

República de Cuba

**Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Naturales
Departamento de Farmacia**

Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria.

Tesis en opción al título de Doctor en
Ciencias de la Salud

Autor: Julio César Escalona Arranz

Santiago de Cuba

2011

República de Cuba

**Universidad de Oriente
Facultad de Ciencias Naturales
Departamento de Farmacia**

Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. como premisa para su introducción en la medicina complementaria.

Tesis en opción al título de Doctor en
Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Julio César Escalona Arranz, MSc.

Tutores: Dr. Cs. Gustavo V. Sierra González

Dr. C. Humberto J. Morris Quevedo

Santiago de Cuba

2011

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre, el que sin dudas se enorgullecería por lo hoy acaecido.

A mis hijas, por todo el tiempo que les robé para la realización de este, mi proyecto. Ojalá les sirva de luz a sus futuros.

A mi madre, esposa y hermano, por respaldar con su tiempo y trabajo mi dedicación a esta obra.

A la memoria de mi entrañable amigo Dr. Jorge Sierra Calzado, constructor de mi fe científica.

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo, sólo fue posible gracias a la combinación simultánea de esfuerzos científicos, espirituales y logísticos, para cada uno de los cuales dispuse de valiosas manos y mentes comprometidas en el empeño de hacer posible esta empresa.

Deseo agradecer:

Ante todo a mi madre, esposa, hermano y demás familiares; por todo el apoyo moral, espiritual y logístico. Por cubrir todos aquellos frentes que, para la realización de este largo viaje, debí mostrar menor atención.

A mi amigo Renato Pérez Roses, por su invaluable ayuda y por estar siempre disponible a dar cualquier apoyo. Por creer siempre en la materialización de este resultado, ojalá pronto puedas defender el tuyo.

A mi tutor Dr. Humberto Morris Quevedo, por sus sabios consejos, disponibilidad y por su nivel de compromiso en la redacción del documento aquí presentado.

A mi tutor Dr. Gustavo V. Sierra González, por haber confiado en mi desde el primer momento en que nos conocimos (2007). Por dar valor y fe a mi empeño.

A Jesús Rodríguez Amado, por ofrecer extensión a los resultados aquí presentados y cubrir parte de mis responsabilidades departamentales, por las largas noches de impresión y debate científico. A Ariadna.

A todos mis compañeros del departamento de Farmacia de la Universidad de Oriente, por hacerme sentir parte de esa familia que siempre hemos formado. Por sus consejos, tiempo y acertadas opiniones. A Marín, Niurka, Mara, Ania, Lisette, Idelsis, Ivette, Aurora, Rosario, Pupito, Carlos, Leonor, Tania, Yamilé y Lourdes.

A Dayamí Fernández Fernández, por haber creído siempre en que este proyecto se materializaría.

Al Dr. Luis Bergues, por sus acertadas opiniones y disposición incondicional de ayuda.

Al Dr. Marco Antonio Dehesa González, por iniciarme como profesional de la investigación y como profesor.

Al Dr. Ramón Carrasco Velar, por su desinteresada ayuda durante mis largas estancias en la capital. Por ser mi profesor, educador y amigo.

A trabajadores del centro de Química Farmacéutica, al Dr. Rolando Pellón, Dr. Raúl Capote y en especial a Juan Agüero Agüero, por su contribución en la caracterización química de las estructuras.

A colegas del Departamento de Química por su tiempo en extensas discusiones científicas. A la Dra. América García y Dr. Armando Ferrer, al profesor Carlos Ricardo, a Roberto Machado y en especial al Dr. Jorge Acevedo Martínez.

Al colectivo de trabajadores del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) por su contribución en la determinación de la actividad antimicrobiana, en especial a la Licenciada Miladis Isabel Camacho.

Al Lic. Humberto Argota Coello (Laboratorio Geominero Oriente), por su contribución en las determinaciones de microelementos en las muestras.

A todo el personal de la Dirección de la Facultad de Ciencias Naturales. Al Dr. Bernardo Reyes, a la Dra. Rosa María Pérez y a la Lic. Marbelis por el apoyo logístico del proyecto.

A colegas de Toximed, en especial a Tito y Lidia, por su solidaridad y compromiso con el trabajo.

Al Instituto Finlay y al Tribunal de Ciencias Básicas Médicas, por convertirme en uno de los suyos.

A la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado de la Universidad de Oriente, por contribuir a la realización de esta defensa en los predios de mi querida Universidad de Oriente.

A los doctores Magalys Casals, y Luis Riverón, por sus sabias y oportunas recomendaciones en su función como oponentes de la predefensa del trabajo.

A todos los integrantes del tribunal de Predefensa, por lo ético y pertinente de su función. Al Dr. Armando Cuellar Cuellar por sus juiciosas observaciones.

Muy especialmente a todos mis estudiantes que formaron parte de esta familia del Tamarindo, a Janet Vidal, Leonardo Rondón, Mónica Escudero, Irina Licea, Ernesto Nápoles, Javier Cañizares, Imilci Urdaneta, Roberto Rodríguez, Yaimara González, Adolfo Ramos, Lincoln Mwasi, Orestes Cabrera y Jesús García, por sus aportes en la realización de las tareas experimentales.

A todos los mencionados y a los que por involuntaria omisión no aparecen en esta lista, de verdad, a todos MUCHAS GRACIAS.

