 34.28%, sin efecto dosis dependiente y la muestra Amz (mezcla de azúcares y aa) resultó con escaso efecto antiinflamatorio (< 17.09 % de inhibición). En el modelo de TPA, al ser administrados por vía tópica, la muestra *r*CHS mostró buen efecto antiinflamatorio con 63.63% de inhibición, siendo más activo que el fármaco de referencia, en cambio la muestras Amz resultó con mínima efecto antiinflamatorio (< 9.09% de inhibición).

En general se observó que *C. serrata* contiene esteroides, ácidos grasos, azúcares y aminoácidos y polifenoles, entre otros glucoflavonoides. Todos estos compuestos pueden ser los responsables del efecto antiinflamatorio observado en los diferentes extractos orgánicos. Cabe señalar que el contenido de polifenoles en MeOH y CHS fue bajo. En el extracto MeOH separado por SP-207 se obtuvo 0.835 mg de polifenoles (rendimiento del 9.18%). Mientras que de azúcares y aminoácidos contuvo 2.41 g (27.13%). Algunos estudios realizados en plantas medicinales, como en *Bejaria resinosa Mutis ex L.* (pegamosco) se encontró que la mezcla de α y β -amirina, germanicol y quercetina tiene mejor efecto antiinflamatorio que el extracto original, en el modelo de TPA; los triterpenos pentacíclicos y flavonoides podrían modular la síntesis de prostaglandinas, ya que son inhibidores de COX y lipoxigenasa.¹¹²

Es importante mencionar que todos los extractos de la especie *C. serrata* mostraron una $DL_{50} > 2$ g/kg y > 5 g/kg y existen escasos reportes sobre la toxicidad aguda para estas especies de la familia *Cleomaceae*. Para *C. viscosa* y *G. gynandra*, que son empleadas como hortalizas en Benin, se reporta

una DL₅₀ >200 mg/k para el extracto MeOH.¹¹³ Elufioye *et al.* (2015)¹¹⁴ reportaron que el extracto MeOH tiene una DL₅₀ > 5 g/kg al ser administrado por vía i.g.

Los resultados de la presente investigación contribuyen al conocimiento del potencial químico y biológico de la especie medicinal *C. serrata*, la cual contienen constituyentes químicos que inhiben el proceso inflamatorio agudo, tanto al ser administrada por vía intragástrica como tópica. Cabe señalar que este es el primer reporte que describe este perfil químico, el efecto antiinflamatorio y su efecto antioxidante. Los extractos liposolubles (Hex y CH₂Cl₂) tienen mayor efecto antiinflamatorio por vía tópica y la muestra rica en polifenoles (rCHS) mostró mayor efecto antiinflamatorio por vía sistémica. Es de resaltar que el hidrolizado de MeOH, (que contiene la mezcla de agliconas) exhibieron mejor efecto antiinflamatorio sistémica y tópica. Por último, se evaluó el potencial antiinflamatorio del extracto CHS en un modelo de inflamación crónica inducido por AFC a 28 días. Este extracto se evaluó a 150 mg/kg y 300 mg/kg administrado por vía i.g. a partir del día 7 al 27. La dosis mayor mostró inhibición de la inflamación los días 17 y 19 con 35.06 y 34.33%, respectivamente; en cambio, la dosis de 150 mg/kg mostró mayor efecto antiinflamatorio desde el día 7 al 27, con mayor efecto antiinflamatorio en los días 13 y 19 con el 40.69% y 39.72%; este efecto fue similar al fármaco antiinflamatorio FBZ 100 mg/kg en los días 17 y 19 con el 33.77 y 29.84 % respectivamente. En trabajos previos se ha descrito que la FBZ (100 mg/kg, i.g) en el modelo de AFC (día 7 al 28) tiene efecto antiinflamatorio entre los días 15 y 28 del ensayo. Juárez-Vázquez *et al.* (2020)⁵³ observaron el 31.58, 40.15 y 42.94% de inhibición en los días 15, 21 y 28, respectivamente, en el mismo modelo. Gutiérrez-Rebolledo *et al.* (2018)⁵¹ describieron que la FBZ a la misma dosis tiene efecto antiinflamatorio a partir del día 14 hasta el 28, con una inhibición > 34%. Cabe señalar que algunas especies de la familia *Cleomaceae* se caracterizan por su efecto antiinflamatorio en modelos de inflamación crónica. El extracto EtOH de *Cleome rutidosperma* mostró efecto antiinflamatorio en el modelo de AFC, al ser administrado por 30 días. En este ensayo, el extracto a 400 mg/kg redujo el tamaño del edema con 0.48 mL; el efecto del extracto fue menor con respecto al fármaco de referencia diclofenaco (12.5 mg/kg) con 0.41 mL.⁶⁴ El extracto EtOH al 95% de las hojas de *Gynandropsis gynandra* (*Cleome gynandra*) a 150 mg/kg administrado por vía i.g. durante 30 días en ratas mostró un efecto antiinflamatorio; el volumen del edema disminuyó a partir de la tercera semana de tratamiento con mayor efecto en la cuarta semana.⁶⁷

En este estudio se observó que los animales tratados con el extracto CHS tuvieron una ganancia de peso corporal a partir del día 19 hasta el final del experimento, mientras que los animales tratados con FBZ tuvieron pérdida de peso corporal del día 7 al 27. Los animales tratados con AFC

también tuvieron pérdida de peso corporal durante todo el experimento. Algunos autores describen que la pérdida de peso es un parámetro indirecto de estados patológicos en enfermedades crónicas como AR, diabetes y cáncer. Se ha descrito que en el modelo de inflamación crónica generada por AFC existe poca o nula ganancia de peso corporal debido a la pérdida de masa muscular (caquexia), hiperalgesia y alodinia.^{115,116} El proceso inflamatorio podría regular la pérdida de peso, las citocinas inflamatorias, como el TNF- α , inhiben la actividad del neuropéptido Y, lo que afecta la regulación del apetito, provocando un efecto anorexigénico.¹¹⁷ La ganancia de peso corporal que genera el extracto CHS se puede deber a su efecto antiinflamatorio, aunado a que el extracto CSH de la especie *C. serrata* contiene glucoflavonoides, azúcares (sacarosa, principalmente), aminoácidos como fenilalanina, alanina y un perfil similar a bebidas energizantes como Boost® (taurina) y Red Bull®, que contienen taurina, L-carnitina, cafeína y glucoronolactona. Algunas especies que pertenecen a la familia *Cleomaceae* se consumen en África como condimento, estofado o guarnición por sus propiedades nutricionales, ya que contiene vitamina A y C, minerales (calcio), ácidos grasos y aminoácidos.¹⁰¹

Además, el extracto CHS a 150 mg/kg redujo el tamaño de los ganglios en forma similar a FBZ (0.27 vs 0.28 g) y también redujo el peso del hígado, bazo corazón y riñones, cuyo peso es similar al control sano. El peso de estos órganos incrementó en el grupo que recibió AFC (grupo I). Juárez-Vázquez *et al.* (2020)⁵² y Gutiérrez-Rebolledo *et al.* (2018)⁵¹ describieron que el AFC generó hiperplasia en los ganglios poplíteo de ratones macho Balb/C, el cual se caracteriza por infiltrado leucocitario, incremento en la población de células CD3+, CD4+ y CD8+ y aumento de los niveles de COX-2. Se observó en cortes histológicos del hígado de ratones macho Balb/C escasa hematopoyesis y microabcesos y los animales tratados con FBZ 100 mg/kg tuvieron una ligera esteatosis hepática

El AFC indujo cambios histológicos en diferentes órganos; por ejemplo se ha descrito microabsecos en el hígado de ratones y la FBZ (100 mg/kg) indujo esteatosis.⁵¹ Las inyecciones repetidas de AFC generaron granulomas y aumento de células de Kupffer en el hígado;¹¹⁸ también incremento de TNF- α , estrés oxidante y aumento de GSH y lípidos oxidados en hígado.¹¹⁹ Otro órgano afectado es el corazón; el AFC favorece miocarditis (acumulación de monocitos y granulocitos) por el proceso inflamatorio; por lo que el AFC es empleado en modelos animales para inducir miocarditis experimental autoinmune.¹²⁰

La DL₅₀ de los extractos CHS, MeOH, Hex, CH₂Cl₂ fue > 2 g/kg administrado por vía i.g. en ratones macho Balb/C; a la fecha no existe este tipo de investigación para esta especie medicinal.

En la literatura existen pocos estudios sobre la toxicidad para la familia *Cleomeceae*. Por ejemplo, el extracto MeOH de *Cleomaceae viscosa* (*Corynandra viscosa*) mostró una $DL_{50} > 5000$ mg/kg; no causó decesos en 24 h y no indujo diferencia significativa sobre el peso relativo de corazón, pulmón, riñones y bazo excepto en el peso del hígado. Este extracto, a las dosis de 10, 1000, 2900 y 5000 mg/kg provocaron un incremento de 0.88, 0.89, 1.77 y 1.41 g, respectivamente, siendo estos pesos diferentes al control (1.06 g). Se observó degeneración de los hepatocitos en todas las dosis probadas, así como congestión cortical renal leve, especialmente en dosis altas. Este extracto lo reportan como seguro para el consumo, aunque los autores mencionan que el órgano más afectado por la administración del extracto fue el hígado. Esta especie medicinal es empleada para el tratamiento de inflamaciones, enfermedades del hígado, bronquitis y diarrea; además, se emplea como alimento y en rituales mágico-religiosos por algunos grupos étnicos de Benin, África occidental.¹⁰⁹ Está bien documentado que algunas sustancias, fármacos y extractos de plantas medicinales pueden ocasionar hepatitis, esteatosis, fibrosis, necrosis y/o hepatocarcinoma, debido a que el hígado realiza la biotransformación de xenobióticos y mediante este proceso se generan sustancias más reactivas que puede aumentar el riesgo de lesión hepática.¹²¹ En la medicina tradicional China, la lesión hepática en humanos es causada principalmente por alcaloides de pirrolizidina, aunado al período de administración. Por esto es importante la identificación de los constituyentes químicos presentes en las plantas medicinales y determinar su toxicidad *in vivo*, para con ello documentar sobre la eficacia y seguridad para su consumo en el tratamiento de algún padecimiento.

12. CONCLUSIONES GENERALES.

- El extracto CHS (CH_2Cl_2 :EtOH 1:1) se obtuvo con mejor rendimiento y contiene ácidos grasos, esteroides, triterpenos y polifenoles, siendo los principales constituyentes ácido palmítico, fitol, acetato de lupeol, ácido clorogénico, rutina y otros glucoflavonoides (entre ellos un derivado de acacetina), aminoácidos (como fenilalanina, alanina, metionina, entre otros) y azúcares (principalmente sacarosa) y con perfil de aa similar a las bebidas energizantes Boots y Red Bull.
- Este extracto CHS (CH_2Cl_2 :EtOH 1:1) y las fracciones primarias de este extracto mostraron importante efecto antiinflamatorio tópico y moderado efecto antiinflamatorio sistémico. Los extractos Hex, CH_2Cl_2 y MeOH se obtuvieron con menor rendimiento y presentaron perfil químico similar al extracto CHS y a las fracciones primarias de este. Los extractos CH_2Cl_2 y MeOH mostraron importante (> 40% de inhibición) efecto antiinflamatorio sistémico y los tres

extractos (Hex, CH₂Cl₂ y MeOH) resultaron más activos en el modelo de inflamación tópica. Estos extractos presentaron pobre efecto antioxidante.

- Del extracto CHS (CH₂Cl₂:EtOH 1:1) y MeOH se obtuvo el precipitado *p*CHS que contiene rutina entre otros glucoflavonoides; además contiene aminoácidos y azúcares. Un glucoflavonoide fue aislado de *p*CHS, es del tipo de acetina con P.M. de 755.20 y presenta bandas de absorción en UV típicas (264 y 348 nm) para este tipo de compuesto. En el espectro de RMN H¹ se observan señales para el núcleo flavonoide (camferol o quercetina) y señales para azúcares. Sin embargo, con estos datos no se puede establecer la estructura química. Este precipitado mostró una DE₅₀ (0.47 mg/oreja) superior que el control positivo en el modelo de inflamación tópica (2 mg/oreja) y en el modelo de carragenina (inflamación sistémica) fue 3.6 veces menos activo que el control positivo, siendo la DE₅₀ = 64.89 mg/kg vs 18 mg/kg. Además, presentó escaso efecto antioxidante.
- Dado el contenido de glucoflavonoides presentes en los extractos CHS (CH₂Cl₂:EtOH 1:1) y MeOH, estos fueron hidrolizados en medio ácido. Las principales agliconas detectadas en la fase orgánica *H*MeOH fueron quercetina, camferol, β-sitosterol, glucositosterol, escopoletina, ácido *p*-cumárico. En la fase acuosa se detectaron azúcares (destroxa, fructuosa y sacarosa). *H*MeOH presentó mejor efecto antioxidante que los extractos originales y respecto efecto antiinflamatorio se encontró que en el modelo de carragenina fue activo desde la primera hora hasta la séptima hora a la dosis de 25 mg/kg, y el efecto antiinflamatorio se mantuvo hasta las 24 hrs a la dosis de 100 mg/kg. En el modelo de TPA (inflamación tópica) presentó un efecto similar al fármaco de referencia a la dosis de 2 mg/oreja.
- La separación de azúcares, aminoácidos y glucoflavonoides presentes en los extractos CHS (CH₂Cl₂:EtOH 1:1) y MEOH se realizó a través de una CC empacada con S-207. Mediante este proceso se obtuvo *r*CHS (mezcla de glucoflavonoides, como la rutina) cuyo rendimiento fue muy bajo y Amz (mezcla de azúcares y aminoácidos) con mayor rendimiento. *r*CHS presentó mejor efecto antiinflamatorio sistémico que el extracto MeOH a dosis bajas y por vía tópica a 2 mg/oreja presentó mejor efecto que indometacina. *Amz* no mostró efecto antiinflamatoria en ambos modelos.
- Se establecieron las condiciones analíticas por HPLC para la separación de los glucoflavonoides presentes en *r*CHS.

- El extracto CHS (CH₂Cl₂:EtOH 1:1) a dosis de 150 mg/kg disminuyó la inflamación a partir del día 17 y favoreció la ganancia de peso de los animales en el modelo de inflamación crónica inducido con AFC a 28 días.
- La DL₅₀ fue de > 2 g/kg < 5 g/kg (categoria 5 de la GHS) para los cuatro extractos.

12.1. CONCLUSIÓN.

En este trabajo se informa por primera vez la especie *C. serrata* (*Cleomaceae*) tiene efecto antiinflamatorio en modelos agudos y crónico de inflamación *in vivo* y que este efecto se debe principalmente en su conjunto con componentes tipo, glucósidos de flavonoides, terpenos y ácidos grasos. Se encontró que la especie tiene potencial nutricional por su alto contenido en aminoácidos y azúcares. Otro de los componentes mayoritarios encontrados fueron los glucósidos de flavona, sin embargo, al estar contenidos en la planta como una mezcla compleja con azúcares y aminoácidos fueron difíciles de separar. En este trabajo se emplearon técnicas como acetilación, CC empacada con S-207 y HPC las son necesarias seguir modificando para permitir una fácil separación e identificación de estos componentes. Los glucósidos de flavona son abundantes en especies que pertenecen a la familia *Cleomaceae* y el género *Cleoserrata*. La identificación de metabolitos secundarios junto con las técnicas anatómicas, fisiológicas, filogenéticas, podrían ayudar a mejorar la identificación botánica de las especies dentro de esta familia, que actualmente está siendo reconocida taxonómicamente. Se ha demostrado que los glucósidos de flavonoides, terpenos entre otros componentes están presentes en otras especies del género *Cleoserrata* y se pueda prestar atención al potencial antiinflamatorio de la familia *Cleomaceae* y genero *Cleoserrata* en México. Por otro lado, el poca o nulo efecto antioxidante de la especie se debe al alto contenido de glucósidos de la especie, sin embargo, no se deben descartar realizar algunas otras pruebas que avalen esta información.

13. PERSPECTIVAS

- La especie *C. serrata* contiene principalmente una mezcla de glucosidos de flavonoides, entre ellos la rutina, que se pueden separar por medio de HPLC e identificarlos, así como cuantificarlos. Además, contiene azúcares y aminoácidos, los cuales debe ser cuantificados.
- *C. serrata* contiene compuestos liposolubles con buen efecto antiinflamatorio tópico que deben ser cuantificados y sometidos a evaluación en el mismo modelo (TPA) a dosis repetidas. Además, obtener un extracto estandarizado con base a este tipo de constituyentes y validar su eficacia y seguridad. Evaluar la toxicidade subaguda y crónica de los extractos más activos.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ashley N.T., Weil Z. M., Nelson R.J., 2012, Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43:385-406.
2. Mittal M., Siddiqui M.R., Tran K., Reddy S.P., Malik A.B., 2014, Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury, *Antioxidants & Redox Signaling*, 20:1126-1167.
3. Laskin, D. L., Sunil, V. R., Gardner, C. R., & Laskin, J. D., 2011, Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 51:267-288.
4. Filippin L.I., Vercelino R., Marroni N.P, Xavier R.M., 2008, Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis, *Clinical and Experimental Immunology*, 152: 415-422.
5. Popovici I., Rezuş E., Mancaş G., 2001, Antioxidant enzyme levels in reactive arthritis and rheumatoid polyarthritis, *The Journal of Preventive Medicine*, 9: 38-42.
6. Rathore B., Ali Mahdi A., Nath Paul B., Narayan Saxena P., Kumar Das S., 2006, Rheumatoid arthritis: a chronic inflammatory disease, *The Journal of Physiology*, 7:1-7.
7. Laria A., Lurati A., Marrazza M., Mazzocchi D., Re K.A., Scarpellini M., 2016, The macrophages in rheumatic diseases, *Journal of Inflammation Research*, 9: 1-11.
8. Burman A., Haworth O., Bradfield P., Parsonage G., Filer A., Thomas A.M.C, *et al.*, 2005, The role of leukocyte-stromal interactions in chronic inflammatory joint disease, *Joint Bone Spine*, 72:10-16.
9. Ling-dong Q., Geoffrey M.T., Jun T, Dong W., 2008, The development of novel therapies for rheumatoid arthritis, *Expert Opinion Therapeutic Patents*, 18: 723-738.
10. Soeken K.L., Miller S.A, Ernst E., 2003, Herbal medicines for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review, *Rheumatology (Oxford)*, 42:652-659.
11. Juárez-Vázquez MdelC., Jiménez-Arellanes M. A., 2019, Phytochemical investigation, anti-inflammatory and antinociceptive activities from some species of *Cleomaceae* family: A systematic review, *Advancement in Medicinal Plant Research*, 7:107-128.
12. Gómez-Álvarez R., 2012, Medicinal plants in a small village in the state of Tabasco, México, *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35:43-49.
13. Alamilla-Fonseca L.N., Delgado-Domínguez J., Zamora-Chimal J., Cervantes-Sarabia R.B., Jiménez-Arellanes A., Rivero-Cruz J.F., *et al.*, 2018, *Leishmania mexicana* cell death achieved by *C. serrata* (Jacq.) Iltis: Learning from Maya healers, *Journal Ethnopharmacology*, 211:180-187.
14. Caballero-George C., Gupta M., 2011, A quarter century of pharmacognostic research on panamanian flora: a review, *Planta Medica*, 7:1189-1202.