SINTESIS

El tamarindo (*Tamarindus indica* L.) es reconocido por su utilidad medicinal; sin embargo, no todos los órganos de la planta han sido estudiados con igual profundidad. Sus hojas son empleadas en el tratamiento de afecciones hepáticas e infecciosas, aunque no existen evidencias científicas de su composición química y efectividad terapéutica que respalden su uso etnobotánico. En el presente trabajo, se desarrolló un estudio fitoquímico de las hojas de *Tamarindus indica* L., identificando un total de 35 metabolitos, 21 de los cuales constituyeron un primer informe a nivel mundial. Las principales familias de compuestos estuvieron representados por: aceites esenciales, ácidos grasos y compuestos polifenólicos, principalmente flavonoides. La evaluación de las condiciones de extracción de las sustancias activas permitió diseñar un método sencillo, económico y eficiente, que combina la utilización de etanol al 70% como solvente y un tiempo de humectación de 90 minutos, para la obtención de extractos con elevadas concentraciones de metabolitos y una fracción significativa de minerales, entre ellos el selenio. La caracterización de la formulación (extracto fluido) preparada en estas condiciones, evidenció diferencias en las concentraciones de los compuestos mayoritarios en las diversas etapas del ciclo de vida de la planta, observando la mayor acumulación de metabolitos durante la fructificación. El extracto fluido se fraccionó en cuatro preparados, de distinta polaridad y naturaleza química, para la evaluación *in vitro* de su actividad antioxidante y antimicrobiana. Se demostró que el extracto fluido posee una buena actividad antioxidante en los modelos *in vitro* ensayados, en varios de ellos a concentraciones inferiores a sus fracciones. La actividad antimicrobiana, por su parte, se asoció a la acción directa de los componentes presentes en los extractos y no a la estimulación del sistema del complemento. Las dos actividades farmacológicas estudiadas no dependieron exclusivamente de la concentración de fenoles y flavonoides, como sugerían trabajos anteriores. Los resultados de la tesis permiten relacionar por vez primera, el fitocomplejo en cuestión con la actividad antioxidante y antimicrobiana que sustenta el empleo etnobotánico de las hojas de *Tamarindus indica* L.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
Capítulo I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
I.1 Metodología de investigación en plantas medicinales. Ruta Crítica	6
I.2 <i>Tamarindus indica</i> L. Descripción botánica, clasificación taxonómica y aplicaciones etnomedicinales	8
I.3 Procedimientos empleados en la extracción, aislamiento y caracterización de productos de especies vegetales	10
I.3.1 Métodos de extracción, aislamiento y caracterización empleados en la separación de los fitocomponentes de las hojas de <i>Tamarindus indica</i> L.	12
I.3.2 Principales metabolitos aislados en otros órganos de <i>Tamarindus indica</i> L.	14
I.4 Evaluaciones fármaco-toxicológicas de <i>Tamarindus indica</i> L.	15
I.4.1 Estudios farmacológicos <i>in vitro-in vivo</i> de las hojas de <i>Tamarindus indica</i> L.	15
I.4.2 Principales propiedades farmacológicas evaluadas en otros órganos de <i>Tamarindus indica</i> L.	17
I.4.2.1 Perfil antioxidante	17
I.4.2.2 Perfil antimicrobiano	18
I.4.2.3 Perfil inmunomodulador	18
I.4.2.4 Regulación del equilibrio mineral y de las propiedades biofarmacéuticas	19
I.4.3 Estudios toxicológicos de <i>Tamarindus indica</i> L.	20
I.5 Consideraciones generales sobre el estrés oxidativo	21
I.5.1 Fuentes y mecanismos generadores de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)	22
I.5.2 Mecanismos antioxidantes del organismo humano	25
I.5.3 Efectos del estrés oxidativo en la salud humana	26
I.6 Productos vegetales en la terapia antioxidante	27
Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS	29
II.1 Material Vegetal	29
II.2 Caracterización fitoquímica de extractos totales de las hojas	29
II.2.1 Extracción en Soxhlet con cloroformo. Análisis por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (CG/EM)	30
II.2.2 Extracción de los componentes volátiles por hidrodestilación. Análisis por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (CG/EM)	30
II.2.3 Extracción con solventes de mediana y alta polaridad. Tamizaje Fitoquímico y cuantificación de metabolitos secundarios	31
II.2.4 Análisis de elementos minerales por Espectrometría de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP)	32

II.3	Influencia de la concentración de etanol y el tiempo de humectación en el proceso de extracción de metabolitos	33
II.3.1	Selección del solvente con mayor capacidad de extracción de metabolitos	33
II.3.2	Evaluación de la influencia de la concentración de etanol y tiempo de humectación en el proceso extractivo	34
II.4	Formulación y caracterización del extracto fluido en etanol al 70 %	35
II.4.1	Formulación de los extractos fluidos. Características organolépticas	35
II.4.2	Caracterización físico-química de los extractos fluidos en etanol al 70 %	36
II.4.3	Caracterización química general del extracto fluido en etanol al 70 %	36
II.4.4	Fraccionamiento químico del extracto fluido en etanol al 70 %. Caracterización espectroscópica	36
II.5	Evaluación de la actividad antioxidante del extracto fluido y sus fracciones	37
II.5.1	Actividad frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH)	37
II.5.2	Determinación del Poder Reductor	38
II.5.3	Determinación de la capacidad de acomplejamiento de Fe ²⁺	39
II.5.4	Determinación del porcentaje de inhibición de la producción de Oxido Nítrico (NO [•])	40
II.5.5	Determinación del porcentaje de inhibición de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en leucocitos humanos por Citometría de Flujo	41
II.6	Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto fluido y sus fracciones	42
II.6.1	Cepas microbianas y sustancias controles	43
II.6.2	Pruebas de susceptibilidad microbiana. Acción antimicrobiana directa	43
II.6.2.1	Ensayo de difusión en disco	43
II.6.2.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB)	44
II.6.2.3	Correlación de la actividad con la composición de polifenoles y flavonoides	45
II.6.3	Actividad <i>in vitro</i> sobre el sistema del complemento. Acción antimicrobiana indirecta	45
II.7	Análisis estadístico	46
	Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
III.1	Caracterización fitoquímica de extractos de hojas de <i>Tamarindus indica</i> L.	48
III.1.1	Extracción en Soxhlet con cloroformo. Análisis por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (CG/EM)	48
III.1.2	Extracción de los componentes volátiles por hidrodestilación. Análisis por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (CG/EM)	50
III.1.3	Extracción con solventes de mediana y alta polaridad. Tamizaje Fitoquímico y cuantificación de metabolitos secundarios	51
III.1.4	Análisis de elementos minerales por Espectrometría de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP)	52

III.2	Influencia de la concentración de etanol y tiempo de humectación en el proceso de extracción de metabolitos	53
III.2.1	Selección del solvente con mayor capacidad de extracción de metabolitos	53
III.2.2	Evaluación de la influencia de la concentración de etanol y tiempo de humectación en el proceso extractivo	55
III.3	Formulación y caracterización de los extractos fluidos en etanol al 70 %	59
III.3.1	Formulación de los extractos fluidos. Características organolépticas	59
III.3.2	Caracterización físico-química del extracto fluido en etanol al 70 %	59
III.3.3	Caracterización química del extracto fluido en etanol al 70 %	60
III.3.4	Fraaccionamiento químico del extracto fluido en etanol al 70 %. Caracterización espectroscópica	63
III.4	Evaluación de la actividad antioxidante del extracto fluido y sus fracciones	68
III.4.1	Actividad frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH)	68
III.4.2	Determinación del Poder Reductor	72
III.4.3	Determinación de la capacidad de acomplejamiento de Fe ²⁺	75
III.4.4	Determinación del porcentaje de inhibición de la producción de Oxido Nítrico (NO [•])	79
III.4.5	Determinación del porcentaje de inhibición de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en leucocitos humanos por Citometría de Flujo	81
III.5	Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de las hojas de <i>Tamarindus indica</i> L., y del extracto fluido al 70 % y sus fracciones	83
III.5.1	Pruebas de susceptibilidad microbiana. Acción antimicrobiana directa	84
III.5.1.1	Ensayo de difusión en disco	84
III.5.1.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB)	86
III.5.1.3	Correlación de la actividad con la composición de polifenoles y flavonoides	87
III.5.2	Actividad <i>in vitro</i> sobre el sistema del complemento. Acción antimicrobiana indirecta	89
	CONCLUSIONES	92
	RECOMENDACIONES	93
	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	94
	ANEXOS	I
	BIBLIOGRAFIA DEL AUTOR	XXIX

Control Semántico

Droga: Todo producto de origen natural que recolectado o separado de su medio tiene una composición y unas propiedades tales que dentro de su complejidad constituye la forma bruta de un medicamento.

Droga fresca: El término “fresco” se aplica a aquellas drogas cuyo tiempo de separación o recolección de su medio no excede las tres horas, conservando casi intactas sus propiedades iniciales.

Droga cruda: El término “crudo” se aplica a aquellas drogas que no han sufrido otro proceso que no sea la recolección y el secado para su correcto empaquetamiento y preservación hasta el preciso momento de su elaboración. Se acepta también el término droga seca.

Decocción: Procedimiento extractivo en el cual la droga es extraída por ebullición en agua por al menos 5 minutos. El resultado de este proceso extractivo es también conocido como decocción.

Percolación o lixiviación: Procedimiento extractivo que consiste en el paso del mensturo en repetidas ocasiones a través de la droga cruda, previamente humectada, que se encuentra en el percolador.

Extracto Fluido: Formulación farmacéutica obtenida mediante la remoción de los componentes activos de las drogas respectivas con menstros apropiados, la evaporación de todo o casi todo el solvente y el ajuste de las masas o polvos residuales para que cumplan las normas prescriptas, en la cual cada mililitro de extracto equivale a 1 gramo de la droga.

Aceites esenciales: Compuestos de naturaleza volátil y olorosa producido por un reducido número de especies vegetales. Desde un punto de vista químico, se presentan en dos grandes grupos: los de naturaleza terpenoide (principalmente monoterpenos, sesquiterpenos y algunos diterpenos) y los de naturaleza aromática (derivados principalmente del fenilpropano). No todos los compuestos volátiles producidos por las plantas resultan aceites esenciales.

INTRODUCCIÓN

La medicina natural es un campo terapéutico que parte de la integración del hombre a la naturaleza, constituyendo así una vía para contrarrestar los efectos adversos de los productos farmacéuticos obtenidos mediante la síntesis química. Su aplicabilidad en la terapéutica actual, le permite ser considerada como una de las más importantes modalidades de la medicina complementaria. Numerosas enfermedades son tratadas con productos fitofarmacéuticos o derivados de los mismos, fundamentalmente aquellas de origen infeccioso y las resultantes del desequilibrio REDOX del organismo. Más del 80% de los antimicrobianos empleados hoy en día proviene de fuentes naturales, mientras que la casi totalidad de las especies antioxidantes tiene un origen vegetal. Ello es causado por la necesidad intrínseca de las plantas de disponer de un mecanismo de protección, en un ambiente caracterizado por una naturaleza oxidante (atmósfera oxigenada) y una diversidad microbiana patógena, para garantizar su adaptación al medio. En consecuencia, las especies vegetales son capaces de producir y bioprocasar un sinnúmero de metabolitos y elementos inorgánicos, que han sido extraídos y empleados empíricamente durante siglos por la población mundial en el tratamiento de estas patologías.

Cuba cuenta con una flora variada y abundante en la que se hallan numerosas especies con propiedades medicinales, entre las que se encuentra el tamarindo (*Tamarindus indica* L.). En nuestro país, esta planta crece de manera espontánea a lo largo de toda la isla, aunque se le suele observar cultivada formando parte de sistemas de cortinas rompe vientos.

El valor medicinal del tamarindo ha sido reconocido desde la antigüedad. La pulpa de su fruto es mencionada en el tradicional Sánscrito¹, y ha sido incluida además, en varias farmacopeas occidentales como un laxante eficaz. Más recientemente, a partir de las semillas ha sido aislado un xiloglicano, objeto de numerosas investigaciones y patentes^{2,3}. Sin embargo, la distribución de los estudios realizados por órganos no resulta homogénea, pues las hojas, tallos, corteza, flores y raíces han sido poco abordados, tanto desde el punto de vista químico como farmacológico. En consecuencia, su composición y potencialidades como fitofármaco se desconocen en gran medida. De este modo, y a pesar del elevado número de artículos científicos publicados relacionados con el fruto y las semillas, el tamarindo es considerado en la actualidad como un cultivo subutilizado, según el compendio editado por el Centro de Estudios de Cultivos Subutilizados de la Universidad de Southampton, Reino Unido⁴.