15. PUNCHARD N.A., WHELAN C.J., ADCOCK I., 2004, The Journal of Inflammation, *Journal of Inflammation-London*, 1:1-4.
16. Schett G., Neurath M.F., 2018, Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts, *Nature Communications*, 9:1-8.
17. Pahwa R., Goyal A., Bansal P., Jialal I., 2020, Chronic Inflammation, En: StatPearls [Internet]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>.
18. León Regal M.L., Borges A.A., de Armas García J.O., Miranda Alvarado L., Cedeño J.A.V., del Sol J.Á.C., 2015, Respuesta inflamatoria aguda, Consideraciones bioquímicas y celulares, *Revista de Enfermedades no Transmisibles Finlay*, 5:47-62.
19. Commins S.P., Borish L., Steinke J.W., 2010, Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125:S53-S72.
20. Abdulkhaleq LA., Assi M.A., Abdullah R., Zamri-Saad M., Taufiq-Yap Y.H., Hezmee M.N.M., 2018, The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review, *Veterinary World*, 11: 627.
21. Makar K.W., Poole E.M., Resler A.J., Seufert B., Curtin K., Kleinstein S.E., *et al.*, 2013, COX-1 (PTGS1) and COX-2 (PTGS2) polymorphisms, NSAID interactions, and risk of colon and rectal cancers in two independent populations, *Cancer Causes & Control*, 24:2059-2075.
22. Arulsevan P., Fard M.T., Tan W.S., Gothai S., Fakurazi S., Norhaizan M. E., *et al.*, 2016, Role of antioxidants and natural products in inflammation, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016: 5276130.
23. Kato Y. 2016, Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation, *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 58:99-104.
24. Xue Q., Yan Y., Zhang R., Xiong H., 2018, Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 19:3805.
25. Salaffi F., Di Carlo M., Carotti M., Farah S., Ciapetti A., Gutierrez M., 2019, The impact of different rheumatic diseases on health-related quality of life: a comparison with a selected sample of healthy individuals using SF-36 questionnaire, EQ-5D and SF-6D utility values, *Acta Bio-medica: Atenei Parmensis*, 89:541-557.
26. Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009, Evaluación de Riesgos Considerados en el Programa de Administración de Riesgos Institucionales. [consultado 08 agosto 2020]. Disponible en: <https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/pdf/estadisticas/PARI/parievaluacion2009.pdf>.

27. Peláez-Ballestas I., Sanin L.H., Moreno-Montoya J., Álvarez-Nemegyei J., BurgosVargas R., Garza-Elizondo M., *et al.*, 2011, Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico, A study of 5 regions based on the COPCORD methodology, *The Journal of Rheumatology Supplement*, 86:3-8.
28. Massardo L., Pons-Estel B.A., Wojdyla D., Cardiel M.H., Galarza-Maldonado C.M., Sacnun M.P., *et al.*, 2012, Early rheumatoid arthritis in Latin America: low socioeconomic status related to high disease activity at baseline, *Arthritis Care Research (Hoboken)*, 64:1135-1143.
29. Mould-Quevedo J., Peláez-Ballestas I., Vázquez-Mellado J., Terán-Estrada L., Esquivel-Valerio J., Ventura-Ríos, L., *et al.*, 2008, El costo de las principales enfermedades reumáticas inflamatorias desde la perspectiva del paciente en México, *Gaceta Médica de México*, 144:225-231.
30. Murphy L.B., Cisternas M.G., Pasta D.J., Helmick C.G., Yelin E.H., 2018, Medical expenditures and earnings losses among US adults with arthritis in 2013, *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 70:869-876.
31. Prasad S., Sung B., Aggarwal B.B., 2012, Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation, *Preventive Medicine*, 54: S29-S37.
32. Xu B., Lin J. 2017, Characteristics and risk factors of rheumatoid arthritis in the United States: an NHANES analysis, *Peer Journals*, 5, e4035.
33. Lizarzaburu Robles J.C., 2013, Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica, *Anales de la Facultad de Medicina*, 74:315-320.
34. Organización Mundial de la Salud. [consultado 08 agosto 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
35. Ellulu M.S., Patimah I., Khaza'ai H., Rahmat A., Abed Y., 2017, Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications, *Archives of Medical Science: AMS*, 13:851-863.
36. Crofford L.J., 2013, Use of NSAIDs in treating patients with arthritis, *Arthritis Research & Therapy*, 15:S2.
37. Aguilar A., Ascitelli A., Carosella L., Izurieta M., Perandonos M., Soverchia S. *et al.*, 2015, Prevalencia de automedicación de antiinflamatorios y analgésicos en la práctica ambulatoria, *Revista Argentina de Reumatología*, 26:13-15.
38. Navarrete-Mejía P.J., Velasco-Guerrero J.C., Loro-Chero L., 2020, Automedicación en época de pandemia: Covid-19, *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 13:350-355.
39. Moore N., Carleton B., Blin P., Bosco-Levy P., Droz, C., 2020, Does ibuprofen worsen COVID-19? *Drug Safety*, 43:611-614.

40. Quincho-Lopez A., Benites-Ibarra C.A., Hilario-Gomez M.M., Quijano-Escate, R., Taype-Rondan, A., 2021, Self-medication practices to prevent or manage COVID-19: A systematic review. *PloS one*, 16:e0259317.
41. Qureshi O, Dua A. COX Inhibitors. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021.
42. Lee K., Lee S.H., Kim T.H., 2020, The biology of prostaglandins and their role as a target for allergic airway disease therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 21:1851.
43. Ronchetti S., Migliorati G., Bruscoli S., Riccardi C., 2018, Defining the role of glucocorticoids in inflammation, *Clinical Science*, 132:1529-1543.
44. Ordóñez S.G., Álvarez Á.M.G., Plata, E.L.V., 2007, Corticoides: 60 años después, una asignatura pendiente, *Revista Ciencias de la Salud*, 5:58-69.
45. Benjamin O., Bansal P., Goyal, A., Lappin S.L., 2018, Disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARD). In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL); 2021.
46. Pastick K.A., Okafor E.C., Wang F., Lofgren S.M., Skipper C.P., Nicol M.R., *et al.*, 2020, Hydroxychloroquine and chloroquine for treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19), *Open Forum Infectious Disease*, 7:ofaa130.
47. Welz A.N., Emberger-Klein A., Menrad K., 2018, Why people use herbal medicine: insights from a focus-group study in Germany, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18: 92.
48. Loera J.A., Black S.A., Markides K.S., Espino D.V., Goodwin J.S., 2001, The use of herbal medicine by older Mexican Americans, *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56:M714-M718.
49. Koparde A.A., Doijad R.C., Magdum C.S., 2019. Natural Products in Drug Discovery. In S. Perveen, & A. Al-Taweel (Eds.), *Pharmacognosy - Medicinal Plants*. IntechOpen.
50. Gutiérrez-Rebolledo G.A., Garduño-Siciliano L., García-Rodríguez R.V., Pérez-González M.Z., Chávez M.I., Bah M., *et al.*, 2016, Anti-inflammatory and toxicological evaluation of *Moussonia deppeana* (Schldl. & Cham) Hanst and Verbascoside as a main active metabolite, *Journal of Ethnopharmacology*, 187:269-280.
51. Gutiérrez-Rebolledo G.A., Garduño-Siciliano L., Chávez-Rueda A.K., Siordia-Reyes A.G., Zamilpa A., Jiménez-Arellanes M.A., 2018, *In vivo* anti-arthritic and antioxidant effects from the standardized ethanolic extract of *Moussonia deppeana*, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28:198-206.
52. Jimenez-Arellanes M.A., Carrasco-Gamboa A., Zambrano-Vazquez O. R., Meckes-Fischer M., Hernandez-Portilla L.B., Zamilpa A., 2018, Phytochemistry of *Cnidocolus tehuacanensis* Breckon

(*Euphorbiaceae*), an endemic Mexican plant with potential therapeutic benefits, *American Journal of Ethnomedicine*, 5:1-9.

53. Juárez-Vázquez MdelC., Siordia-Reyes G.A., Pérez-González M.Z., Chávez-Rueda K.A., Legorreta-Haquet M.V., Nieto-Meneses R., 2020, Leishmanicidal and anti-inflammatory activities of Lupeol Acetate isolated from *Cnidocolus tehuacanensis* Breckon, *Medicinal & Aromatic Plants* (Los Angeles), 9: 2167-0412.

54. Pérez-González M.Z., Gutiérrez-Rebolledo G.A., Yépez-Mulia L., Rojas-Tomé I.S., Luna-Herrera J., Jiménez-Arellanes M.A., 2017, Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidocolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 89, 89-97.

55. Pérez-González M.Z., Siordia-Reyes A.G., Damián-Nava P., Hernández-Ortega S., Macías-Rubalcava M.L., Jiménez-Arellanes M.A., 2018, Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of the *Cnidocolus chayamansa* (Mc Vaugh) leaf extract in chronic models, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018: 3896517.

56. García-Rodríguez R.V., Cevallos G.C., Siordia G., Jiménez-Arellanes M.A., Chávez-Soto M.A., Meckes-Fischer M., 2012, *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11:468-477.

57. Romero-Cerecero O., Meckes-Fischer M., Zamilpa A., Jiménez-Ferrer J.E., Nicasio-Torres P., Pérez-García D., Tortoriello J., 2013, Clinical trial for evaluating the effectiveness and tolerability of topical *Sphaeralcea angustifolia* treatment in hand osteoarthritis, *Journal of Ethnopharmacology*, 147:467-473.

58. Garrido G., González D., Lemus Y., Garcia D., Lodeiro L., Quintero G., *et al.*, 2004, *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG®), *Pharmacological Research*, 50:143-149.

59. Valverde S., Duarte E.M., Ducangé D., Garrido G., García-Rivera D., Jáuregui U., *et al.*, 2009, Utilidad de las formulaciones Vimang® en pacientes con osteoartrosis de rodilla, *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 16: 32-41.

60. Medeiros, R., Passos, G. F., Vitor, C. E., Koepf, J., Mazzuco, T. L., Pianowski, L. F., *et al.*, 2007, Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw, *British Journal of Pharmacology*, 151:618-627.

61. Perini J.A., Angeli-Gamba T., Alessandra-Perini J., Ferreira L.C., Nasciutti L.E., Machado D.E., 2015, Topical application of Aceflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study, *BMC complementary and Alternative Medicine*, 15:1-8.
62. Quintão N.L.M., Ferreira J., Beirith A., Campos M.M., Calixto J.B., 2008, Evaluation of the effects of the herbal product Catuama® in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats, *Phytomedicine*, 15:245-252.
63. Albarello N., Simotilde C., De Castro T.C., Gayer C.R.M., Coelho M.G.P., De Moura R.S., Mansur E., 2013, Anti-inflammatory and antinociceptive activity of field-growth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice, *Journal of Medicinal Plants Research*, 7:1043-1049.
64. Bose A., Mondal S., Gupta J.K., Ghosh T., Dash G.K., Si S., 2007, Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*, *Fitoterapia*, 78:515-520.
65. Parimalakrishnan S., Dey A., Smith A.A., Manavalan R., 2007, Evaluation of antiinflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of methanol extract of *Cleome chelidonii*, *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1:223-228.
66. Sowunmi L.I., Afolayan A.J., 2015, Phytochemical constituents and antioxidant properties of acetone extract of *Cleome gynandra* (L.) growing in the Eastern Cape, South Africa, *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 12:1-8.
67. Narendhirakannan R.T., Subramanian S., Kandaswamy M., 2007, Anti-inflammatory and lysosomal stability actions of *Cleome gynandra* L. studied in adjuvant induced arthritic rats, *Food and Chemical Toxicology*, 45:1001-1012.
68. Singh H., Ali S.S., Khan N.A., Mishra A., Mishra A.K., 2017, Wound healing potential of *Cleome viscosa* Linn. seeds extract and isolation of active constituent, *South African Journal of Botany*, 112:460-465.
69. Fushiya S., Kishi Y., Hattori K., Batkhuu J., Takano F., Singab A.N., Okuyama T., 1999, Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages *in vitro*, *Planta Medica*, 65:404-407.
70. Bawankule D.U., Chattopadhyay S.K., Pal A., Saxena K., Yadav S., Faridi U., Darokar M.P., Gupta A.K., Khanuja S.P., 2008, Modulation of inflammatory mediators by coumarinolignoids from *Cleome viscosa* in female swiss albino mice, *Inflammopharmacology*, 16:1-6.

71. Saratha V., Subramanian S.P., 2012, Lupeol, a triterpenoid isolated from *Calotropis gigantea* latex ameliorates the primary and secondary complications of FCA induced adjuvant disease in experimental rats, *Inflammopharmacology*, 20:27-37.
72. Senthamilselvi M.M., Kesavan D. and Sulochana N., 2012, Anti-inflammatory and anti-microbial flavone glycoside from flowers of *Cleome viscosa*, *Organic and Medicinal Chemistry Letters* 2:19:1-5.
73. Qin G.W., Hamed A.I., El-Emary N.A., Chen Y.G., Wang L.Q., Cheung K.K., *et al.*, 2000, A new trinortriterpenoid from *Cleome chrysantha*, *Planta Medica*, 66:191-193.
74. Abdel-Moein N.M., Abdel-Moniem E.A., Mohamed D.A., Hanfy E.A., 2011, Evaluation of the anti-inflammatory and anti-arthritic effects of some plant extracts, *Grasas y Aceites*, 62:365-374.
75. Sajjadi S.E., Ghanadian M., Aghaei M., Salehi A., 2018, Two new dammarane triterpenes isolated from *Cleome khorassanica* Bunge & Bien with cytotoxicity against DU-145 and LNCaP prostate cancer cell lines, *Journal of Asian Natural Products Research*, 2018: 1-9.
76. Rahman S.M., Munira S., Hossain M.A., 2008, Phytochemical study of the aerial parts of *Cleome rutidosperma* DC plant, *Indonesian Journal of Chemistry*, 8:459-462.
77. Nguyen P.D., Sayagh C., Borie N., Lavaud C., 2017, Anti-radical flavonol glycosides from the aerial parts of *Cleome chelidonii* Lf, *Phytochemistry*, 142:30-37.
78. Harraz F.M., Ulubelen A., Öksüz S., Tan N., 1995, Dammarane triterpenes from *Cleome amblyocarpa*, *Phytochemistry*, 39:175-178.
79. Nagaya H., Tobita Y., Nagae T., Itokawa H., Takeya K., Halim A.F., *et al.*, 1997, Cytotoxic triterpenes from *Cleome africana*, *Phytochemistry*, 44:1115-1119.
80. Ismail I.S., Ito H., Selloum L., Hammama B., Yoshida T., 2005, Constituents of *Cleome arabica* leaves and twigs, *Journal of Natural Medicines*, 59:53.
81. Ray A.B., Chattopadhyay S.K., Kumar S., Konno C., Kiso Y., Hikino H., 1985, Structures of cleomiscosins, coumarinolignoids of *Cleome viscosa* seeds, *Tetrahedron*, 41:209-214.
82. Kumar S., Ray A.B., Konno C., Oshima Y., Hikino H., 1998, Cleomiscosin D, A coumarino-lignan from seeds of *Cleome viscosa*, *Phytochemistry*, 27:636-638.
83. Neto R.L.S., de Vasconcellos Barbosa M.R., Roalson E.H., 2017, *Cleoserrata* (Cleomaceae): taxonomic considerations and a new spp., *Phytotaxa*, 324:179-186.
84. Cochrane T.S., Iltis H.H., 2014, Studies in the Cleomaceae VII: Five New Combinations in *Corynandra*, an Earlier Name for *Arivela*. *Novon A Journal for Botanical Nomenclature*, 23:21-26.

85. McNeil M.J., Porter R.B.R., Williams L.A. D., 2012, Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from Jamaican *Cleome serrata*, *Natural Product Communications*, 7:1-2.
86. Miliuskas G., Venskutonis P.R., Van Beek T.A., 2004, Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, *Food Chemistry*, 85:231-237.
87. Alam A., Naik K.K., Upadhaya N.K., Kumar S., Dhar K.L., 2017, Simple, efficient and economical methods for isolation and estimation of novel isoflavone using RP-HPLC, *MethodsX*, 4:128-133.
88. Harborne J.B., 1989. Methods in Plant Biochemistry. In: Dey, P.M. and Harborne, J.B., Eds., *Plant Phenolics*, Academic Press, London, 283-323.
89. DeepaShree C.L., Gopal S., 2014, Evaluation of *Cleome gynandra* for Its Chemical Composition, Antioxidant Potential and Detection of Flavonoids Using Thin Layer Chromatography, *International Journal Scientific Research*, 3:58-60.
90. Romani A., Baldi A., Tattini M., Vincieri F.F., 1994, Extraction, purification procedures and HPLC-RI analysis of carbohydrates in olive (*Olea europaea* L.) plants, *Chromatographia*, 39:35-39
91. Kasem W.T., Fatahy S., 2016, Flavonoids and isoenzymes as chemotaxonomic markers in *Cleome* L. (*Cleomaceae* Bercht. & J. Presl), *Current Botany*, 7: 11-16.
92. Sinhababu A., 2013, Modified ninhydrin reagent for the detection of amino acids on TLC plates, *Journal of Applied and Natural Science*, 5:125-127.
93. Qureshi, M. N., Stecher, G., & Bonn, G. K. (2014). Quality control of herbs: Determination of amino acids in *Althaea officinalis*, *Matricaria chamomilla* and *Taraxacum officinale*, *Pak. J. Pharm. Sci*, 27:459-462.
94. Radwan H.M., Shams K.A., Tawfik W.A., Soliman A.M., 2008, Investigation of the glucosinolates and lipids constituents of *Cakile maritima* (Scope) growing in Egypt and their biological activity, *Research Journal of Medical Sciences*, 3:182-187.
95. Guriya R., Moon A., Talreja K., 2015, Phytochemical profiling and characterization of bioactive compounds from *Brassica oleracea*, *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7: 825-831.
96. Ladhari A., Haouala R., DellaGreca M., 2014, A new dammarane triterpene from *Cleome arabica*, *Chemistry of Natural Compounds*, 50: 684-686.
97. Granja Pérez P.E., Gamboa Angulo M.M., Escalante Erosa F., Peña Rodríguez L.M., 1999, Identification of Kaempferol 3-OaL-rhamnoside as a biotransformation product of *Alternaria tagetica*, *Journal of the Mexican Chemical Society*, 43:188-191.

98. Bezerra J.W.A., Coronel C., Gómez M.C.V., Rolón M., Nunez C.V., da Silva, D. R. et al. 2019, Evaluation of antiparasitary, cytotoxic and antioxidant activity and chemical analysis of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. (*Cleomaceae*), *South African Journal of Botany*, 124:546-555.
99. Sharaf M., El-Ansari M.A., Saleh N.A., 1997, Flavonoids of four *Cleome* and three *Capparis* species, *Biochemical Systematics and Ecology*, 25:161-166.
100. Van den Heever E., Venter S.L., 2006, Nutritional and medicinal properties of *Cleome gynandra*, *Acta Horticulturae*, 752:127-130.
101. Mnzava, N.A., 1990, Studies on tropical vegetables. Part 2: Amino and fatty acid composition in seed of *Cleome (Gynandropsis gynandra* L. Briq) selections from Zambia, *Food Chemistry*, 35: 287-293.
102. Rukmini C., Deosthale, Y.G., 1979, Nutritive value of defatted seed cake of *Cleome viscosa*, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56: 503-505.
103. Saleem T., Sumra A., Khan S., Zain M., Hassan W., Mehdi S., et al., 2020, A Green Nutraceutical Study of Antioxidants Extraction in *Cleome brachycarpa*, *An Ethnomedicinal Plant, Sains Malaysiana*, 49:1915-1924.
104. Songsak T., Lockwood G.B., 2002, Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand, *Fitoterapia*, 73:209-216.
105. Aparadh V.T., Karadge B.A., 2010, Fatty acid composition of seed oil from some *Cleome species*, *Pharmacognosy Journal*, 2: 324-327.
106. Silva R.O., Sousa F.B.M., Damasceno S.R., Carvalho N.S., Silva V.G., Oliveira F.R.M., et al., 2014, Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress, *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 28:455-464.
107. Aparna V., Dileep K.V., Mandal P.K., Karthe P., Sadasivan C., Haridas M., 2012, Anti-inflammatory property of n-hexadecanoic acid: structural evidence and kinetic assessment. *Chemical Biology & Drug Design*, 80:434-439.
108. Tomita Y., 1983, Immunological role of vitamin A and its related substances in prevention of cancer, *Nutrition and Cancer*, 5:187-194.
109. Modi F.D., Bhavsar S.K., Patel, J.H., Varia R.D., Modi L C., Modi M., Kale N., 2019, Pharmacokinetic profile of rutin after intramuscular administration in rats favours its in vivo anti-inflammatory activity in carrageenan-induced rodent model of inflammation, *Annals of Phytomedicine*, 8: 185-192.

- 110.** Ding Z., Dai Y., Hao H., Pan R., Yao X., Wang, Z., 2008, Anti-inflammatory effects of scopoletin and underlying mechanisms, *Pharmaceutical Biology*, 46:854-860.
- 111.** Kim, H. K., Namgoong, S. Y., & Kim, H. P., 1993, Antiinflammatory activity of flavonoids: Mouse ear edema inhibition, *Archives of Pharmacol Research*, 16:18-24.
- 112.** Matulevich Peláez J.A., Gil Archila E., Ospina Giraldo L.F., 2016, Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de hojas, flores y frutos de *Bejaria resinosa Mutis ex L.* (Pegamosco), *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21:332-345.
- 113.** Ahouansinkpo E., Atanasso J., Dansi A., Adjatin A., Orobiyi A., Sanni, A., 2016, Ethnobotany, phytochemical screening and toxicity risk of *Cleome gynandra* and *Cleome viscosa*, two traditional leafy vegetables consumed in Benin, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5:813-829.
- 114.** Elufioye T.O., Onoja J.O., 2015, Acute toxicity and histopathological assessment of methanol extract of *Cleome viscosa* (Linn.) whole plant., *Journal of Medicinal Plants Research*, 9: 360-369.
- 115.** Pan T., Cheng T., Jia Y., Li P., Li F., 2017, Anti-rheumatoid arthritis effects of traditional Chinese herb couple in adjuvant-induced arthritis in rat, *Journal of Ethnopharmacology*, 205:1-7.
- 116.** Fang J.F., Liang Y., Du J.Y., Fang J.Q., 2013, Transcutaneous electrical nerve stimulation attenuates CFA-induced hyperalgesia and inhibits spinal ERK1/2-COX-2 pathway activation in rats, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:134.
- 117.** Taksande B.G., Gawande D.Y., Chopde C.T., Umekar M.J., Kotagale N.R., 2017, Agmatine ameliorates adjuvant induced arthritis and inflammatory cachexia in rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86:271-278.
- 118.** Lundquist, A., 1968, Adjuvant-induced liver disease in mice-transfer experiments, *Experientia*, 24:1266-1266.
- 119.** Pohanka, M., Vobornikova, I., & Fusek, J., 2016, Freund's complete adjuvant effect on Balb/C mice: an insight into inflammation and oxidative stress after immunity challenge, *Bratislavské Lekárske Listy*, 117:268-271.
- 120.** Fontes, J.A., Barin, J.G., Talor, M.V., Stickel, N., Schaub, J., Rose, N. R., Čiháková, D., 2017, Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response, *Immunity Inflammation and Disease*, 5:163-176.
- 121.** Teschke, R., & Eickhoff, A., 2015, Herbal hepatotoxicity in traditional and modern medicine: actual key issues and new encouraging steps, *Frontiers in Pharmacology*, 6:72.

ANEXOS

Anexo 1

Efecto antiinflamatorio del extracto CHS de *C. serrata* sobre el edema plantar (mm) en ratones macho Balb/c de inflamación crónica.

Grupo	Tratamiento	Edema plantar mm								
		Día 7	Día 9	Día 11	Día 13	Día 15	Día 17	Día 19	Día 21	Día 23
I	Control ^{bcd} e	0.04±0.00 bcde	0.14±0.00 bcde	0.13±0.00 bcde	0.23±0.02 bcde	0.15±0.02 bcde	0.17±0.01 bcde	0.18±0.01 bcde	0.15±0.01 bcde	0.18±0.01 bcde
II	AFC ^{acde}	0.99±0.03 ade■●◇○	1.17±0.02 acde◇○	1.10±0.05 ade◇○	1.20±0.05 acde●◇○	1.38±0.08 acde■●◇	1.62±0.05 acde■○	1.58±0.05 acde■●	1.31±0.06 acde◇○	1.11±0.01 acd○
III	AFC+FBZ 100 mg/kg ^{abde}	0.88±0.06 a○	0.95±0.02 abd	0.99±0.05 a	0.92±0.05 abd	1.19±0.04 abd■●	1.07±0.06 ab	1.11±0.03 abd	1.10±0.04 abd	0.93±0.01 acde
IV	AFC+CHS 150 mg/kg ^{abce}	0.74±0.03 ab◇○	0.75±0.04 abc◇○	0.87±0.03 ab◇	0.71±0.02 abc◇○	1.00±0.04 abce■●	1.10±0.06 ab■●	0.95±0.01 abc■●	0.91±0.02 abc●◇	0.77±0.01 abce◇○
V	AFC+CHS 300 mg/kg ^{abcd}	0.77±0.05 ab◇○	0.85±0.02 ab◇	0.86±0.03 ab◇	0.84±0.02 ab◇○	1.16±0.09 abd■	1.05±0.08 ab■	1.04±0.08 ab	1.03±0.06 ab	0.95±0.01 acd■

Los datos son expresados como la media ± error estándar de la media (EEM). Los tratamientos fueron administrados a partir del día 7 al 27. Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$) ^avs comparado con Grupo I, ^bvs Grupo II, ^cvs Grupo III, ^dvs Grupo IV, ^evs Grupo V; ■vs día 9, ●vs día 13, ◇vs día 17, ○vs día 19. AFC: adyuvante completo de Freund.

Anexo 2

Efecto antiinflamatorio del extracto CHS sobre el edema plantar (% de inhibición) en ratones macho Balb/C determinada por inflamación crónica.

Grupo	Porcentaje de inhibición del edema plantar									
	Día 7	Día 9	Día 11	Día 13	Día 15	Día 17	Día 19	Día 21	Día 23	Día 25
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	10.98%	19.00%	9.97%	22.75%	14.23%	33.77%	29.84%	15.88%	16.21%	8.23%
IV	24.89%	35.46%	21.44%	40.69%	27.40%	32.16%	39.72%	29.96%	30.68%	17.44%
V	21.82%	27%	22.13%	30.04%	16.38%	35.06%	34.33%	21.34%	14.37%	10.63%

Anexo 3

Efecto del extracto CHS de *C. serrata* sobre la ganancia de peso corporal (g) en ratones macho Balb/C tratados por vía oral con el modelo de inflamación crónica.

Grupo	Días								
	7	9	11	13	15	17	19	21	23
I ^{bcde}	0.48±0.23	0.55±0.26	0.64±0.33 Bcde	0.67±0.25 bcde	0.58±0.34 c	0.48±0.48 ce	0.36±0.32 c	0.42±0.24	0.35±0.36
II ^{ade}	0.0±0.16	0.09±0.11	0.08±0.10 A	-0.08±0.15 a	0.17±0.09	-0.02±0.09	-0.08±0.11	-0.16±0.08	0.02±0.17
III ^{ade}	0.16±0.01	0.05±0.08	-0.21±0.11 A	-0.26±0.01 a	-0.24±0.04 a	-0.45±0.03 a	-0.37±0.04 a	0.03±0.08	-0.08±0.08
IV ^{abce}	0.06±0.15	0.28±0.10	0.04±0.07 A	0.06±0.10 A	0.03±0.05	0.04±0.10	0.33±0.08	0.45±0.04	0.19±0.03
V ^{abc}	0.20±0.08	0.28±0.07	0.02±0.07 A	0.01±0.15 a	0.03±0.07	-0.15±0.16 a	-0.03±0.13	0.22±0.05	0.13±0.08

Media ± error estándar de la media (EEM). Los tratamientos fueron administrados por vía i.g diariamente a partir del día 7. Se realizó un ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc SNK ($p < 0.05$)^a vs comparado con el Grupo I; ^bvs Grupo II, ^cvs Grupo III, ^dvs Grupo IV, ^evs Grupo V; AFC: adyuvante de Freud completo; FBZ: Fenilbutazona, n=4. Grupos: control (I), AFC (II), AFC+FBZ 100 mg/kg (III), AFC+CHS 100 mg/kg (IV), AFC+CHS 300 mg/kg (V).

Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory Potential of the Organic Extracts from *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis.

María del Carmen Juárez-Vázquez^{1,2†}, Alejandro Zamilpa A³, Rosalba León-Díaz⁴, Mariano Martínez-Vázquez⁵, Adolfo López-Torres⁶, Julieta Luna-Herrera⁷, Lilian Yépez-Mulia⁸, Francisco Alarcón-Aguilar², María Adelina Jiménez-Arellanes^{1,*}

María del Carmen Juárez-Vázquez^{1,2†}, Alejandro Zamilpa A³, Rosalba León-Díaz⁴, Mariano Martínez-Vázquez⁵, Adolfo López-Torres⁶, Julieta Luna-Herrera⁷, Lilian Yépez-Mulia⁸, Francisco Alarcón-Aguilar², María Adelina Jiménez-Arellanes^{1,*}

¹Unidad de Investigación Médica (UIM) en Farmacología, UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores 06720, Ciudad de México (CdMx), MEXICO.

²Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlitxco 186, CdMx 09340, MEXICO.

³Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), IMSS, Argentina 1, Col. Centro 062790, Xochitléc, Morelos, MEXICO.

⁴Área de Biología y Salud Integral, Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Veracruzana, Luis Castelazo s/n. Col. Industrial Animas, Xalapa 91190, Veracruz, MEXICO.

⁵Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, CdMx, MEXICO.

⁶Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Circuito Central 12200, Col. Parque Industrial, Tuxtpec 68301, Oaxaca, MEXICO.

⁷Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, CdMx 11340, MEXICO.

⁸UIM en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, UMAE Hospital de Pediatría, CMN-SXXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores 06720, CdMx, MEXICO.

Correspondence

M.A. Jiménez-Arellanes

UIM en Farmacología, Hospital de Especialidades, CMN Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06720 Ciudad de México, MEXICO.

Phone no: (+52) (55) 5627 6900, ext. 21367;

E-mail: adelinajim08@prodigy.net.mx

History

- Submission Date: 17-05-2021
- Review completed: 21-06-2021;
- Accepted Date: 29-06-2021.

DOI : 10.5530/pj.2021.13.156

Article Available online

<http://www.phcogj.com/v13/i5>

Copyright

© 2021 Phcogj.Com. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



ABSTRACT

Cleoserrata serrata is used in Mexican-south traditional medicine to treat *chicleros ulcer*. The phytochemical profile and the anti-inflammatory effect from four extracts obtained by maceration process and of the primary fractions from two extracts are described. In addition, the antioxidant, leishmanicidal and antimycobacterial activities and LD₅₀ from active extracts are reported. Anti-inflammatory activity was evaluated in TPA and carrageenan assays. Ethyl palmitate and γ-sitosterol were detected in Hexanic and CH₂Cl₂ extracts. Same compounds and stigmasta-3,5-dien-7-one, palmitic acid, phytol acetate and phytol were detected in primary fractions from CH₂Cl₂:EtOH extract. In this and in MeOH extracts a polyphenol-mixture was obtained. The MeOH extract was subjected to acid hydrolysis, and kaempferol, quercetin and scopoletin were detected in organic-phase. Polyphenol-mixture and organic-phase (IC₅₀=3730 and 2338 µg/mL) showed moderate antioxidant activity; meanwhile MeOH extract exhibited scarce activity. In carrageenan model, Hexanic extract and polyphenol-mixture showed ED₅₀=131.46 and 64.89 mg/kg, respectively. Three extracts were active but not-dose-dependent. In TPA-model, CH₂Cl₂ extract and polyphenol-mixture showed ED₅₀<0.79 mg/ear, and three extracts were active, however the effect was not-dose-dependent. CH₂Cl₂:EtOH showed antimycobacterial and leishmanicidal activities. The LD₅₀ was >2 g/kg for all extracts.

Key words: *Cleoserrata serrata*, Anti-inflammatory effect, Organic extract, DL₅₀, Antioxidant activity, Leishmanicidal activity, Antimycobacterial activity.

INTRODUCTION

Cleoserrata serrata (Jacq.) Iltis. (Syn. *Cleome serrata* Jacq.) belongs to the family *Cleomaceae*; this specie was segregated from the *Cleome* genus and is an annual herb, mostly ruderal with ecological importance as a host plant for butterflies in Cuba.^{1,2} In Mexico is distributed in the states of Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tabasco and Veracruz, and also in Central America, northern of South America and in the Antilles.^{1,3-5} *Cleoserrata* genus includes five species: *C. serrata* (Jacq.) Iltis.; *C. speciosa* (Raf.) Iltis (Syn. *Cleome speciosa* Raf.); *C. bahiana* Iltis & M.B. Costa-e-Silva ex Soares Neto & Roalson; *C. paludosa* (Willd. ex Eichler) Iltis ex Soares Neto & Roalson and *C. melanosperma* (S.Wats.) Roalson & Soares Neto.^{1,5}

C. serrata is commonly known as “mastuerzo” or “zumkak”, and is used in the traditional medicine from Tabasco State, Mexico.⁶ In La Chontalpa and Cuauhuacan, Tabasco, the leaves are used as infusion or cataplasm to treat the skin lesion in patients with cutaneous leishmaniasis (caused by *Leishmania* spp) known as “chicleros ulcer”.⁷ It is also employed in southern and central regions in Mexico for skin infections.⁸ In addition, Amerindian groups (Kuna, Ngöbe-Buglé and Teribe) from Panama employ the whole plant in topical warm baths and the leaves for the treatment of snake bites.⁹ Recently, Alamilla-Fonseca et al.⁷ described leishmanicidal and antibacterial

activities for the dichloromethane:methanol (CH₂Cl₂:MeOH, 1:1) extract from *C. serrata* leaves. This extract showed mean lethal doses (LD₅₀) = 6.11 and 23.5 µg/mL against *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) amastigotes and promastigotes, respectively; this effect was dose-dependent. In the latter case, the author observed 60% inhibition at 100 µg/mL and 85% inhibition at 200 µg/mL. The CH₂Cl₂:MeOH extract at 10 µg/mL exhibited leishmanicidal activity on amastigotes after 4 days of culture and, at 100 µg/mL, also showed activity on promastigotes during the same time, being the most active against amastigotes. Finally, this extract was slightly active against *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) at 500 mg/disc and was positive for steroids, terpenoids, flavonoids and polyphenols test on the qualitative analysis. The essential oil obtained from *C. serrata* aerial parts contain (Z)-phytol (53.0%) as a main constituent and it compound showed moderate activity against *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* and *P. aeruginosa*, and was described as anti-inflammatory agent.^{10,11} At present, *C. serrata* has been scarcely investigated from chemical and biological point of view. Based in this background, in this paper we describe the phytochemistry profile of the organic extracts from *C. serrata* aerial parts, as well as their potential anti-inflammatory, antioxidant, antimycobacterial and leishmanicidal activities and their mean lethal dose (LD₅₀).

Cite this article: Juárez-Vázquez MdelC, Zamilpa A, León-Díaz R, Martínez-Vázquez M, López-Torres A, Luna-Herrera J, et al. Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory Potential of the Organic Extracts from *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis. Pharmacogn J. 2021;13(5): 1225-1241.

MATERIAL AND METHODS

General experimental procedures

Analytical Thin layer chromatography-Normal phase (TLC-NP) was carried out on silica gel (Si-gel) 60 F₂₅₄ sheets and the TLC-Reverse phase (TLC-RP) was performed on Si-gel 60 RP-18 F₂₅₄s pre-coated aluminum plates (0.2 mm, Merck). The TLC were sprayed with H₂SO₄ (10%) and heated for triterpenes and sterols detection, and polyphenols were detected with the Natural Product reagent (NPR, 1% MeOH diphenylboryloxyethylamine) and Polyethylene Glycol 4000 (PEG, 5% EtOH polyethylene glycol 4000) known as NPR/PEG; after that the TLC plates were observed under Ultra violet (UV) light at $\lambda=365$ nm.¹² The carbohydrates was detected by TLC-NP using n-butanol:ethyl acetate (EtOAc):acetic acid:H₂O (40:30:20:10) and by polyphenols detection was use H₂O:CH₃CN (7:3) in TLC-RP. The amino acids was detected by TLC-NP plate, using n-butanol:acetone:acetic acid:H₂O (35:35:10:20) as mobile phase and sprayed with ninhydrin reactive (30 mg of ninhydrin, 10 mL n-butanol and 0.3 mL acetic acid at 98%).