Desde el punto de vista etnobotánico, tanto a nivel internacional como en Cuba, el tamarindo es de reconocido empleo para combatir desórdenes hepáticos^{5,6,7}. Al respecto, esta especie figura entre las catorce recomendadas para el tratamiento de las disfunciones hepáticas según el *Green Pharmacy Herbal Handbook*⁸.

Las hojas de la planta constituyen el órgano al que con más frecuencia se le atribuye la actividad hepatoprotectora, aunque en Cuba la población emplea, además, la corteza del tallo y las raíces. Otro uso de las hojas documentado internacionalmente se relaciona con la actividad antimicrobiana⁹; sin embargo, las referencias del empleo del tamarindo con estos fines en Cuba son muy limitadas, a diferencia de países étnica y geográficamente cercanos como Puerto Rico, México, y Trinidad y Tobago^{10,11}.

Los estudios desarrollados en Cuba, en un modelo experimental de toxicidad hepática con tetracloruro de carbono (CCl₄), demostraron la actividad hepatoprotectora de la decocción de las hojas frescas¹², aunque su efectividad resultó menor en comparación con la de un extracto fluido en etanol al 80%. Además, fueron evaluadas dos fracciones del extracto fluido ricas en flavonoides, las que resultaron tan activas como el extracto de partida¹³. En este sentido, se ha sugerido que la actividad hepatoprotectora de las hojas de la especie se asocia con un mecanismo antioxidante, y que son las fracciones fenólicas y flavonólicas las responsables de dicha actividad. Ello fue evidenciado a través de dos técnicas químicas: la inhibición del radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH) y la inhibición del radical superóxido (O₂⁻)¹⁴. Estas propiedades antioxidantes potenciales representarían además, una opción a considerar como alternativa terapéutica de diferentes patologías asociadas al estrés oxidativo que constituyen en la actualidad un problema de salud. Se ha postulado también, a través de un estudio por difusión en placa, que las fracciones de fenoles y flavonoides podrían ser las responsables de la actividad antimicrobiana informada en la especie.

Los ensayos anteriores han sido realizados a un extracto obtenido con un menstruo seleccionado teóricamente (etanol 80%), para lograr una mayor extracción de los compuestos flavonólicos, ignorando la riqueza y diversidad de sustancias producidas por las hojas del tamarindo y su posible influencia en las actividades etnobotánicas descritas en la especie. Múltiples son los mecanismos informados, por los cuales una sustancia o grupo de sustancias podrían ejercer su efecto antioxidante y/o antimicrobiano. De este modo, la variedad química de los metabolitos responsables de estas propiedades resulta sin dudas, extraordinaria.

Estos antecedentes destacan la necesidad de estudios más profundos que posibiliten determinar la naturaleza química de los metabolitos producidos por las hojas del tamarindo, y en consecuencia seleccionar un mensturo que logre una extracción más efectiva, tanto cualitativa como cuantitativamente. Ello permitiría la preparación de un extracto que concentre metabolitos con una elevada potencialidad farmacológica, y la evaluación a partir del mismo de las propiedades etnobotánicas descritas para las hojas de la especie en estudio, contribuyendo al esclarecimiento de los posibles mecanismos de acción antioxidante y/o antimicrobiana.

Por este motivo, la tesis aborda como **Problema Científico**:

El pobre conocimiento de la naturaleza fitoquímica de los compuestos presentes en las hojas de *Tamarindus indica* L. y las insuficientes evidencias experimentales de su actividad farmacológica antioxidante y antimicrobiana, limitan la fundamentación científica de su empleo etnobotánico y el desarrollo de formulaciones farmacéuticas enriquecidas en metabolitos bioactivos con potenciales aplicaciones terapéuticas.

A partir de este problema, se formuló la siguiente **hipótesis** de trabajo:

La exploración de la diversidad fitoquímica presente en las hojas de *Tamarindus indica* L. permitirá relacionar el fitocomplejo en cuestión con la actividad antioxidante y antimicrobiana que sustenta el empleo etnobotánico de la especie, como premisa para su introducción en la medicina complementaria.

El presente trabajo tuvo como **objetivo general**:

- Evaluar desde el punto de vista fitoquímico y pre-clínico, las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Para cumplimentar este objetivo general se trazaron los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Caracterizar químicamente los principales metabolitos producidos y los elementos inorgánicos bioprocesados por las hojas de la especie.
- 2) Evaluar la influencia de los parámetros concentración de etanol y tiempo de humectación en el proceso de extracción de metabolitos activos de las hojas de *Tamarindus indica* L., para su utilización en la preparación de una forma farmacéutica.

- 3) Caracterizar una forma farmacéutica con elevada concentración de principios activos y las fracciones obtenidas a partir de ésta, en diversas etapas del ciclo de vida de la planta.
- 4) Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* del extracto obtenido de las hojas de *Tamarindus indica* L. y sus fracciones en modelos químicos y celulares.
- 5) Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto obtenido de las hojas de *Tamarindus indica* L. y sus fracciones, a través de ensayos de inhibición del crecimiento de cepas microbianas y el estudio de la activación del sistema del complemento humano.

Diversos aspectos destacan la **novedad científica** de los resultados de esta tesis:

1. La exploración fitoquímica de las hojas de *Tamarindus indica* L. permitió la identificación de un elevado número de compuestos químicos estructuralmente diversos y de elementos inorgánicos. De ellos, veintiuno constituyen una primera referencia mundial para la especie y/o para el órgano en estudio.
2. Se establecen, por primera vez en Cuba, las condiciones de extracción para un conjunto de metabolitos potencialmente activos de las hojas de *Tamarindus indica* L., ofreciendo elementos esenciales en la formulación de un preparado farmacéutico de potencial actividad farmacológica.
3. Se demuestra la actividad antioxidante de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L., a través de tres ensayos químicos y dos empleando células humanas. Los resultados informados en la tesis en células humanas constituyen un primer informe en el mundo.
4. Se fundamenta, por primera vez en Cuba, la actividad antimicrobiana de las hojas de *Tamarindus indica* L., no sólo desde su diversidad fitoquímica, sino también desde un mecanismo directo de acción (inhibición del crecimiento de cepas microbianas) y un mecanismo indirecto (activación del sistema del complemento humano). Este enfoque integral en la interpretación de la actividad antimicrobiana de las hojas de tamarindo, se informa por primera vez en el mundo.

La **importancia teórica** de esta tesis radica en el aporte de nuevos conocimientos sobre la composición fitoquímica de las hojas de *Tamarindus indica* L., lo que permite establecer las condiciones de extracción de los metabolitos con mayor interés farmacológico. Por otra parte, ofrece evidencias científicas que permiten justificar el empleo de formulaciones con actividad antioxidante y antimicrobiana, propiedades éstas en las que se fundamenta el uso etnobotánico de la planta por la población cubana y de otras áreas geográficas. En la tesis se presenta además, una visión sinérgica e integradora acerca del mecanismo de acción

potencial de varios tipos de metabolitos de la planta en las actividades farmacológicas de mayor relevancia.

Desde el punto de vista práctico, la investigación ofrece **aportes sociales y económicos**. El conocimiento de la composición química de las hojas del tamarindo que crece en Cuba, así como la evaluación experimental de su actividad antioxidante y antimicrobiana, permite sustentar sobre bases científicas el empleo de esta planta por nuestra población proponiendo una alternativa para el tratamiento de las múltiples enfermedades asociadas al desbalance REDOX del organismo, que constituyen hoy en día importantes problemas de salud. La extensión de estos resultados a otros sistemas experimentales, permitiría desarrollar nuevos productos nacionales con posibilidades futuras de registro y comercialización.

La tesis cuenta con 93 páginas distribuidas en: introducción, revisión bibliográfica, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones y recomendaciones. El trabajo contiene, además: una síntesis, una tabla de contenidos, las referencias bibliográficas consultadas, 25 tablas, 18 figuras y 4 anexos.

Los resultados que reúne la presente investigación se han presentado en 9 eventos científicos y están incluidos en 6 artículos publicados en revistas nacionales e internacionales. Estos resultados han sido reconocidos como logro científico de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente (2007), premio en el Fórum Nacional Estudiantil de Ciencia y Técnica (2008) y formó parte del dossier premiado como el logro científico de mayor aporte social de la Universidad de Oriente (2010). La tesis se pre-defendió ante el Consejo Científico de la Universidad de Oriente, del Instituto Finlay, e invitados del Consejo Científico del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas Victoria de Girón y del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) de la Universidad de La Habana.

Capítulo I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Metodología de investigación en plantas medicinales. Ruta Crítica

Desde tiempos remotos, las especies vegetales han sido empleadas con fines terapéuticos en el tratamiento de diferentes enfermedades con magníficos resultados, basado fundamentalmente en las experiencias empíricas de generaciones precedentes. Este amplio uso se mantiene en nuestros días; sin embargo, el desarrollo alcanzado por la ciencia actual exige de una investigación científica que garantice el uso racional de las plantas medicinales. En este sentido, Cuba ha establecido un Programa Nacional de Medicina Tradicional que regula, entre otras cuestiones, las investigaciones científicas con las Plantas Medicinales, estableciendo criterios que unifican las etapas principales que comprende una investigación en este campo. Ello se conoce como “Ruta Crítica de Investigación en Plantas Medicinales”, la cual constituye una guía metodológica de carácter orientador. Los aspectos más importantes que abarca son los siguientes¹⁵:

- I. Selección de las especies: Se deben considerar varios factores, entre ellos: la información bibliográfica existente, la disponibilidad de la especie, la factibilidad de su cultivo y el problema de salud que la planta podría resolver.
- II. Identificación botánica: Debe realizarse por un especialista acreditado en la temática. Se conservará una muestra herbaria de consulta. De particular importancia resulta además, declarar la parte de la planta en estudio, el estado dentro de su ciclo de vida, fechas, lugares y horas de la recolección.
- III. Caracterización fitoquímica mínima de las preparaciones: Deben considerarse los siguientes aspectos: tamizaje fitoquímico, preparación de extractos similares a la forma de uso tradicional siguiendo métodos farmacéuticos reconocidos (decocción, percolación, etc.) y atendiendo a las Normas Ramales establecidas. Se deben preparar extractos de polaridad diversa, los cuales deben reunir un mínimo de requisitos que garanticen la calidad y estabilidad de forma cualitativa y semicuantitativa. Estos extractos se emplearán para realizar las pruebas farmacológicas y toxicológicas.
- IV. Estudio farmacológico I (preclínico-farmacológico): Se corroboran o identifican la o las acciones farmacológicas a investigar de la planta. Debe considerarse el empleo de modelos experimentales adecuadamente validados, utilizando siempre un control positivo de la actividad. También deberán considerarse extractos que difieran

marcadamente en su composición a diversos niveles de concentración o dosis. En ensayos con animales, los mismos deben proceder de bioterios estandarizados.