Open column chromatographic Normal phase (CC-NP) was carried out using Si-gel 60 GF₂₅₄ (0.063-0.200 mm, Merck Millipore) and was eluted with hexane (Hex), CHCl₃, MeOH (Mallinckrodt or J.T. Baker), and mixture of them with increasing of polarity.

The Gas chromatograph-coupled Mass spectra (GC-MS) analysis was performed on a gas chromatograph (Agilent Technologies 6890 N) coupled to a Jeol MS-GCMATE II mass spectrometer. The GC column used was HP5 (30 m of long x 0.32 mm in diameter), and the programmed temperature (temp) was 40-310° C with a heating rate of 8° C/min. The carrier gas was He (7psi, 1mL/min), while ionization of the components of the sample was carried out in the Electronic impact mode (EI, 70 eV). The NIST mass spectrum database was employed to identify the chemical constituents in each sample by comparison. The relative percentage of each constituent from each sample was expressed as a percentage with respect to the peak area with Retention time (Rt).

In addition, the MeOH extracts were analyzed by High Performance liquid chromatography (HPLC). This was conducted in Alliance 2695 separation module system (Waters, Milford, USA) coupled with a spectral system UV2996 PDA detector. The following analytical conditions were employed: SupelcosilTM LC-F column (5 μ m, 4.6 mm x 250 mm, Sigma Aldrich, USA) with gradient system, employing 0.5% Trifluoroacetic acid (eluent A) and CH₃CN (eluent B) with the following flow: 0 to 1 min, 100-0 % B; 2 to 3 min 95-5% B/A; 4 to 20 min, 70-30% B/A; 21 to 23 min, 50-50% B/A; 24 to 25 min, 20-80% B/A, 26 to 27 min, 0-100 % B/A, and 28 to 30 min, 100-0% B. The flow rate was 0.9 mL/min and the injection volume was 10 μ L. The peaks were detected at $\lambda=250$ and 320 nm.¹³ On the other hand, the *h*-MeOH (CHCl₃ phase obtained of the MeOH extract hydrolyzed) was analyzed by HPLC, carried out in Waters equipment (Waters, USA) comprising a 600 multisolvent delivery system with a 996-diode array detector. Equipment control, data acquisition, processing and management of the HPLC information were performed by Empower 3 software (Waters). The analytical column Phenomenex Luna[®] C18 (2) 100 Å, LC (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m) was utilized. The programmed temp was 40 °C, with a flow of 1 mL/min, and the injection volume was 10 μ L. The elution system in gradient mode was performed. The system was 0.1% acetic acid (eluent A), CH₃CN (eluent B), and MeOH (eluent C): 0 to 25 min, 50:25:25 % A/B/C; 25 to 32 min, 90:5:5 % A/B/C; and the UV detection was made at $\lambda=280-330$ nm. A polyphenols mixture (*p*CSH) was submitted to Ultra-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector-tandem Mass Spectrometry (UPLC-DAD-MS/MS) on chromatograph equipment (Acquity Arc, Waters). LUNA OMEGA C18 (150 mm, 2.1 mm, 1.6 μ m) column was utilized, and the programmed temp was 40 °C, with a flow of 0.18 mL/min. The elution

was performed in gradient mode employing the following: 0.1% formic acid (eluent A), CH₃CN (eluent B), and MeOH (eluent C), the system use was 0 to 25 min, 70:15:15 % A/B/C; 25 to 26 min, 50:25:25 % A/B/C; 27 to 40 min, 90:5:5 % A/B/C and the UV detection was carried out at $\lambda=330$ nm. The ESI-TOF detection was performed with a spectral window of 100-1000 m/z. All chemicals reactive solvents (analytical and HPLC grade) used in this study were analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich or J.T. Baker.

Plant material, extract preparation and chemical fractionation

The *C. serrata* aerial parts were collected in Comalcalco, Tabasco, Mexico in July 2017 and herbarium specimen was deposited at the Herbarium of the Instituto Mexicano del Seguro Social from Mexico (voucher IMSSM-16307). Additionally, more plant material was collected in August 2018 and the herbarium specimen was deposited in the Herbarium of Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM (FEZA) with voucher FEZA-17841 and was identified by Dr. Eloy Solano Camacho from FEZA, UNAM.

The aerial parts (550 g) were air-dried at room temp and ground. After that, this was extracted by the maceration process with CH₂Cl₂:EtOH (1:1) twice with occasional shaking at room temp. This extract (key CSH) was filtered and concentrated at 40°C in a vacuum system and was maintained at 25°C until its use. Another sample from plant material (429 g, dry and ground, collected in August of 2018) was extracted successively with Hex, CH₂Cl₂ and MeOH; each extract was macerated for a week at room temp, and was filtered, evaporated and was maintained at 25°C until its use. From the MeOH extract a precipitate (key: *p*MeOH) was obtained. The Hex, CH₂Cl₂ and MeOH extracts showed a similar profile to that CSH by TLC-NP and TLC-RP comparative analysis.

The CSH extract was subjected to HPLC analysis and 10 g of this extract was submitted to CC-NP on Si-gel (relation 1:20) and was eluted with Hex, EtOAc, and EtOH, and a mixture of these. This process led to obtaining 107 primary fractions of 500 mL each, these were grouped according to their chromatographic profile in TLC-NP or in TLC-RP and then were combined in 18 fraction groups as follows:

A (F7-13, 3.6 mg, Hex 100%), B (F14, 171.9 mg, Hex:EtOAc 97:3), C (F15-16, 116.3 mg, Hex:EtOAc 97:3), D (F17-24, 249.8 mg, Hex:EtOAc 97:3), E (F25-26, 15.5 mg, Hex:EtOAc 97:3), F (F27-28, 19.2 mg, Hex:EtOAc 97:3), G (F29-31, 47.7 mg, Hex:EtOAc 97:3), H (F32-40, 205.4 mg, Hex:EtOAc 97:3 and 9:1), I (F41-43, 329.7 mg, Hex:EtOAc 9:1), J (F44-46, 168.1 mg, Hex:EtOAc 9:1), K (F47-54, 492.8 mg, Hex:EtOAc 8:2), L (F55-61, 315.2 mg, Hex:EtOAc 7:3), M (F62-68, 389.3 mg, Hex:EtOAc 1:1), N (F69-84, 2214.6 mg, EtOAc and EtOAc:EtOH 75:25), Ñ (F85-90, 1878.1 mg, EtOAc:EtOH 75:25), O (F91-101, 1001.4 mg, EtOAc:EtOH 75:25 and 1:1), P (F102-103, 133.2 mg, EtOAc:EtOH 1:1) and Q (F104-107, 223.1 mg, EtOH).

The primary fractions B, C, G, K, M (low polarity fractions of CSH) and the Hex and CH₂Cl₂ extracts were submitted to GC-MS analysis. From the more polar fractions (N, O, P and Q) a precipitate with key *p*CSH was obtained. It was very similar to *p*MeOH in TLC-RP, the final key of these sample was *p*CSH. In this sample, a polyphenols mixture was detected as fluorescents bands under UV light ($\lambda=365$ nm) and as yellow-coloured zone when the plate was sprayed with NP/PEG [12]. The *p*CSH (5 mg/500 μ L) was passed through SPE microcolumns (500 mg, J.T. Baker Inc., Philipsburg, USA). It had been previously activated with CH₃CN 100 % (2 mL) and conditioned with CH₃CN 5%. Afterward, the sample was added, and then the microcolumn was eluted with CH₃CN 20%; this later sample was analysed by UPLC-DAD-MS/MS.

On the other hand, the MeOH extract (220.9 mg) was subjected to hydrolysis procedure using HCl 2N (15 mL) at $\approx 90^{\circ}\text{C}$ for 2 h. Subsequently, the reaction mixture was washed with CHCl_3 and this organic phase with key *h-MeOH* was analyzed by HPLC and TLC-NP. In the aqueous phase, carbohydrates were detected employing some sugar standard.

Finally, the Hex extract (15 g) was submitted to CC-NP on Si-gel (relation 1:20) and was eluted with Hex, CHCl_3 , and MeOH, and with a mixture of these; this process led to obtaining 122 primary fractions of 400 mL each one, which were grouped in 22 fraction groups according to their chromatographic profile:

I (F1-2, 59.80 mg, Hex 100%), II (F3-7, 77.1 mg, Hex100 %), III (F8-18, 10.90 mg, Hex 100%, Hex: CHCl_3 95:05), IV (F19-27, 6.40 mg, Hex: CHCl_3 95:05), V (F28-30, 78.5 mg, Hex: CHCl_3 9:1 and 8:2), VI (F31-35, 171 mg, Hex: CHCl_3 8:2), VII (F36-40, 124.30 mg, Hex: CHCl_3 8:2), VIII (F41-44, 113.60 mg, Hex: CHCl_3 8:2), IX (F45-53, 549.20 mg, Hex: CHCl_3 7:3), X (F54-56, 192.90 mg, Hex: CHCl_3 6:4), XI (F57-61, 53.50 mg, Hex: CHCl_3 6:4), XII (F62-65, 52.50 mg, Hex: CHCl_3 6:4), XIII (F66-68, 115.40 mg, Hex: CHCl_3 1:1), XIV (F69-71, 311.40 mg, Hex: CHCl_3 1:1), XV (F72-78, 1956 mg, Hex: CHCl_3 1:1), XVI (F79-94, 3838.2 mg, Hex: CHCl_3 4:6), XVII (F95-96, 400.50 mg, Hex: CHCl_3 2:8), XVIII (F97-99, 292.20 mg, Hex: CHCl_3 2:8), XIX (F100-107, 835.90 mg, CHCl_3 100%), XX (F108-113, 7220.90 mg, CHCl_3 :MeOH 8:2), XXI (F114-117, 180.50 mg, CHCl_3 :MeOH 1:1), XXII (F118-122, 104 mg, CHCl_3 :MeOH 3:7). Some primary fractions (III, V, VI, IX, XIII, XV, XVII, XIX, XX) were submitted to GC-MS analyses. In these primary fractions sterols and triterpenes were detected as a main constituent.

Primary fraction XV, eluted with Hex: CHCl_3 1:1 (1.71 g) was submitted to CC-NP on Si-gel (1:30) and was eluted with Hex, CHCl_3 , and MeOH, and mixture of these. This process led to obtaining 57 secondary fractions, which were grouped according to their chromatographic profile in TLC-NP and then were combined in 4 groups: XV-a (F1-31, 15 mg.), XV-b (F32-39, 317 mg), XV-c (F40-43, 559.7 mg), and XV-d (F44-57, 495.4 mg).

In vitro Antioxidant activity

Radical-scavenging activity was measured using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich D9132) as described by Brand-Williams et al. and Miliuskas et al.^{14,15} The CSH, Hex, CH_2Cl_2 , and MeOH extracts, *h-MeOH* (from hydrolyzed MeOH extract) and *pCSH* samples were evaluated from 500 to 5000 $\mu\text{g/mL}$, and quercetin (25-150 $\mu\text{g/mL}$) was employing as the standard control. IC_{50} was calculated from the standard calibration curve. The experiment was carried out twice.

In vitro antimycobacterial and leishmanicidal activities

The antimycobacterial assay was determined using the Microplate Alamar Blue assays (MABA) previously described,¹⁶ employing nine strains as follows: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), four strain of *M. tuberculosis* H37Rv mono-resistant [resistant to rifampicin (ATCC 35838), to isoniazid (ATCC 35822), to streptomycin (ATCC 35820) and to ethambutol (ATCC 35857)], four multidrug-resistant (MDR) clinical isolates of *M. tuberculosis* with resistance to first-line drugs (MMDO, MTY 137, SIN-4, SIN-6), and four non-tuberculosis Mycobacterium (*M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. abscessus*).

Leishmanicidal activity was determined using the assay previously described¹⁷ on the *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) promastigotes and amastigotes. Miltefosine and amphotericin B were used as reference drugs (100 to 0.8 mg/mL). All assays were carried out in triplicate. Also, the cytotoxicity of sample was determined using murine macrophage cell line J774.2 (ATCC TIB-67), and the Selectivity

index (SI) was determined. The sample was dissolved in DMSO and diluted in culture medium at concentration ranging from 100 to 0.8 mg/mL in a final volume to 200 $\mu\text{g/mL}$.

Animal *in vivo* assays

Male Balb/C mice (23 \pm 2 g) were provided by the IMSS Bioterium and were maintained in plastic cages during a 7-day conditioning period prior to the experiments under laboratory conditions (12/12-hour light/dark cycle; temp $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; humidity 55-80%) with Rodent Chow food and water *ad libitum*. The animal for each experiment were randomly selected and grouped in a group of 5 animals each one and their management was carried out according to the statutes of the International Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (IACUC) and Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) revised in 2016.¹⁸ The protocol was approved by the IMSS National Committee of Scientific Research (CNIC R-2018-785-059). After each biological assay, the mice were sacrificed by cervical dislocation and incinerated in the IMSS Bioterium.

Acute toxicity (LD_{50})

This assay was performed according to that previously described.¹⁶ The CSH and MeOH extracts were evaluated at 0.5, 1, and 2 g/kg, and the Hex and CH_2Cl_2 extracts were only evaluated at 2 g/kg. The samples were administered by intragastric (i.g.) route and were previously dissolved in vehicle [Tween 80:H₂O (1:9)], while the control groups only received vehicle (VEH).

Anti-inflammatory assays

The carrageenan induced paw oedema and TPA-induced ear oedema models were used. The assays were performed according to that previously described.¹⁶ The animals were randomly divided and grouped (n=5) as follows: Group I: carrageenan control (vehicle), Group II-IV: carrageenan plus sample dose (extract or fraction), and Group V: carrageenan plus Ind (reference drug, 10 o 20 mg/kg). The CSH extract was tested at 50, 150, and 300 mg/kg and their primary fractions (B, C, D, I, K, M, N, P, Q) were evaluated at 150 mg/kg. The Hex, CH_2Cl_2 and MeOH extracts (aerial parts) and *pCSH* were evaluated at 50, 100, and 150 mg/kg. The primary fractions VI, IX, XIII, XV, and XX (from Hex extract) were tested at 100 mg/kg. Finally, the *h-MeOH* (hydrolyzed MeOH extract) was tested at 25, 50 and 100 mg/kg. All samples were dissolved in Tween 80:H₂O (1:9) and administered by i.g. route.

In the TPA-induced ear oedema model, the animals were randomly divided and grouped (n=5) as follows: Group I: TPA control (vehicle), Group II-IV: TPA plus sample dose (extract or fraction), and Group V: TPA plus Ind (reference drug, 2 mg/ear). All samples (CSH, Hex, CH_2Cl_2 and MeOH extracts, *pCSH* and *h-MeOH*) were evaluated at 0.5, 1, and 2 mg/ear and applied topically, and were previously dissolved in acetone. In addition, primary fractions from the CSH and Hex extracts were tested at 2 mg/ear and were solubilized in acetone. Only fraction V (insoluble in acetone) was solubilized in CHCl_3 .

Statistical analysis

Sigma Plot 14.0 statistical software was utilized for the analysis of the results and graphic elaboration. Data is presented as standard error of the mean (SEM). BW gain values in acute toxicity test were analyzed with bifactorial Analysis of variance (ANOVA) and with a post hoc Student Newman Keuls (SNK) test. Results of $p < 0.05$ were considered statistically significant. For ear oedema weight in TPA and the development of paw oedema in the carrageenan model one-way ANOVA followed by the Dunnett post-hoc test $p < 0.05$ was considered significant. Finally, for relative weight of each organ in acute toxicity a Kruskal-Wallis test (ANOVA by ranks) was carried out, in addition

to a post hoc SNK test, in which relevant out comes were those with a value of $p < 0.05$.

RESULTS

Phytochemical analysis

By maceration process at room temp, 198.93 g of the CSH extract was obtained from 550 g of dry leaves, which represents a yield of 36.16 %. In addition, 7.18 g (1.67%), 2.78 g (0.64%) and 33.83 g (7.88%) of the Hex, CH_2Cl_2 , and MeOH extracts, respectively, were obtained from 429 g of dry material after the successive extraction process.

The main compounds detected in the CSH extract were fatty acids, triterpenes, and sterols (by TLC-NP analyses) and polyphenols mixture (by TLC-RP analyses). The CSH (A) and MeOH (B) extracts were analyzed by HPLC for polyphenols detection (Figure 1). In both chromatograms, between 8.2 and 10 min several peaks were observed that correspond to polyphenols. In the HPLC chromatogram of the MeOH extract (Figure 1B) a main peak with $R_t = 8.44$ min with typical UV bands (at 266 and 348) for glycosylated flavonoids was observed. In addition, both extracts (CSH and MeOH) showed the presence of some amino acids and some carbohydrates (detected by TLC-NP analysis), and these were compared with commercial standards. In the MeOH extract, phenylalanine with an $R_f = 0.63$, alanine ($R_f = 0.4$), glycine ($R_f = 0.30$) and glutamine ($R_f = 0.34$) and in the CSH extract only alanine ($R_f = 0.4$) were observed. In both extract, sucrose ($R_f = 0.33$) was detected as main constituents.

By GC-MS analysis of the Hex extract, 9,12-octadecadienoic acid ethyl ester (20.52%, as a main compound), γ -sitosterol (20.62%), vitamin E (6.30%) and ethyl palmitate (7.85%) were detected. In the CH_2Cl_2 extract, γ -sitosterol (30.19%, as a main compound), ethyl palmitate (3.05%) and palmitic acid (9.96%) as well as vitamin E and stigmastrol were detected (Table 1). In addition, in primary fractions B, C, G, K and M (with low polarity) obtained from the CSH extract, ethyl palmitate (5.83 %); γ -sitosterol (45.65%); stigmasta-3,5-dien-7-one (5.09%); palmitic acid (23.76%); phytol (31.14 %) and phytol acetate (51.20 %) as the main constituents (with > 5 % in the chromatogram) were detected, and the other minor constituents are described in Table 1.