- V. Estudio toxicológico I: Se evalúa preliminarmente la posible toxicidad aguda y genotoxicidad del extracto de la planta con actividad farmacológica demostrada. Debe considerarse el empleo de modelos experimentales validados, con un control positivo de la actividad. Se han de evaluar dosis del extracto considerablemente superiores a las que pudieran exponerse en el hombre. Se debe garantizar el trabajo con animales sanos, procedentes de bioterios estandarizados, y el empleo de cepas reconocidas de microorganismos para la evaluación genotóxica, particularmente la evaluación de inducción de daño primario en el DNA.
- VI. Estudios farmacognósticos y fitoquímicos (continuación): Se desarrollan paralelamente a las siguientes tres etapas. Se trabajará en la determinación de la naturaleza química del (los) principio(s) activo(s) y su obtención. Se caracterizará farmacognósticamente la planta o parte a emplear, desarrollando además, métodos que permitan obtener las especificaciones de calidad del extracto activo, con vista a su normalización. Para ello se deben desarrollar técnicas analíticas para la determinación de la concentración de los compuestos relacionados con la acción farmacológica. También se realizarán estudios de dinámica de acumulación de los principales tipos de metabolitos.
- VII. Preparado farmacéutico: Su objetivo es elaborar la(s) forma(s) farmacéutica(s) más adecuada(s), atendiendo a la(s) indicación(es) y la(s) vía(s) de administración. En este aspecto quedan incluidos todos los estudios que requieren su estandarización.
- VIII. Agrotecnia: Su objetivo es desarrollar los estudios agrobiológicos necesarios que permitan garantizar el material vegetal para la introducción del resultado, incluida la comercialización en el sistema de salud.
- IX. Fitotecnia: Se determinan los aspectos técnicos fundamentales que deberán ser abordados en una investigación para elaborar el paquete tecnológico de la especie en cuestión, los que dirigirán su explotación a gran escala.
- X. Estudio farmacológico II: Esta fase completa los estudios farmacológicos preclínicos iniciados en la farmacología I, que evalúan la farmacodinamia y, de ser posible, su farmacocinética. También se determinan la dosis efectiva, el índice terapéutico o margen de seguridad, la potencia o actividad relativa, el mecanismo y la duración de la acción.

- XI. Estudio toxicológico II. Esta fase completa los estudios preclínicos iniciados en la toxicología I. Debe incluir el estudio de la toxicidad subcrónica, además de otras pruebas como toxicidad crónica, y carcinogénesis, entre otras.
- XII. Obtención del Principio Activo (P.A): Se debe obtener el o los principios activos responsables de la acción terapéutica atribuida a la planta, y en cuyas investigaciones se está trabajando, desde que finalizaron los estudios farmacológicos y toxicológicos I.
- XIII. Ensayo clínico: Se debe evaluar inequívocamente la actividad terapéutica y efectos secundarios en el humano, siguiendo las regulaciones vigentes del MINSAP.
- XIV. Registro y normalización. Los requisitos a cumplir serán los establecidos por el Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) y la Dirección de Normalización, Metrología y Control de la Calidad (NMCC) del MINSAP. La documentación será sometida a la comisión evaluadora designada al efecto.
- XV. Farmacovigilancia: Estos estudios se realizarán por el Registro Nacional de Farmacovigilancia de la Dirección Nacional de Farmacología.

Estas regulaciones nacionales están acordes con las directivas internacionales sobre el estudio de las plantas medicinales^{16,17,18,19}.

I.2 *Tamarindus indica* L. Descripción botánica, clasificación taxonómica y aplicaciones etnomedicinales

Esta especie es un árbol inerme, de hasta 25 m de altura, con un tronco de 1,5 m de grosor y ramas ampliamente extendidas. Las hojas miden de 6 a 12 cm de largo, son alternas y pinnadas, y están formadas por muchos pares de folíolos lineales (de 10 a 18 pares) de hasta 20 mm de longitud. Es una planta muy longeva pudiendo superar los 100 años de edad.

Se plantea que es una especie originaria del África tropical, difundida por el cultivo en los trópicos de ambos hemisferios. El tamarindo crece en el África ecuatorial-tropical y se cultiva en todos los países de clima cálido y templado con un régimen de precipitaciones entre 800 y 1400 mm al año. Se desarrolla preferentemente en suelos de pH comprendido entre 6,5 y 7,5, aunque puede lograr la fase vegetativa incluso en suelos ácidos, pobres en nutrientes. Tolera desde un suelo aluvial profundo hasta un suelo rocoso y poroso²⁰.

El tamarindo es una especie monogenérica. Su ubicación taxonómica es la siguiente²¹:

Reino: *Plantae*
Subclase: *Rosidae*
Supraorden: *Eurosidae I*
Orden: *Fabales*.
Familia: *Fabaceae*.
Subfamilia: *Caesalpinioideae*
Género: *Tamarindus*
Especie: *Tamarindus indica* Linneo.



Esta planta es reconocida y empleada desde tiempos remotos. Existen evidencias documentadas de su cultivo en Egipto desde el año 400 AC. En Grecia, el sabio Theophrastus escribió en dos ocasiones sobre el tamarindo entre los años 370-287 AC. El tamarindo es mencionado en las escrituras santas del Brahmasamhita (1200-200 AC). Los comerciantes árabes lo introdujeron en Europa, cuando en sus peregrinaciones lo adquirían en la India; es por eso, que durante mucho tiempo se le conoció como “Tamarindo de la india”. El nombre deriva del árabe "tamare" = dátil, e "hindi" = indio, que significa dátil de la India, siendo éste el que le dio origen a su nombre botánico: *Tamarindus indica* L. Las propiedades de su fruto ya eran conocidas en Occidente en la edad antigua, aunque su primera descripción con estos fines la realizó Marco Polo en 1298. Otros informes indican que hacia el 1500 las decocciones del fruto eran utilizadas como purgantes, en las fiebres gástricas inflamatorias, en la ictericia y en la disentería⁴. Su introducción en el nuevo mundo debió realizarse entre 1700 y 1800 con las primeras expediciones de botánicos eslavos desde el África hacia la América. Según Roig⁶, la especie se naturalizó en nuestro país y se encuentra subespontáneamente en muchos lugares de la isla.

La acidez de su fruto y de sus hojas se debe principalmente a la presencia de ácido tartárico, ácido cítrico y ascórbico. El uso del fruto en bebidas refrescantes es muy saludable, pues su pulpa también es rica en el complejo vitamínico B. Se emplea además, en preparaciones culinarias como acidulante²². Sus hojas son utilizadas como colorante y como fuente nutricional en ensaladas, aprovechando sus elevados niveles de vitaminas y en menor medida, proteínas. Las semillas secas y pulverizadas son utilizadas como agentes formadores de geles y estabilizantes²³, y su goma constituye un excipiente en la producción de tabletas como emulgente y humectante²⁴.

Prácticamente para todos sus órganos han sido referidos efectos medicinales. A la pulpa del fruto se le atribuyen propiedades antipiréticas, antiescorbúticas, y es empleada en enfermedades relacionadas con el exceso de colesterol y ácido úrico. Los retoños de las

hojas se utilizan en la disentería y en infecciones bucales, la corteza del tallo contra el asma y la amenorrea, las hojas y las semillas como vermífugas y estomáquicas²⁵, mientras que las hojas y el tallo en enfermedades hepáticas, ictericia y hemorragias. Otros informes populares indican su efectividad en la tripanosomiasis²⁶. Las hojas son referidas frecuentemente en su uso como tratamiento alternativo de enfermedades renales²⁷. La corteza y las hojas son empleadas en el África central en el tratamiento del parasitismo intestinal²⁸. Casi todas sus partes son empleadas como laxante, antipiréticas, antisépticas o antimicrobiana, antimaláricas, antirreumáticas, antidiabéticas, entre otras muchas aplicaciones²⁹; aunque las que más se destacan, son la hepatoprotectora y laxante. Como laxante, la pulpa del fruto ha sido una droga oficial en la Farmacopea de los Estados Unidos de América y en la Farmacopea Británica³⁰.

I.3 Procedimientos empleados en la extracción, aislamiento y caracterización de productos de especies vegetales

A pesar de su información genética predeterminada, las plantas pertenecientes a una misma especie pero desarrolladas en entornos diversos producen diferentes compuestos, generando así un formidable reservorio de sustancias con potencialidades farmacológicas³¹.

Toda esta diversidad química, se encuentra distribuida en el interior de las células vegetales, por lo que para su obtención, y posterior estudio resulta necesario diseñar procesos de extracción y aislamiento adecuados.

La extracción es un proceso que depende de la naturaleza del material a tratar y de los compuestos a ser aislados. Un proceso extractivo típico en plantas incluye los siguientes pasos:

1. Secado y disminución del tamaño de partícula.
2. Selección del solvente: apolares (n-hexano, cloroformo etc.), medianamente polares (alcoholes, acetato de etilo, diclorometano etc.) y polares (usualmente el agua).
3. Elección del método de extracción: Maceración, percolación, extractor Soxhlet, sublimación, extracción asistida por microondas o por ultrasonido, por destilación a vapor, entre otros.

Ninguno de los métodos de extracción anteriormente mencionados ofrece ventajas apreciables con respecto a los demás, pues todo dependerá de la naturaleza del material y del tipo de principio activo que se desea extraer. Algunos métodos emplean agentes físicos

y químicos para la extracción, con costos de tiempo muy bajos y rendimientos de extracción altos; sin embargo, casi siempre implican una tecnología adicional que puede ser económicamente costosa. Además, al desconocer la naturaleza del principio activo no se pueden prever las alteraciones que el agente físico o químico empleado pueda producir a la muestra: degradación, polimerización, formación de aductos químicos, entre otras³². La maceración y la percolación, por su parte, no emplean agentes físicos ni químicos, por lo que para lograr elevados rendimientos se debe aumentar significativamente el tiempo de extracción, que en el caso de la maceración puede llegar incluso a los 30 días. La percolación, sin embargo, ofrece una solución en la que para aumentar la capacidad y disminuir los tiempos de extracción, se recambia el solvente cada 24 o 48 horas de maceración, de dos a cinco veces. De tal forma, se evita la saturación del menstuo, extrayendo hasta el agotamiento los metabolitos solubles. Esto, por supuesto, engendra el consumo de elevados volúmenes de solvente³³.

Independientemente del método y solvente empleado, el producto de un proceso extractivo en plantas medicinales es una compleja mezcla de compuestos, dificultando la aplicación de una sola técnica de separación para aislar al compuesto deseado. Por ello, después de la extracción se realiza normalmente un proceso de fraccionamiento, que agruparía compuestos de similar polaridad o tamaño molecular. Se prefiere la obtención de pocas fracciones para evitar la distribución del principio activo en varias de ellas. El paso siguiente es el aislamiento, que concebido desde el propio proceso de diseño de la extracción, debe considerar las características generales de la sustancia o grupo de sustancias a aislar: solubilidad, características ácido-base, carga neta, estabilidad y el peso molecular. En función de ello, se elegirán dentro de una vasta gama de técnicas analíticas, aquellas que permitan el aislamiento del o de los productos deseados. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran las cromatográficas, en cualquiera de sus múltiples variantes, y las electroforéticas; aunque también se emplean la filtración con membranas selectivas, la cristalización por gradientes de pH y/o cambios bruscos de solubilidad y la destilación fraccionada³⁴.

Una vez aislado el o los componentes deseados, es necesario realizar una caracterización química del producto. Existen numerosas técnicas de caracterización, varias de ellas utilizan la radiación electromagnética en sus diferentes frecuencias, como son: la espectroscopia Ultravioleta-visible (UV-visible), la espectroscopia infrarroja (IR), la espectroscopia RAMAN y la de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Otras, presentan

un fundamento diferente como la espectrometría de masas (EM) y la difracción de rayos X. Por otra parte, para el análisis elemental es común emplear la espectroscopia de absorción atómica (AA) y la Espectrometría por Plasma Inductivamente Acoplada (ICP). Con el desarrollo actual del equipamiento tecnológico es común la hibridación instrumental; por ejemplo, técnicas cromatográficas combinadas con métodos de caracterización química. Son frecuentes el empleo de la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM), la cromatografía líquida de alta resolución/detector UV-visible (HPLC/UV-visible), entre otras variantes.