The pCSH obtained from the most polar primary fractions Ñ, O, P and Q of the CSH extract and from MeOH extract contain mainly a polyphenols mixture. This sample was subjected to UPLC-DAD-MS/MS, and in the chromatogram (Figure 2) four peaks with $R_t = 19.4$ (main), 23.1, 26.9, and 27.6 min were observed; in this MS spectra, a peak with $R_t = 19.4$ min showed a $m/z = 755.20$, that corresponds to a glucoflavonoid; which most likely corresponds to a kaempferol-glycoside derivate, because it shows a typical UV wave ($\lambda = 264$ and 348 nm) for this type of compounds. In this sample, other constituents such as scopoletin, sugar (such as sucrose) and some amino acids were also detected.

In addition, the MeOH extract (that contain pCSH) was hydrolysed under acid condition; after that, the *h*-MeOH was obtained. In this *h*-MeOH sample kaempferol, quercetin and scopoletin were identified, these compounds showed a $R_f = 0.37$, 0.20 and 0.68 on TLC-NP using CHCl_3 :MeOH (9:1), the R_f values was similar to commercial standard. In the HPLC chromatogram from the *h*-MeOH, kaempferol showed an $R_t = 23.00$ min with $\lambda = 265.1$ and 363.6 nm (Figure 3B), similar R_t with commercial standard (Figure 3A). Another two main compounds were observed in this chromatogram with an $R_t = 10.28$ min ($\lambda = 234.8$ and 322.7 nm) and 10.52 min ($\lambda = 272.7$ and 345.4 nm); these latter two compounds are under isolation for chemical identification. It must be mentioned that the main peak, with $R_t = 8.44$ min observed in the HPLC chromatogram from the MeOH extract (Figure 1B) disappeared when the hydrolysis process was performed (Figure 3B). In addition,

the scopoletin was quantified on *h*-MeOH by HPLC employing the condition described by Pérez-González et al.,¹⁹ this sample contain 51.24 mg of scopoletin/g of dry sample (Figure 4A and 4B).

On the other hand, the active Hex extract was fractionated by CC-NP and this process allowed to obtain 22 groups of fractions. The main compounds detected by TLC-NP in this extract were fatty acids, triterpenes, and sterols. The majority fractions XV to XX show the presence of β -sitosterol as a main compound. Fraction XV (1.71 g, primary fraction with good yield) was subjected to next CC-NP and four secondary fractions groups were obtained. In the secondary fraction XV-a, β -amyrin, lupeol acetate, β -amyrin acetate and stigmastan-3,5-diene were identified. Stigmastan-3,5-diene and β -sitosterol were also identified in secondary fractions XV-b and XV-c (as a main constituents) and some fatty acids such as ethyl palmitate and palmitic acid was detected in fraction XV-d.

In vitro Antioxidant activity

The CSH and MeOH extracts showed a poor antioxidant activity with $\text{IC}_{50} = 10,598$ and 5,843 $\mu\text{g/mL}$, respectively, respect to quercetin ($\text{IC}_{50} = 92.13$ $\mu\text{g/mL}$). Conversely, pCSH and the *h*-MeOH exhibited a better activity with $\text{IC}_{50} = 3,736$ and 2,338 $\mu\text{g/mL}$, respectively; this last value was better than the CSH and MeOH extracts. The Hex and CH_2Cl_2 extracts were inactive ($\text{IC}_{50} > 5$ mg/mL).

Antimycobacterial and Leishmanicidal activities

The CSH extract was more active against *M. tuberculosis* MTY-137 and *M. tuberculosis* H37Rv showed a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) = 12.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and had moderate activity against *M. tuberculosis* H37Rv resistant to ethambutol and MDR *M. tuberculosis* SIN-4 with MIC = 50 $\mu\text{g/mL}$. All extracts were inactive against the rest of *M. tuberculosis* and non-tuberculosis mycobacterium strains with MIC ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$.

With regard to the results of leishmanicidal activity, the CSH extract showed a one-half inhibitory concentration (IC_{50}) = 4.91 and 13.02 $\mu\text{g/mL}$ against promastigotes and amastigotes of *L. mexicana*, respectively. In addition, the one-half cytotoxic concentration (CC_{50}) = 129.04 and 13.02 $\mu\text{g/mL}$ and the Selectivity index (SI) = 27.97 and 9.9 were determined against the promastigotes and amastigotes of *L. mexicana*, respectively.

Acute oral toxicity study

The LD_{50} value for the Hex, CH_2Cl_2 , MeOH and CSH extracts was > 2 g/kg in Balb/C male mice, administered by i.g. route. The Body Weight (BW) gain of the animals treated with the CSH extract (2 g/kg) was increased. On day 9, the BW gain was 1.14 g and for day 14, it was 1.42 g with respect to VEH group (0.16 and 0.66 g, respectively). This BW gain was higher in the group that received the CSH extract at 2 g/kg; on the other hand, the groups treated with this extract at doses low (0.5 and 1 g/kg) showed a similar BW gain with respect to the VEH group (Figure 5). No changes were detected in the relative weight of the organs (spleen, liver kidney), nor was any alteration of these organs observed at the macroscopic level (data not shown).

The MeOH extract at 0.5 mg/kg did not affect the BW gain when was administered by i.g. route (Figure 6), this BW gain value was similar to VEH group. However, this extract at 2 g/kg decreased the BW gain, on days 7 and 14, it showed values of 0.44 and 0.89 g with regard to VEH group (1.21 and 1.50 g, respectively). The BW loss may be related to an increase in mucus in the feces of the mice that received the extract. Besides, the Hex and CH_2Cl_2 extracts at 2 g/kg favored the BW gain (1.46 and 1.79 g/kg, respectively), this increase was slightly better than that observed in the VEH group, 1.1 g/kg (Figure 6).

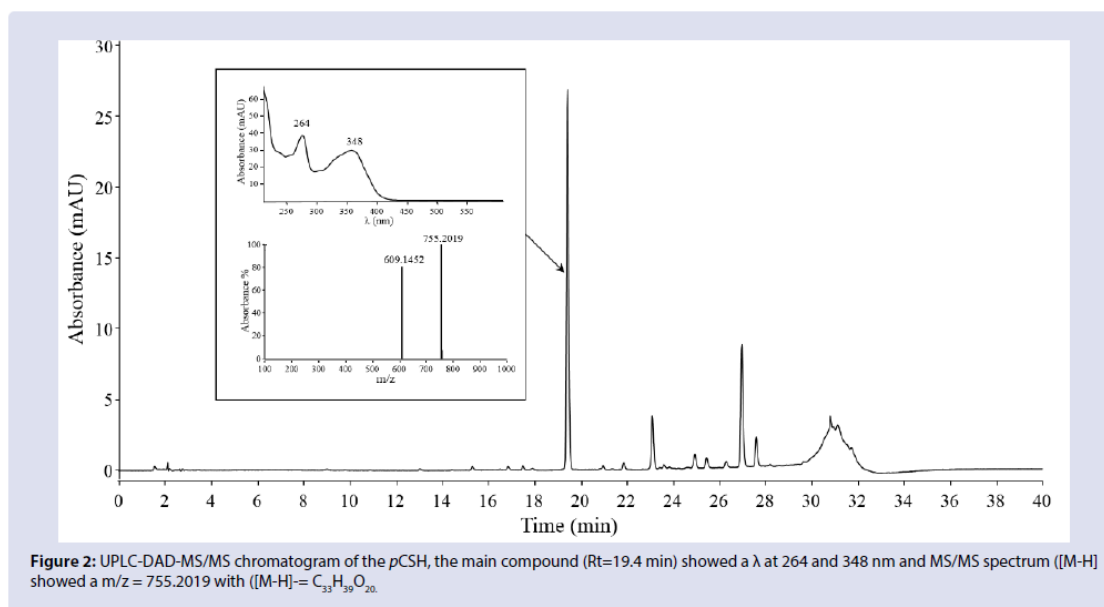
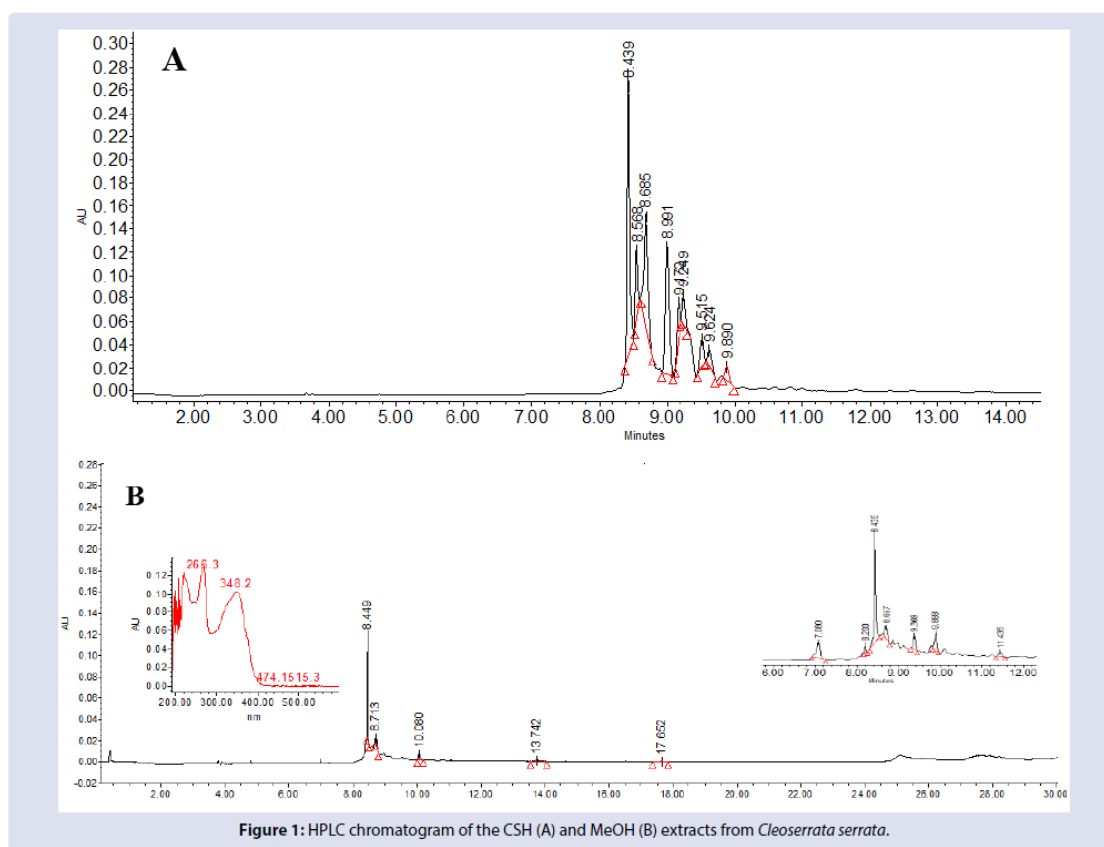


Table 1: GC-MS analysis of phytochemicals identified in Hex and CH₂Cl₂ extracts and in primary fractions obtained from CSH extract of the *Cleoserrata serrata*.

Sample	RT	Compound name	Molecular formula	MW	% area	
Hex extract	22.42	Hexadecanoic acid, ethyl ester (Ethyl palmitate)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	7.85	
	24.39	9,12-Octadecadienoic acid ethyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	308	20.52	
	32.97	γ-Tocopherol	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	416	1.78	
	33.61	Vitamin E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	6.30	
	34.45	Campesterol	C ₂₈ H ₄₈ O	400	3.81	
CH ₂ Cl ₂ extract	35.22	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	20.62	
	22.25	n-Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	9.96	
	22.42	Hexadecanoic acid, ethyl ester (Ethyl palmitate)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	3.05	
	33.64	Vitamin E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	6.33	
Primary Fractions from CSH extract	34.68	Stigmasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	412	6.15	
	35.22	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	30.19	
	B	22.38	Hexadecanoic acid, ethyl ester (Ethyl palmitate)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	5.83
		23.97	Octadecanoic acid, methyl ester (Methyl stearate)	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	1.95
C	37.1	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol (Phytol)	-	278	31.14	
	20.46	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	-	250	2.79	
G	20.95	Phytol	-	278	1.77	
	35.28	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	45.65	
	35.96	Stigmasta-3,5-dien-7-one	C ₂₉ H ₄₆ O	410	5.09	
K	36.31	Stigmast-4-en-3-one	C ₂₉ H ₄₈ O	412	3.08	
	20.44	Phytol, acetate	-	123	51.20	
M	22.16	n-Hexadecanoic acid (Palmitic acid)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	23.76	
	24.5	Octadecanoic acid (stearic acid)	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284	2.90	
	33.58	(+)-α-Tocopherol, O-methyl	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430	3.36	
	35.16	γ-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	13.87	
	37.99	Stigmastane-3,6-dione, (5α)-	-	428	4.79	

RT: retention time; MW: molecular weight.

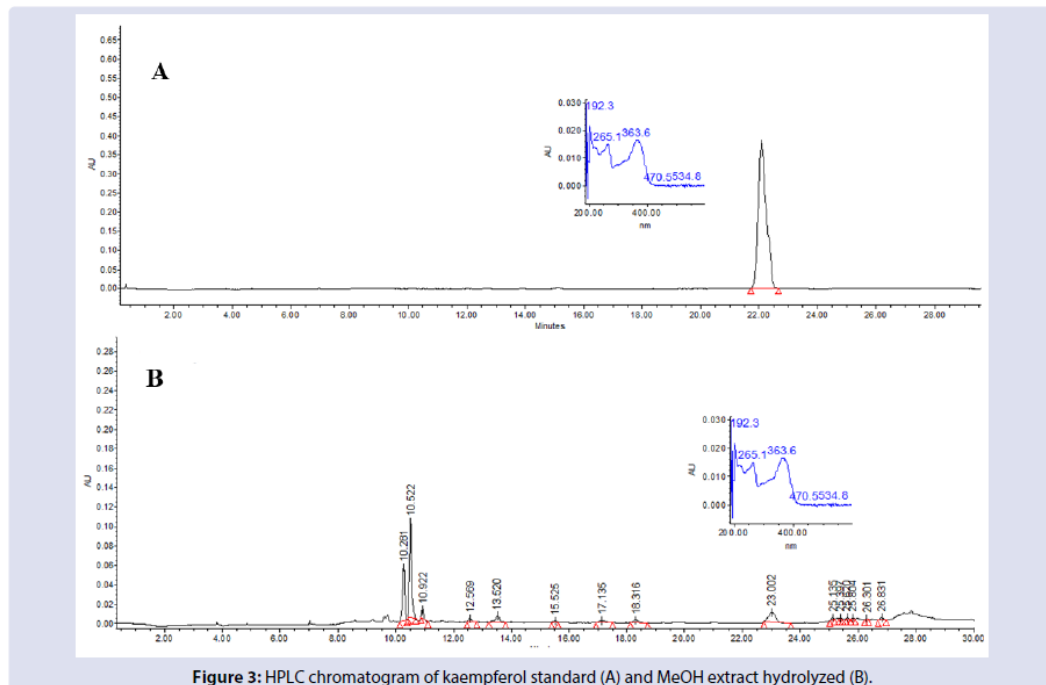


Figure 3: HPLC chromatogram of kaempferol standard (A) and MeOH extract hydrolyzed (B).

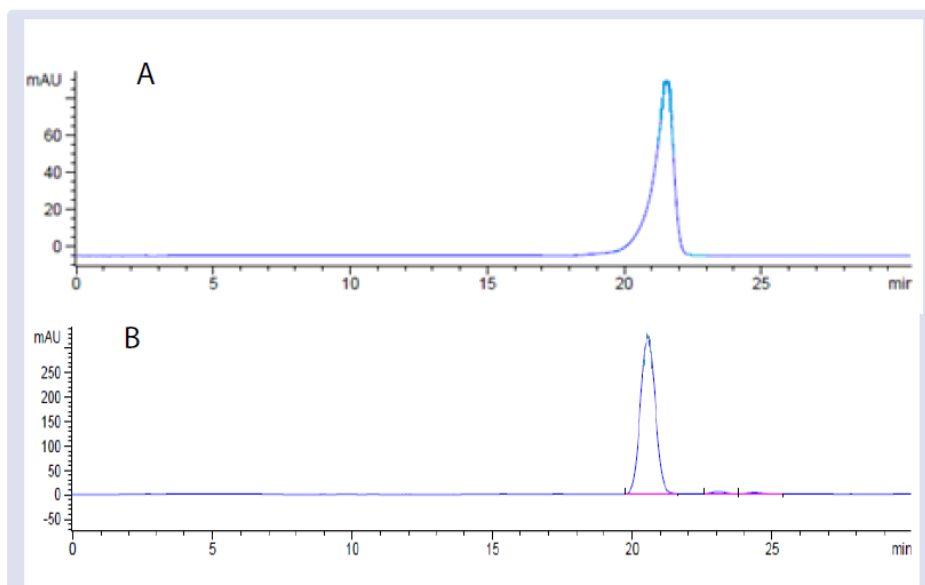


Figure 4: HPLC chromatogram of scopoletin standard (A) and MeOH extract hydrolyzed (B).

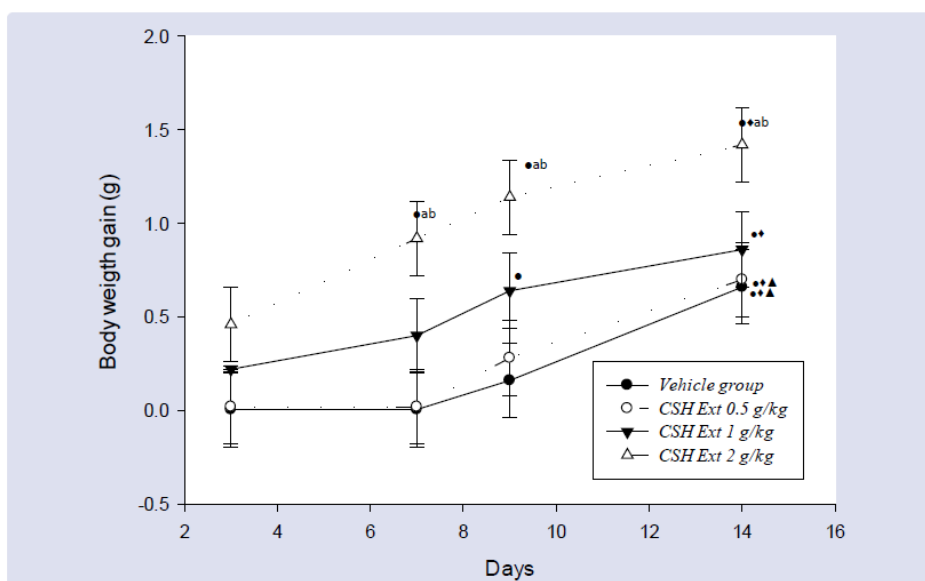


Figure 5: Effect of CSH extract from *Cleoserrata serrata* on the BW gain in a single dose intragastric administration on Balb/C male mice. Data presented as mean (\pm) standard error (s.e.). Statistical analysis two-way ANOVA, post hoc SNK test ($p < 0.05$); avs Vehicle group; bvs 0.5 g/kg; cvs 1 g/kg; ♦ vs Day 3; ♦♦ vs Day 7; ▲ vs Day 9; n=5 per group.

Carrageenan model

In Table 2, the results of anti-inflammatory activity of the CSH, Hex, CH_2Cl_2 , and MeOH extracts are described, determined at 5 h. Only, the Hex extract and pCSH exhibited a dose-dependent effect with $\text{ED}_{50} = 131.46$ and 64.89 mg/kg, respectively. On the other hand, the CSH extract inhibited the plantar oedema with 60.83, 34.49 and 45.66 % inhibition at 300, 150 and 50 mg/kg, respectively. The CH_2Cl_2 and MeOH extracts from *C. serrata* (aerial parts) were more active at lower

doses (50 to 150 mg/kg) with 41 to 52 % inhibition, respectively. However, this effect was not dose dependent for the three extracts (Table 2).

Some primary fractions (B, C, D, I, K, M, N, P and Q) obtained from the CSH extract were tested at 150 mg/kg. The percentage of inhibition was ≥ 23 % for D, I, K, M, N, Q and P (Table 3) and the primary fractions B, and C exhibited less anti-inflammatory activity (≤ 16 %) with respect to Ind. This reference drug at 10 and 20 mg/kg showed 65.85 and 53.82 % of inhibition. In this biological test, different doses

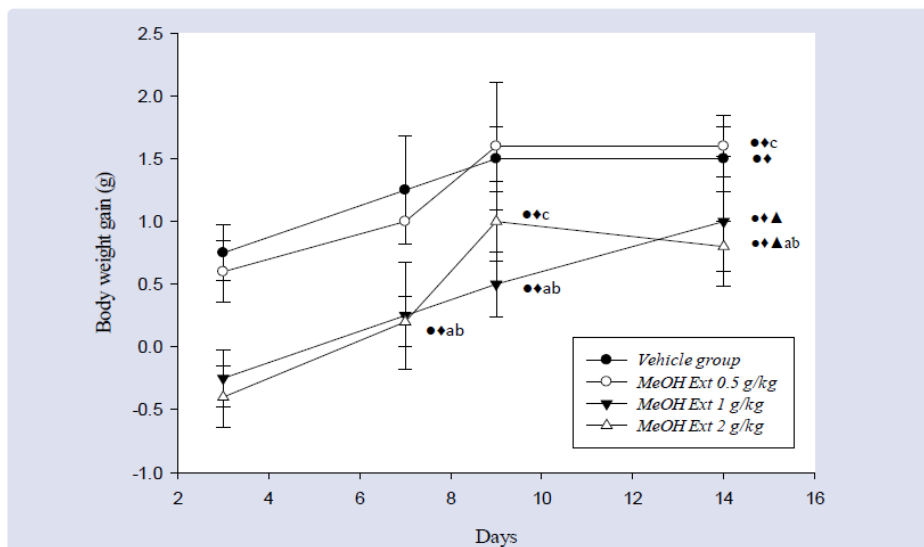


Figure 6 : Effect of MeOH extracts from *Cleoserrata serrata* on the BW gain in a single dose intragastric administration on Balb/C male mice. Data presented as mean (\pm) standard error (s.e.). Statistical analysis two-way ANOVA, post hoc SNK test ($p \leq 0.05$); avs Vehicle group; bvs 0.5 g/kg; cvs 1 g/kg; ♦ vs Day 3; ♦ vs Day 7; ▲ vs Day 9; n=5 per group.

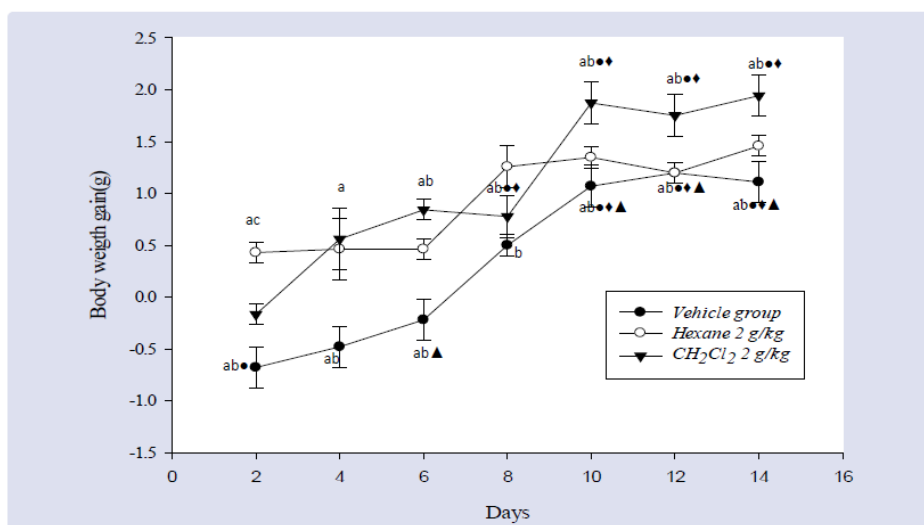


Figure 7: Effect of extracts CH₂Cl₂ and Hex from *Cleoserrata serrata* on the BW gain in a single dose intragastric administration on Balb/C male mice. Data presented as mean (\pm) standard error (s.e.). Statistical analysis two-way ANOVA, post hoc SNK test ($p \leq 0.05$); avs Vehicle group; bvs Hex 2 g/kg; cvs CH₂Cl₂ 2 g/kg; ♦ vs Day 4; ♦ vs Day 6; ▲ vs Day 8; n=5 per group.

of Ind were employed because variation in the % inhibition was found, due to the instability of this drug when it was stored at room temp.

On the other hand, some primary fractions obtained from active Hex extract (VI, IX, XIII, XV, and XXI) were tested at 100 mg/kg. Only, fraction VI showed a good anti-inflammatory activity with 55.23% inhibition, this effect that was better than Ind (42.92%) and the fractions IX, XIII, XV and XXI exhibited a poor activity with values < 27.69 % (Table 4).

Finally, the *h*-MeOH (from the hydrolysed MeOH extract) was tested at 25, 50 and 100 mg/kg, and the results are described in Table 5. This sample inhibited the inflammatory process since the third h, exhibiting 42.17, 26.05 and 23.49 % of inhibition, respectively. However, the anti-inflammatory effect observed in the fifth hour was less than that observed in the third hour, showing 30.44, 5.53 and 5.31 % of inhibition. This effect improved at the seventh hour (38.44, 25.63 and 15.02 % inhibition at 25, 50 and 100 mg/kg, respectively) and its effect was better than that of IND (13.04 %).

Table 2: Anti-inflammatory activity of *Cleoserrata serrata* organic extracts, and pCSH on the acute inflammation induced with carrageenan.

Treatment	Dose (mg/kg)	Paw edema formation (mm)*	Inhibition (%)	ED ₅₀ (mg/kg)
Carrageenan	-	0.90±0.06	-	
Ind	20	0.35±0.01 ^a	60.95	
	50	0.49±0.01 ^a	45.66	
CSH extract	150	0.59±0.07 ^a	34.49	
	300	0.35±0.04 ^a	60.83	
	50	0.49±0.11 ^a	45.61	
CH ₂ Cl ₂ extract	100	0.52±0.00 ^a	41.44	
	150	0.42±0.05 ^a	52.48	
Carrageenan	-	0.78±0.05	-	
Ind	18	0.40±0.06	48.07	
	50	0.63±0.08	18.59	131.46
Hex extract	100	0.51±0.07 ^a	34.76	R ² =0.93
	150	0.32±0.04 ^a	58.20	
	50	0.42±0.02 ^a	42.07	
MeOH extract	100	0.46±0.03 ^a	41.38	
	150	0.40±0.00 ^a	48.26	
	50	0.41±0.03 ^a	47.59	64.89
pCSH	100	0.36±0.03 ^a	53.80	R ² =0.99
	150	0.32±0.05 ^a	58.63	

Each group represents the mean (±) and standard error (s.e.). Statistical analysis one-way ANOVA, followed by the Dunnett post-hoc test (p<0.05) ^avs carrageenan; n=5. *Time: 5 hour.

Table 3: Anti-inflammatory activity of the primary fractions from CSH extract (*Cleoserrata serrata*) on the acute inflammation induced with carrageenan.

Treatment	Paw edema formation (mm)	Inhibition (%)
Carrageenan	1.19±0.02	-
Ind (10 mg/kg)	0.40 ±0.02 ^a	65.85
Primary fraction from CSH extract (150 mg/kg)		
B	1.06±0.01	10.85
D	0.88±0.2	25.95
I	0.90±0.01	24.46
K	0.72±0.01	39.85
M	0.58±0.01 ^a	50.92
Ñ	0.71±0.05 ^a	40.60
Q	0.47±0.01 ^a	59.94
Carrageenan	1.10±0.07	-
Ind (20 mg/kg)	0.51±0.02 ^a	53.82
C	0.93±0.01	15.75
P	0.84±0.01 ^a	23.99

Each group represents the mean (±) and standard error (s.e.). Statistical analysis one-way ANOVA, followed by the Dunnett post-hoc test (p<0.05). ^avs carrageenan; n=5.

Table 4: Anti-inflammatory activity of the primary fractions from Hex extract (*Cleoserrata serrata*) on the acute inflammation induced with carrageenan.

Treatment	Paw edema formation (mm)	Inhibition (%)
Carrageenan	0.66±0.04	-
Ind (10 mg/kg)	0.38 ±0.01 ^a	42.92
Primary fraction from Hex extract (100 mg/kg)		
VI	0.37±0.03 ^a	55.23
IX	0.48±0.05	27.69
XIII	0.64±0.05	3.66
XV	0.49±0.05	26.68
XXI	0.53±0.06	20.97

Each group represents the mean (±) and standard error (s.e.). Statistical analysis one-way ANOVA, followed by the Dunnett post-hoc test (p<0.05). ^avs carrageenan; n=5.

Table 5: Anti-inflammatory activity of the hydrolyzed MeOH extract of *Cleoserrata serrata* on the acute inflammation induced with carrageenan.

Treatment	Dosis (mg/kg)	Paw edema formation (mm) and inhibition percentage			
		3 h	5 h	7 h	24 h
Carrageenan	-	0.61±0.02	0.72±0.02	0.79±0.02	0.51±0.04
Ind	20	0.48±0.03 (21.7%)	0.43±0.00 (40.10%)	0.69±0.03 (13.04%)	0.34±0.03 (40.43%)
	25	0.35±0.05 (42.17%)	0.50±0.05 (30.44%)	0.49±0.06 (38.44%)	0.34±0.04 (39.58%)
<i>h</i> -MeOH	50	0.45±0.04 (26.05%)	0.68±0.03 (5.53%)	0.59±0.06 (25.63%)	0.39±0.04 (34.53%)
	100	0.47±0.04 (23.49%)	0.68±0.07 (5.31%)	0.067±0.06 (15.02%)	0.35±0.05 (41.24%)

Table 6: Anti-inflammatory activity of *Cleoserrata serrata* organic extracts, hydrolyzed MeOH extract and precipitate pCSH on the acute inflammation induced with TPA.

Treatment	Doses (mg/ear)	Auricular edema (mg)	Inhibition %	ED ₅₀ (mg/ear)
TPA	-	8.34±0.23	-	
Ind	2	3.45±0.59	58.59	
	0.5	7.38±0.5	11.51	
CSH extract	1	2.78±0.34 ^a	66.66	
	2	6.04±0.60 ^a	27.57	
TPA	-	7.39±0.52	-	
Ind	2	3.28±0.85 ^a	55.66	
	0.5	4.4±1.29 ^a	40.52	
CH ₂ Cl ₂ extract	1	3.4±0.79 ^a	54.04	0.79
	2	2.22±0.31	69.92	R ² =0.99
Hex extract	0.5	4.06±0.72 ^a	45.12	
	1	4.36±0.79 ^a	41.07	
MeOH extract	2	6.4±0.37	13.50	
	0.5	4.54±0.53	38.64	
MeOH extract	1	3.42±0.43 ^a	53.77	
	2	3.94±0.77 ^a	46.75	
TPA	-	6.4±0.42	-	
Ind	2	0.88±0.06 ^a	86.25	
	0.5	1.92±0.52 ^a	69.92	
pCSH	1	1.78±0.43 ^a	72.08	0.47
	2	1.670±0.17 ^a	73.82	R ² =0.99
TPA	-			
Ind	0.5	0.95	61.93	
	1	1.46	55.04	0.28
<i>h</i> -MeOH	2	0.99	65.96	R ² =0.99
			66.61	

Data presented as mean (±) standard error (s.e.) and indicate the percent of inhibition edema with respect to TPA group. Statistical analysis one-way ANOVA, followed by the Dunnett post-hoc test (p≤0.05) ^avs TPA; n=5.

At 24 h this percentage of inhibition was better (reaching >34.53%), and it is noteworthy mentioning that the *h*-MeOH at 100 mg/kg showed a similar anti-inflammatory effect to IND (41.24 % vs 40.43 %).

TPA model

The results obtained in this assay are described in Tables 6-8. The CH₂Cl₂ extract, pCSH and *h*-MeOH exhibited dose-dependent effect with ED₅₀ = 0.79, 0.47 and 0.28 mg/ear, respectively and possess a better anti-inflammatory activity than Ind (ED₅₀ = 1.82 mg/ear), being more active *h*-MeOH. On the other hand, the CSH extract showed 66.66 % oedema inhibition at 1 mg/ear; this activity was similar to Ind (2 mg/ear with 58.59%). Nonetheless, this inhibitory effect was not dose-dependent. The Hex and MeOH extract revealed moderate anti-inflammatory activity (>38.64 % of inhibition); however, the effect was not dose-dependent because a high dose (2 mg/ear) showed poor inhibition (Table 6).

In addition, the primary fractions B, C, I, K, M, Ñ, and P (at 2 mg/ear) showed >46 % inhibition (Table 7), and two primary fractions (D and Q) exhibited scarce (< 24.56 % of inhibition) anti-inflammatory activity.

Finally, the primary fractions III, V, VI, IX, XIII, XV and XX (from Hex extract) were also active, the results are described in Table 8. These primary fractions were tested at 2 mg/kg, and five of these showed >45 % of inhibition of the inflammatory process; but, fractions XVII and XIX showed poor activity (< 29.6 % of inhibition).

DISCUSSION

Previously, Alamilla-Fonseca et al.,⁷ reported the presence of sterols, terpenes and polyphenols in the CH₂Cl₂:MeOH extract from *C. serrata* leaves by qualitative tests; however, the isolation and chemical identification of this component have not yet been described. In the

Table 7: Anti-inflammatory activity of the primary fractions from CSH extract of the *Cleoserrata serrata* on the acute inflammation induced with TPA.

Treatment	Auricular edema (mg)	Inhibition %
TPA	7.26±0.39	-
Ind (2 mg/ear)	2.87±0.66 ^a	60.39
Primary fraction from CSH extract (2 mg/ear)		
B	0.82±0.38 ^a	88.70
D	6.15±0.23	15.28
I	3.92±0.51 ^a	46
TPA	12.82±0.65	-
Ind (2 mg/ear)	7.17±0.1.02 ^a	44.05
C	3.6±0.55 ^a	71.92
K	6.52±1.20 ^a	49.12
M	3.15±0.69 ^a	75.43
N	6.67±0.59 ^a	47.95
P	6.3±1.06 ^a	50.87
Q	9.67±0.56	24.56

Data presented as mean (±) standard error (s.e.) and indicate the percent of inhibition edema with respect to TPA group. Statistical analysis one-way ANOVA, followed by the Dunnett post-hoc test (p≤0.05). ^avs TPA; n=5.

Table 8: Anti-inflammatory activity of the primary fractions from Hex extract of the *Cleoserrata serrata* on the acute inflammation induced with TPA.

Treatment	Auricular edema (mg)	Inhibition %
TPA	9.37±0.86	-
Ind (2 mg/ear)	2.57±0.68 ^a	72.53
Primary fraction from Hex extract (2 mg/ear)		
III	5.12±0.79 ^a	45.33
V	2.97±0.49 ^a	68.27
VI	1.52±0.45 ^a	83.73
IX	3.76±0.15 ^a	59.82
XIII	1.45±0.32 ^a	84.53
XV	4.17±0.95 ^a	55.46
XVII	6.6±0.80 ^a	29.60
XIX	7.36±0.54	21.42
XX	2.7±0.53 ^a	71.20

Data presented as mean (±) standard error (s.e.) and indicate the percent of inhibition edema with respect to TPA group. Statistical analysis one-way ANOVA, followed by the Dunnett post-hoc test (p≤0.05). ^avs TPA; n=5.

CSH extract fatty acids, triterpenes, and sterols were detected as main compounds, using TLC-NP analyses, and a polyphenols mixture was also detected with TLC-RP plates and HPLC analyses.

The CSH and MeOH extracts were analyzed by HPLC to search polyphenols. In both chromatograms, some peaks were observed between 8.2 and 10 min, which correspond to polyphenols, showing typical UV bands (at 266 and 348 nm) for glycosylated flavonoids. On the other hand, in both extracts, amino acids (such as alanine, glycine, glutamine, and phenylalanine) were also detected. The TLC-NP profile of the MeOH extract was similar to Red Bull® (energy beverage), it contains taurine and L-carnitine,²⁰ and also contains phenylalanine, alanine, glycine and glutamine, while in the CSH extract only alanine was detected. Previously, it was described that some species of the *Cleomaceae* family are consumed in certain places in Africa and Asia as edible vegetable for their nutritional value and for their content of proteins and amino acids.^{5,21,22} For example, *Cleome gynandra* leaves have 0.39 and 0.37 g of protein/g of dry weight material collected in the dry and rainy season.²³ In aqueous and saline extracts from *Corynandra viscosa* (Syn. *Cleome viscosa*) seeds DL-aspartic acid, L-hydroxy proline, L-proline, DL-serine, 3-DL-alanine, DL-2-amino-N-butyrac acid

and L-tyrosine were reported.²⁴ In *Gynandropsis gynandra* (L.) Briq (Syn *Cleome gynandra* L.) oil seeds the presence of protein (29.5%), lipid (27.7%) and some amino acids, such as glutamic acid, arginine, aspartic acid, lysine, tyrosine, and histidine were described. This amino acid profile is comparable to that of the content of the oil from leguminous seeds.²⁵ To our knowledge, *Cleoserrata serrata* is only used as a medicinal species in south-eastern Mexico and to date the presence of amino acids in this medicinal species had not been described. In the CSH and MeOH extracts, we also reported for the first time the presence of carbohydrates such as sucrose.

Continuing with the chemical screening, in the active Hex extract (by GC-MS analyses) 9,12-octadecadienoic acid ethyl ester, γ-sitosterol, vitamin E and ethyl palmitate as the main compounds were identified. This extract was chemically fractionated and in primary fractions XV to XX, β-sitosterol was detected as a main compound. The primary fraction FXV was sub fractionated by CC-NP, because it primary fraction was obtained at a good amount, and four secondary fractions groups (FXVa-d) were obtained. In FXVa, β-amyryn, lupeol acetate, β-amyryn acetate and stigmastan-3,5-diene were identified. In addition, ethyl palmitate and palmitic acid were also obtained from fraction FV-d. In FV-b and FV-c, β-sitosterol was detected as main compound. β-Amyryn, lupeol acetate, β-amyryn acetate, stigmastan-3,5-diene and β-sitosterol were identified by comparison of the Rf value with their respective standards previously isolated from *Cnidocolus tehuacanensis* and *C. chayamansa* leaves. Some of these compounds possess significant anti-inflammatory activity.^{26,27} These compounds have been previously described for *Gynandropsis gynandra*^{28,29} but not for *C. serrata*. In the CH₂Cl₂ extract, γ-sitosterol (main compound), ethyl palmitate, palmitic acid, vitamin E and stigmasterol (minority components) were also identified as a main constituents.

On the other hand, in primary fractions (B, C, G, K and M) obtained from the CSH extract, the same compounds, as well as phytol and phytol acetate were found as main constituents. It is noteworthy that phytol has been reported in the essential oil of the aerial parts from *Cleoserrata serrata* (collected in India);^{5,10} it has also been described in *Cleome monophylla*.³⁰ Therefore, this is the first report that describes the presence of this type of compound (except for phytol) in the organic extract from *C. serrata*.

In pCSH obtained from more polar primary fractions (N, O, P and Q) of the CSH extract and from the MeOH extract, a polyphenols mixture was detected by TLC-RP and HPLC analyses. In the UPLC-DAD-MS/MS chromatogram four peaks were observed. The main peaks observed (Rt = 19.4 min) showed a m/z = 755.20 (C₃₃H₃₀O₂₀) and 609 (this fragment indicates the loss of sugar in C-7), and a typical UV wave (λ = 264 and 348 nm) which corresponds to glycosylate flavonoids; this is most likely a kaempferol-glycoside derivate, these UV wave indicates the presence of a kaempferol nucleus with carbohydrates at C-3 and C-7.³¹ The most likely chemical structure of the main compound present in the MeOH extract and in pCSH is kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside. at present, we are in process of isolation and identification, in order to be able to establish the structure unequivocally. Because so far, we only have the ¹H-NMR spectrum and in this we observe signals for the kaempferol nucleus and signals for the anomeric proton of three sugars; however, with this data we can partially establish the chemical structure. In this context, Fushiya et al.³² reported two bioactive flavonoids isolate from the MeOH extract of the *Cleome droserifolia* aerial parts. These flavonoids were identified as 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3',5'-pentamethoxyflavone with λ at 276 and 333 nm (m/z 404.11, C₂₀H₂₀O₉) and 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone with λ at 275 and 342 nm (m/z 374.10, C₁₉H₁₈O₈). In addition, the main metabolites described in several species of the *Cleomaceae* family are phenolic compounds: cumarinolignoids, polymethoxyflavonols, glucoflavonoids, flavanones or flavones and their glycosides.^{1,33}

On the other hand, the MeOH extract (that contains a polyphenols mixture, pCSH) was hydrolysed and in the *h-MeOH*, kaempferol, quercetin and scopoletin were identified by TLC-NP and HPLC analyses. It should be mentioned that the main peak with Rt = 8.44 min observed in the HPLC chromatogram from the MeOH extract disappeared when this extract was hydrolyzed and when it was analyzed under the same HPLC conditions. Some glucopyranosides of kaempferol have been described in species of the *Cleomaceae* family: from *Cleome arabica* 3-O-glucosyl-7-O-rhamnosyl-, 3-7-di-O-rhamnopyranoside-, and 3-O-glucopyranosides of kaempferol have been isolated.³⁴ Kaempferol-4'-methoxy-3,7-O-di-rhamnoside was obtained from *C. droserifolia* and cleomeside K, L, and M were obtained from *Corynandra chelidonii* (Syn. *Cleome chelidonii*).³⁴⁻³⁶ To our knowledge, it is the first report that describes the presence of scopoletin and glucopyranosides of the kaempferol in *C. serrata*.

With respect to antioxidant activity, only pCSH and the *h-MeOH* showed a moderate antioxidant activity, and the CSH and MeOH extracts exhibited weak antioxidant activity with respect to standard quercetin. This antioxidant activity for *C. serrata* was low compared to that of other genus (*Cleome* and *Corynandra*), which belong to *Cleomaceae* family.³⁷ For example, the aqueous and EtOH extracts from *Cleome rutidosperma* (leaves) showed 53.13 and 57.13% DPPH inhibition, respectively, at 250 µg/mL.³⁸ In addition; the EtOH extract from the aerial parts and roots of *Corynandra chelidonii* (Syn. *Cleome chelidonii* L.f.) collected in the Materu region (India) showed an IC₅₀ = 1525 and 850.50 µg/mL, respectively.³⁹ The MeOH extracts of *Cleome iberica* showed an IC₅₀ = 120.25 µg/mL in the DPPH assay,⁴⁰ and the MeOH 70 % extract from the leaves and stem of *Corynandra viscosa* (Syn. *Cleome viscosa*) showed IC₅₀ = 373.18 and 511.10 µg/mL, respectively.⁴¹ Meanwhile, *Cleome arabica* (EtOH extract from leaves) showed an IC₅₀ = 90 µg/mL and the root extract had an IC₅₀ = 970 µg/mL.⁴² To date, the antioxidant activity for *C. serrata* has not been described, and the results obtained in this work indicate that this species showed poor antioxidant activity because the polar extracts from this medicinal plant contain principally glycosylated flavonoids; however, the pCSH showed a better activity due to its high contents of polyphenol compounds. Additionally, the *h-MeOH* (hydrolyzed sample from MeOH extract) showed better antioxidant activity because it contains free flavonoids such as kaempferol, quercetin and also contains scopoletin, these two compounds have significant antioxidant activity.

Regarding the biological evaluation, the CSH extract inhibited the growth of *M. tuberculosis* MTY-137 and *M. tuberculosis* H37Rv (MIC <25 µg/mL) and was moderately active against *M. tuberculosis* H37Rv resistant to ethambutol and MDR *M. tuberculosis* SIN-4 exhibited (MIC = 50 µg/mL). This is the first work that describes the antimycobacterial activity of *C. serrata* and this species constitutes an important source of antimycobacterial compounds. With regard to the leishmanicidal activity, the CSH extract was more active against amastigotes of *L. mexicana*. Previously, has been described that CH₂Cl₂:MeOH extract showed an LD₅₀ = 23.2 and 6.11 µg/mL against the promastigotes and amastigotes of *L. mexicana*.⁷ With these results, we are able to confirm that the organic extract possesses good leishmanicidal activity.

To date, the LD₅₀ values for organic or aqueous extracts of *Cleoserrata serrata* have not been described. The Hex, CH₂Cl₂, MeOH and CSH extracts showed a LD₅₀ >2 g/kg in Balb/C male mice. Only, the Hex and CH₂Cl₂ extracts favored the BW gain, this increase was similar to that the VEH group. LD₅₀ values allow these extracts to be considered within Category 5 of substances according to OECD TG 423.⁴³ Elufioye and Onoja⁴⁴ described an increase in BW in ICR mice (male and female) treated with the MeOH extract of the *Corynandra viscosa* (Syn. *Cleome viscosa*) whole plant, when it was administered at 10, 100, 1000, 2900 and 5000 mg/kg by i.g. route with single doses; the mice were observed during 14 days and, at the end of the experiment period the

BW was registered. The BW values were 18.6, 22.0, 22.6, 30 and 28 g, respectively, with regard to the VEH group (19 g). In addition, these authors did not find any abnormalities in organ relative weight, and nor lethality registered. The authors concluded that this behavior in terms of the BW increase was due to the nutritional value of the plant. This medicinal plant is used to treat fever, inflammation, liver disease, bronchitis and diarrhea in the Ayurvedic system.

Regarding the topic and systemic anti-inflammatory activity of the *C. serrata*, this manuscript constitutes the first report. In the carrageenan model (systemic effect), the Hex extract and pCSH exhibited a good anti-inflammatory activity (showing ED₅₀ = 131.46 and 64.89 mg/kg), and the pCSH showed a better activity with respect to CSH and MeOH extracts. The CSH extract inhibited the plantar oedema, showing 60.83% of inhibition a high dose (300 mg/kg). On the other hand, the CH₂Cl₂ and MeOH extracts from *C. serrata* were more active at lower doses (<150 mg/kg) showing > 40% of inhibition, but this effect was not dose-dependent. The anti-inflammatory activity of the Hex and CH₂Cl₂ extract is due to content of the lipophilic compound (such as β-amyrin, lupeol acetate, β-amyrin acetate, stigmastan-3,5-diene, β- or γ-sitosterol and other) and the activity observed by pCSH and MeOH extract is due to the presence of the polyphenol mixture (kaempferol and quercetin-glycoside derivate) and other compounds such as scopoletin, amino acids and carbohydrates.

The CSH extract was fractionated and some primary fractions showed a better anti-inflammatory activity that the original extract when was tested at 150 mg/kg (≥23 % of inhibition). These fractions have a lipophilic compound (such as stearic acid, palmitic acid, β-sitosterol, phytol acetate and stigmastan-3,5-diene) as a main compound, and from polar primary fractions N-Q a pCSH (polyphenol mixture) was obtained, this sample contain some kaempferol-glycoside derivate (perhaps kaempferol-3-sophoroside-7-glucoside). Previously, has been described that phytol possess anti-inflammatory activity.¹¹ It is also well known that some genus from the *Cleomaceae* family, such as *Cleome*, *Corynandra*, *Gynandropsis*, and *Tarenaya* showed acute anti-inflammatory activity on this model, and some authors have described that polyphenols are responsible for this biological activity.⁵ From the MeOH (85%) extract obtained from the fresh flowers of *C. viscosa*, quercetin-3-O-(2"-acetyl)-glycoside was isolated and showed a good anti-inflammatory activity in the carrageenan model at doses of 100 and 200 mg/kg administered by i.p. route, showing 51.7 and 45% inhibition (at 3h).⁴⁵ Other glucoflavonoids (5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-pentamethoxyflavone and 5,4'-dihydroxy-6,7,8,3'-tetramethoxyflavone) isolated from *Cleome droserifolia* and cleomiscosin A-C isolated from *C. viscosa* have been described as anti-inflammatory compounds,^{32,46} but these compounds were tested in another inflammatory assay. The polyphenols mixture (pCSH) present in the CSH and MeOH extracts from *C. serrata* may contribute to the anti-inflammatory properties, although the anti-inflammatory activity is also due to the content of lipophilic compounds.

Finally, the *h-MeOH* (hydrolyzed MeOH extract) showed a significant anti-inflammatory activity (>30% of oedema inhibition) at low doses (25 mg/kg), in this sample kaempferol, quercetin and scopoletin were detected; the anti-inflammatory activity for these compounds is well described.¹⁹ The effect of this sample was better than IND (21.7 % of inhibition) at the same time.

In the topic model (TPA assay), the CH₂Cl₂ extract, pCSH, and *h-MeOH* were the most active showing an ED₅₀ = 0.79, 0.47 and 0.28 mg/ear, respectively. The latter sample was the most active and it contain kaempferol, quercetin and scopoletin as a main constituent. Previously, has been described that these compounds possess significant anti-inflammatory activity.¹⁹ In addition, the CSH extract showed a similar percentage of inhibition that Ind (66.66 % vs 58.59% at 1 mg/ear), but

the effect was not dose-dependent. The Hex extract exhibited moderate anti-inflammatory activity (>41.07 % of inhibition at 0.5 and 1 mg/ear); however, this effect was not dose-dependent, because a high dose (2 mg/ear) showed a poor inhibition (13.50 %). The MeOH extract also showed anti-inflammatory activity (>38.64 % of oedema inhibition at three doses tested); but this effect was also not dose-dependent.

Additionally, primary fractions (B, C, I, K, M, Ñ, and P, tested at 2 mg/ear) from the CSH extract were active, showing >46 % inhibition and only two primary fractions (D and Q) exhibited poor anti-inflammatory activity. These primary fractions were active as the original extract. The good anti-inflammatory activity of these fractions is due to the lipophilic compounds (such as phytol, phytol acetate, ethyl palmitate, 9,12-octadecadienoic acid ethyl ester, β -sitosterol, palmitic acid and others) present in this extract, plus the polyphenol mixture. Previously, it has been reported that this type of compounds exhibited good topic anti-inflammatory in *in vivo* models (TPA, croton oil-induced ear oedema).^{11,47,48}

Finally, the anti-inflammatory activity in the TPA assay (topic model) for the Hex extract and from its primary fraction is due to the presence of the lipophilic compounds such as: lupeol acetate, β -amyirin acetate, β -amyirin, phytol, phytol acetate, stigmastan-3,5-diene, and β -sitosterol; these were the main constituents. Previously, the anti-inflammatory activity of this type of compounds has been described.^{5,10,11,16,19,26,27} To our knowledge, this is the first paper that describes a partial chemical profile of the organic extracts of the *Cleoserrata serrata*. The anti-inflammatory, and leishmanicidal activities for these extracts validates the use in traditional medicine of the *Cleoserrata serrata*. Furthermore, we are describing the antimycobacterial activity herein, to our knowledge for the first time for this species.

Based on the results obtained, we will continue with the isolation and chemical identification of glucoflavonoids; which can serve as biomarkers of the active extract. In addition, we will carry out the anti-inflammatory evaluation in the chronic inflammation model of the more active extracts and it is also necessary to determine the subacute toxicity of each extract. This paper is a contribution to the study of medicinal plants and their importance in the search for bioactive substances.

CONCLUSION

Cleoserrata serrata is used in Mexican traditional medicine to treat cutaneous leishmaniasis and, also is used in inflammatory disease. All extracts and *p*CSH exhibited a good anti-inflammatory activity, being more active the *h*-MeOH. On carrageenan assay, the Hex extract and *p*CSH showed ED₅₀ = 131.46 and 64.89 mg/kg and the CSH, CH₂Cl₂ and MeOH extracts were moderately active (>34.49 % of inhibition). Primary fractions from CSH and Hex extracts also showed a good anti-inflammatory activity. On TPA assay, *h*-MeOH was more active than Ind, and CH₂Cl₂ extract, *p*CSH showed a good topic anti-inflammatory effect. The CSH, Hex and MeOH extracts were also active but their effect was no dose-dependent. Primary fractions from CSH and from Hex extracts showed a better topic anti-inflammatory effect.

The Hex and CH₂Cl₂ extracts and their primary fractions (with low- and medium-polarity from the CSH and the Hex extract) contain triterpenes, fatty acids and sterols such as: β - and γ -sitosterol, β -amyirin, lupeol acetate, β -amyirin acetate, stigmastadiene phytol, phytol acetate, β - and γ -sitosterol, 9,12-octadecadienoic acid ethyl ester, vitamin E, ethyl palmitate and palmitic acid as a main constituent. In the *p*CSH sample a kaempferol glycoside derivative, some amino acids and carbohydrates were detected. In active *h*-MeOH, kaempferol, quercetin and scopoletin were identified, and in carrageenan assay it showed a better anti-inflammatory effect at 25 mg/kg from 3 h to 24 h (a similar effect to IND), although this effect was not dose-dependent, however at 24 h this effect remained. In TPA assay, this sample showed a significant ED₅₀ (0.28 mg/ear).

CSH extract showed anti-inflammatory effect and also, moderate antimycobacterial and leishmanicidal activities; therefore, it is the most recommended to continue investigating because it contains lipo- and hydrophilic compounds such as triterpenes, sterols, fatty acids, some amino acids, as well as kaempferol glycoside derivative. All extracts showed a LD₅₀ > 2 g/kg in Balb/C mice and CSH extract favored the body weight gain. Respect to antioxidant activity, only *p*CSH, and *h*-MeOH were moderately active. This is the first report that describes phytochemical profile and anti-inflammatory effect as well as the DL₅₀ and their antimycobacterial activity for this medicinal species.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Susan Drier-Jonas for English assistance with the manuscript. Juárez-Vázquez received scholarship from CONACyT (545284) and CIS/IMSS (990975569)

FUNDING

This study was supported by a grant from IMSS Project FIS/IMSS/PROT/G18/1818.

COMPETING INTERESTS

This study is taken in part from the Ph.D. thesis of MdC. Juárez-Vázquez (Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM). All authors have read and approved the final version of the manuscript and declare that they have no conflicts of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTION

MdelCJ and RLD were the responsible for the experimental work (technical work, interpretation of the results, collect material vegetal, statistical analyses, and elaboration/revision of the manuscript) of the research project; JLH and LYM carried out the antimycobacterial and leishmanicidal assays; AZ and ATL performed the HPLC analysis. MMV and FAA collaborated in the preparation/revision of the manuscript; MAJA is responsible of research project, elaboration of the research project and preparation/revision of the manuscript.

ETHICS APPROVAL

Balb/C mice were provided by the IMSS Bioterium. The animal experiments were performed following the statutes of the International Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (IACUC) and Mexican Official Norm (NOM-062-ZOO-1999) revised in 2016. The protocol was approved by the National Committee of Scientific Research form IMSS (CNIC R-2018-785-059). After each biological assay, the mice were sacrificed by cervical dislocation and incinerated in the IMSS Bioterium.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors read and approved the research protocol and agreed to participate in its development.

REFERENCES

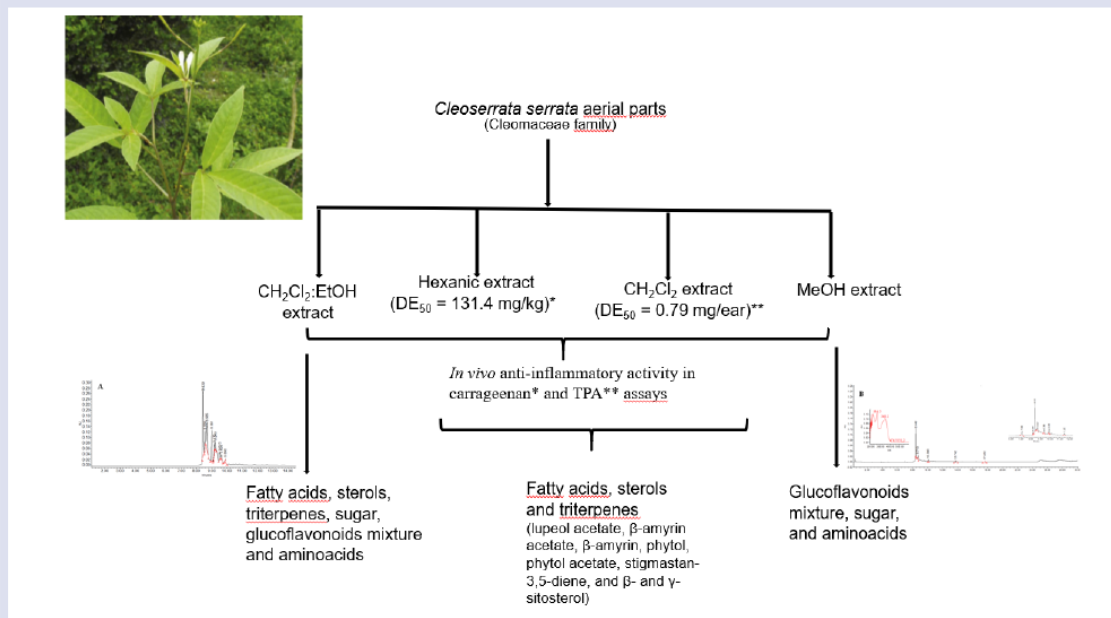
- De Armas LF, Núñez Aguila R. *Cleome serrata* (Cleomaceae): nueve planta hospedera de tres especies de lepidópteros (Lepidoptera Pieridae, Crambidae) en Cuba. Bol. SEA. 2011;(49):347-34.
- Guzmán-Vázquez I, Quintanar-Castillo A. Flora de Guerrero, no 74, Cleomaceae. 1ra ed. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
- Iltis HH, Cochrane TS. Studies in the Cleomaceae V: a new genus and ten new combinations for the flora of North America. Novon. 2007;17(4):447-51.

[https://doi.org/10.3417/1055-3177\(2007\)17\[447:SITCVA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3417/1055-3177(2007)17[447:SITCVA]2.0.CO;2)

4. Neto RLS, Barbosa MRDEV, Roalson EH. *Cleoserrata* (Cleomaceae): taxonomic considerations and a new species. *Phytotaxa*. 2017;324(2):179-86.
<https://doi.org/10.11646/phytotaxa.324.2.6>
5. Juárez-Vázquez MdelC, Jiménez-Arellanes MA. Phytochemical investigation, anti-inflammatory and antinociceptive activities from some species of Cleomaceae family: a systematic review. *Adv Med Plant Res*. 2019;7(4):107-28.
<https://doi.org/10.30918/AMPR.74.19.039>
6. Gómez-Alvarez R. Medicinal plants in a small village in the state of Tabasco, Mexico. *Rev Fitotec Mex*. 2012;35(1):43-49.
7. Alamilla-Fonseca LN, Delgado-Domínguez J, Zamora-Chimal J, Cervantes-Sarabia RB, Jiménez-Arellanes A, Rivero-Cruz JF, et al. *Leishmania mexicana* cell death achieved by *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis: learning from Maya healers. *J Ethnopharmacol*. 2018;211:180-87.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.037>
8. Arellano-Rodríguez JA, Flores-Guido JS, Tun-Garrido J, Cruz-Bojórquez MM. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. Fascículo 20. Etnoflora Yucatanense, Universidad Autónoma de Yucatán; 2003.
9. Caballero-George C, Gupta MP. A quarter century of pharmacognosy research on Panamanian flora: a review. *Planta Med*. 2011;77(11):1189-202.
<https://doi.org/10.1055/s-0030-1271187>
10. McNeil MJ, Porter RB, Williams LA. Chemical composition and biological activity of the essential oil from Jamaican *Cleome serrata*. *Nat Prod Commun*. 2012;7(9):1231-2.
<https://doi.org/10.1177/1934578X1200700934>
11. Silva RO, Sousa FB, Damasceno SR, Carvalho NS, Silva VG, Oliveira FR, et al. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundam Clin Pharmacol*. 2014;28(4):455-64.
<https://doi.org/10.1111/fcp.12049>
12. Kaya B, Menemen Y, Saltan FZ. Flavonoid compounds identified in *Alchemilla L.* species collected in the north-eastern Black Sea region of Turkey. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2012;9(3):418-25.
<https://doi.org/10.4314/ajtcam.v9i3.18>
13. López-Rodríguez R, Herrera-Ruiz M, Trejo-Tapia G, Domínguez-Mendoza BE, González-Cortazar M, Zamilpa A. In vitro gastroprotective and antidepressant effects of iridoids, verbascoside and tenuifloroside from *Castilleja tenuiflora* Benth. *Molecules*. 2019;24(7):1292.
<https://doi.org/10.3390/molecules24071292>
14. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*. 1995;28(1):25-30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
15. Miliuskas G, Venskutonis PR, VanBeek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*. 2004;85(2):231-37.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>
16. Pérez-González MZ, Gutiérrez-Rebolledo GA, Yépez-Mulia L, Rojas-Tomé IS, Luna-Herrera J, Jiménez-Arellanes MA. Antiprotozoal, antimycobacterial, and anti-inflammatory evaluation of *Cnidioscolus chayamansa* (Mc Vaugh) extract and the isolated compounds. *Biomed Pharmacother*. 2017;89:89-97.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.021>
17. Nieto-Meneses R, Castillo R, Hernández-Campos A, Maldonado-Rangel A, Matius-Ruiz JB, Trejo-Soto PJ, et al. In vitro activity of new N-benzyl-1H-benzimidazol-2-amine derivative against cutaneous, mucocutaneous and visceral *Leishmania* species. *Exp Parasitol*. 2018;184:82-9.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.11.009>
18. NOM-062-ZOO-1999. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 1999.
<https://www.dof.gob.mx>. Accessed 10 May 2020.
19. Pérez-González MZ, Macías-Rubalcava ML, Hernández-Ortega S, Siordia-Reyes AG, Jiménez-Arellanes MA. Additional compounds and the therapeutic potential of *Cnidioscolus chayamansa* (McVaugh) against hepatotoxicity induced by antitubercular drugs. *Biom Pharmacother*. 2019;117:1091140.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109140>
20. Higgins JP, Tuttle TD, Higgins CL. Energy beverages: content and safety. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(11):1033-41.
<https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0381>
21. Schönfeldt HC, Pretorius B. The nutrient content of five traditional South African dark green leafy vegetables-A preliminary study. *J Food Compos Anal*. 2011;24(8):1141-1146.
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.004>
22. Ahouansinkpo E, Atanasso J, Dansi A, Adjatin A, Azize O, Sanni A. Ethnobotany, phytochemical screening and toxicity risk of *Cleome gynandra* and *Cleome viscosa*, two traditional leafy vegetables consumed in Benin. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2016;5(2):813-829.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.502.093>
23. Agbo AE, Kouame C, Anin AOL, Soro LC, N'zi JC, Fondio L, et al. Seasonal variation in nutritional compositions of spider plant (*Cleome gynandra L.*) in south Côte d'Ivoire. *Int J Agric Res*. 2014;2(11):406-13. <http://dx.doi.org/10.15739/IJAPR.013>
24. Lavate SM, Kamble GS, Deshpande NR. Detection of amino acids from an edible *Cleome viscosa* seeds. *Int J Chemtech Res*. 2010;2(3):1761-3.
25. Mnzava NA. Studies on tropical vegetables. Part 2: Amino and fatty acid composition in seed of *Cleome (Gynandropsis gynandra L. Briq)* selections from Zambia. *Food Chem*. 1990;35(4):287-93.
[https://doi.org/10.1016/0308-8146\(90\)90018-Y](https://doi.org/10.1016/0308-8146(90)90018-Y)
26. Jiménez-Arellanes MA, Carrasco-Gamboa A, Zambrano-Vázquez OR, Meckes-Fischer M, Hernández-Portilla LB, Zamilpa A. Phytochemistry of *Cnidioscolus tehuacanensis* Breckon (Euphorbiaceae), an endemic Mexican plant with potential therapeutic benefits. *Am J Ethnomed*. 2018;5(1):6. DOI: 10.21767/2348-9502.10006
27. Pérez-González MZ, Siordia-Reyes AG, Damián-Nava P, Hernández-Ortega S, Macías-Rubalcava ML, Jiménez-Arellanes M. Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of the *Cnidioscolus chayamansa* (Mc Vaugh) leaf extract in chronic models. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018;2018:3896517.
<https://doi.org/10.1155/2018/3896517>
28. Ranjitha J, Bakiyalakshmi K, Anand M, Sudha PN. Phytochemical Investigation of n-Hexane Extract of Leaves of *Cleome gynandra*. *Asian J Chem*. 2009;21(5):3455-3458.
29. Ranjitha J, Shalma M, Donatus M, Vijayalakshmi S. Isolation of novel phytoconstituents from the stem part of *Cleome gynandra* Linn and their antimicrobial activity. *Int J Phytomed*. 2014;6(3):341-345.
30. Ndungu M, Lwande W, Hassanali A, Moreka L, Chhabra SC. *Cleome monophylla* essential oil and its constituents as tick (*Rhipicephalus appendiculatus*) and maize weevil (*Sitophilus zeamais*) repellents. *Entomol Exp et Appl*. 1995;76(3):217-22.
<https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1995.tb01965.x>

31. Francescato LN, Debenedetti SL, Schwanz TG, Bassani VL, Henriques AT. Identification of phenolic compounds in Equisetum giganteum by LC-ESI_MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. *Talanta*. 2013;105:192-203.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.072>
32. Fushiya S, Kishi Y, Hattori K, Batkhuu J, Takano F, Singab AN, Okuyama T. Flavonoids from *Cleome droserifolia* suppress NO production in activated macrophages in vitro. *Planta Med*. 1999;65(5):404-7.
<https://doi.org/10.1055/s-1999-14084>
33. Sharaf M, Mansour RMA, Saleh NAM. Exudate flavonoids from aerial parts of four *Cleome* species. *Biochem Syst Ecol*. 1992;20(5):443-8. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(92\)90084-Q](https://doi.org/10.1016/0305-1978(92)90084-Q)
34. Wollenweber E, Valant-Vetschera KM, Roitman JN. Chemodiversity studies on exudate flavonoids of *Cleomaceae* species (Brassicales). *Nat Prod Commun*. 2007; 2(10):997-1002.
<https://doi.org/10.1177/1934578X0700201006>
35. Ismail IS, Ito H, Selloum L, Hammama B, Yoshida T. Constituents of *Cleome arabica* leaves and twigs. *Natural Medicines*. 2005;59(1):53.
36. Ezzat SM, Motaal AA. Isolation of new cytotoxic metabolites from *Cleome droserifolia* growing in Egypt. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2012;67(5-6):266-74.
<https://doi.org/10.1515/znc-2012-5-605>
37. Nguyen PD, Sayagh C, Borie N, Lavaud C. Anti-radical flavonol glycosides from the aerial parts of *Cleome chelidonii* Lf. *Phytochemistry*. 2017;142:30-7.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.06.012>
38. Chakraborty AK, Charde MS, Roy H, Bhanja S, Behera M. Comparative study of antioxidant activity between ethanolic and aqueous extract of *Cleoserrata rutidosperma*. *Int J Pharm Sci Res*. 2010;1(11):112-6.
39. Ganga Rao B, Rajeswarara OP, Prayaga Murty P, Sambasiva Rao E, Madhukiran P, Mallinkarjuna Rao T, *et al.* Investigation on regional variation in total phenolic content, alkaloid content and *in-vitro* antioxidant activity of *Cleoserrata chelidonii* L. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(4):416-8.
40. Bamoniri A, Mazoochi A, Ebrahimabadi AH, Mirjalili BF, Behpour M, Safaei-Ghomi J, *et al.* Chemical composition by nano scale injection and antioxidant activity of *Cleome iberica* DC. *Optoelectron Adv Mat*. 2009;3(7):744-8.
41. Gupta PC, Sharma N, Rao ChV. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic, flavonoid content of aerial part of *Cleome viscosa* L. *Int J Phytomedicine*. 2011;3(3):386-91.
42. Aicha M, Nadia Z, Sihem H, Abdelmalik B. Antioxidant activity and phenolic compounds contents of spider flower (*Cleome arabica* ssp. *arabica*), a well acclimated species in the Algerian desert areas. *Eur Sci J*. 2017;13(12):102-18. <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n12p102>
43. Arthur FKN, Woode E, Terlabi EO, Larbie C. Evaluation of acute and sub-chronic toxicity of *Annona muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. *Eur J Exp Biol*. 2011;1(4):115-24.
44. Elufioye TO, Onoja JO. Acute toxicity and histopathological assessment of methanol extract of *Cleome viscosa* (Linn) whole plant. *J Med Plant Res*. 2015;9(11):360-9.
<https://doi.org/10.5897/JMPR2014.5756>
45. Senthamilselvi MM, Kesavan D, Sulochana N. An anti-inflammatory and anti-microbial flavone glycoside from flowers of *Cleome viscosa*. *Org Med Chem Lett*. 2012;2(1):19.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109140>
46. Bawankule DU, Chattopadhyay SK, Pal A, Saxena K, Yadav S, Faridi U, Darokar MP, Gupta AK, Khanuja SP. Modulation of inflammatory mediators by coumarinolignoids from *Cleome viscosa* in female swiss albino mice. *Inflammopharmacology*. 2008;16(6):272-277.
<https://doi.org/10.1007/s10787-008-8012-0>
47. Saeed NM, El-Demerdash E, Abdel-Rahman HM, Algandaby MM, Al-Abbasi FA, Abdel-Naim AB. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;264(1):84-93.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.020>
48. Paniagua-Pérez R, Flores-Mondragón G, Reyes-Legorreta C, Herrera-López B, Cervantes-Hernández I, *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assays. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2017;14(1):123-30.
<https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.13>

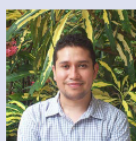
GRAPHICAL ABSTRACT



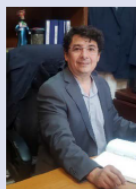
ABOUT AUTHORS



María del Carmen Juárez-Vázquez studied Biology at the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. She has postgraduate studies in Ciencias Biológicas, UNAM and is currently doing his PhD in Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM. Her research focuses on the search for anti-inflammatory and immunomodulatory alternatives from medicinal plants. Their results are published in some international journals.



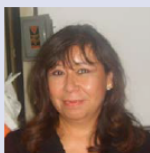
Adolfo López-Torres received his PhD in Chemistry from the Universidad de Guanajuato, Mexico in 2014 developing different methods to determinate global DNA and RNA methylation using HPLC-FLD and GC-MS. Adolfo is currently Lecturer in Analytical Chemistry at Universidad del Papaloapan, Mexico. His current research projects are focused on developing methodologies for metabolomic and proteomic analysis using HPLC-MS in organisms of biotechnological and biomedical interest.



Alejandro Zamilpa Researcher in the Department of Phytochemistry, CIBIS-IMSS. Specialization in the field of isolation and chemical characterization of bioactive compounds from medicinal plants. Has published several research papers on the solution of the mexican priority helth problems.



Dr. Lilián Yépez-Mulia Full time Researcher, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Research Lines: Evaluation of new giardicidal, trichomonocidal, leishmanicidal and trypanocidal compounds, characterization of their mechanism of action. Evaluation and Characterization of the activity of new tubulin depolymeration agents in cancer lines.



Dr. Julieta Luna Herrera Department of Immunology, Professor at Escuela Nacional de Ciencias Biológicas of Instituto Politécnico Nacional, México City, since 1995. Graduated in Chemistry Bacteriology and Parasitology. Master and Doctor in Science in Immunology. Postdoctoral research associate at Mycobacteriology Research Laboratory at the University of Illinois at Chicago from 1991-1995. Current research on antimycobacterial and antinocardia activities of medicinal plants and new compounds. Studies on immunomodulatory activities of medicinal plants and new compounds. Studies on drug resistant mechanisms in mycobacteria and nocardia.



Rosalba León-Díaz has a Ph.D. in Sciences, in the area of toxicology and experimental pathology, from the National Autonomous University of Mexico. She is currently a researcher at the Universidad Veracruzana, in the Biological Research Institute.



Professor Mariano Martínez-Vázquez currently works at the Institute of Chemistry of the National Autonomous University of Mexico. His main lines of research are to obtain possible drugs from nature with anticancer properties and against drug-resistant bacteria. So far, he has published 143 articles in international journals. He has been Visiting Professor at the Universities of Padova in Italy and Loja in Ecuador.



Francisco Javier Alarcón Aguilar, Ph.D. Titular Professor. Pharmacology Laboratory, Health Science Department, D.C.B.S. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Research topic: Pharmacology of medicinal plants and diseases related to metabolic syndrome. Aim: To perform pharmacological chemical research of natural products to a mechanistical level, incurring into the rational design of computer-assisted drugs and in general implementing cutting-edge techniques that allow the elucidation of its mechanisms of action at the molecular level. Achievements until July 2021: Research articles 1011; Thesis of grade: 50; International specialized scientific events 125; Upgrade courses 10; Awards 32; Citations to articles: more than 3500. Patents: 1.



Maria Adelina Jiménez Arellanes, I am a senior researcher at the Medical Research Unit in Pharmacology of the Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI, IMSS. The main line of research is explore the hepatoprotective and antitubercular potential of medicinal plants, their acute and subacute toxicity. She focuses on obtaining and identifying bioactive compounds from medicinal plants.

Cite this article: Juárez-Vázquez MdelC, Zamilpa A, León-Díaz R, Martínez-Vázquez M, López-Torres A, Luna-Herrera J, et al. Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory Potential of the Organic Extracts from *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis. *Pharmacogn J.* 2021;13(5): 1225-1241.

Productividad.

- Revisión aceptada: MdelC Juárez-Vázquez and M.A Jiménez-Arellanes (2019). Phytochemical investigation, anti-inflammatory and antinociceptive activities from some species of *Cleomaceae* family: A systematic review. *Advancement in Medicinal Plant Research* 7(4):107-128.
- Participación: XXVIII Congreso de la Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina SILAE, 2019.
- Participación: XXVIII Foro Nacional de Investigación en Salud, IMSS 2019.