Dada la alta complejidad y costo de las técnicas de caracterización y la diversidad de productos químicos producidos por una especie vegetal, entre otros factores, una primera aproximación de la composición química de la planta puede lograrse empleando la técnica de Tamizaje Fitoquímico. Este método incluye diversos ensayos cualitativos de rápido, fácil y económico desarrollo, que permiten evaluar la presencia en la especie estudiada de los principales grupos de metabolitos sintetizados en las plantas. De tal forma, proporciona información química importante al inicio de la investigación en plantas medicinales. Sin embargo, genera comúnmente falsos positivos y falsos negativos, por lo que las evidencias encontradas por este método deben ser confirmadas por técnicas analíticas más potentes, como las anteriormente mencionadas. A su vez, las técnicas analíticas cuantitativas se deberán desarrollar y validar como método de control de la calidad de los extractos multicomponentes obtenidos³⁵.

1.3.1 Métodos de extracción, aislamiento y caracterización empleados en la separación de los fitocomponentes de las hojas de Tamarindus indica L.

El estudio de la composición química del tamarindo es tan antiguo como lo ha sido su empleo; sin embargo, no abundan los estudios químicos realizados en las hojas. Además, la sensibilidad y eficacia de los métodos de caracterización conlleva lógicamente a considerar sólo aquellos desarrollados con posterioridad a 1950.

Al respecto en 1959, investigadores indios demostraron, a partir de extractos acuosos, que la biosíntesis del ácido tartárico en las hojas de Tamarindo varía con las diferentes etapas de maduración del fruto, destino mayoritario de este metabolito³⁶. La producción de este compuesto es tan elevada, que incluso ha sido considerado como fuente industrial para su obtención³⁷. Otros ácidos orgánicos también han sido referidos en las hojas del tamarindo.

Ellos son: el ácido oxoglutámico, el glioxílico, el málico, el oxalacético y el oxalosuccínico³⁸.

Los primeros compuestos de naturaleza polifenólica identificados en las hojas del tamarindo lo constituyeron cuatro flavonoides C-glicosídicos conocidos por orientina, isorientina, vitexina e isovitexina. Ellos fueron extraídos por maceración con acetato de etilo, separados por cromatografía de capa delgada y determinados por espectroscopía en la región UV³⁹. Posteriormente, otros investigadores aislaron nuevos compuestos con estas características, como la apigenina, 7-*o*-metilluteolina, y los ácidos *cis* y *trans* ferúlicos, mediante una extracción con etanol en un aparato tipo Soxhlet. En dicho trabajo, se señala además, la susceptibilidad de estos compuestos a la biodegradación por infección micótica⁴⁰.

Más recientemente, a partir de un extracto fluido preparado por percolación con etanol al 80% fueron identificados además de los compuestos anteriores, la vicenina, la rutina, luteolina, la luteolina-7-O-glucósido, y el ácido cafeico, mediante cromatografía preparativa en capa delgada de celulosa y un sistema de solventes butanol-acético-agua (4:1:5, v/v/v) y posterior análisis por HPLC-EM/EM⁴¹.

Las hojas del tamarindo han sido empleadas con frecuencia como fuente alimenticia de animales y humanos. Por esta razón, desde hace varios años, se dispone de caracterizaciones bromatológicas de las hojas. Se han informado niveles de proteínas entre 4.0-5.8%, grasas y aceites entre 1.2-2.1%, fibra 1.9-3.0%, carbohidratos totales entre 16-18%, y cenizas 1.0-1.5%. Además, se ha demostrado la presencia de cantidades significativas de vitaminas como: tiamina y riboflavina (0.1-0.2 mg), niacina (1.5-4.1 mg), vitamina C (3.0-6.0 mg) y aproximadamente 2.5 mg de β -caroteno. Han sido determinadas también las concentraciones de algunos minerales como: calcio (101-250 mg), magnesio (71 mg), fósforo (140 mg), hierro (2.0-5.2 mg), cobre (2.0 mg), cloro (94 mg), azufre (63 mg), sodio (8 mg) y potasio (270 mg)^{42,43}.

Por otra parte, en estudios realizados en hojas de tamarindo se han informado 139 g/kg de proteína cruda, 317 g/kg de nitrógeno soluble, 121 g/kg de lignina, 14 g/kg de fenoles totales y 8 g/kg de taninos condensados⁴⁴. Estas propiedades nutricionales han motivado nuevas revisiones del tema, las que confirman los valores anteriormente declarados^{45,46}.

En un estudio de ácidos grasos presentes en hojas de tamarindo, se evidenció que la longitud de las cadenas carbonadas osciló entre 10 y 24 átomos de carbono. Se detectó además, la presencia de los tocoferoles α y β . Para extraer estos compuestos apolares se

realizó una maceración con una mezcla de cloroformo/metanol (1:2 v/v). Posteriormente se aislaron las fracciones mediante una cromatografía preparativa en columna de sílica-gel, empleando como eluyentes cloroformo, acetona y metanol. La caracterización de las fracciones eluidas se realizó por CG/EM⁴⁷. Más recientemente, otro estudio informó la presencia de 32 ácidos grasos, 21 de ellos insaturados. La longitud de las cadenas de los ácidos grasos comprendió desde 8 a 32 átomos de carbono. La extracción de éstos compuestos se realizó mediante maceración con etanol por 30 días. Posteriormente, dicho macerado fue extraído con acetato de etilo y analizado por CG/EM⁴⁸.

Otros compuestos aislados de las hojas del tamarindo han sido los triterpenos lupanona y lupeol. El proceso extractivo empleado en este caso fue la maceración por 30 días con metanol, y el extracto resultante fue fraccionado sucesivamente con n-hexano, cloroformo y acetato de etilo. La fracción de cloroformo fue separada por cromatografía líquida a vacío empleando como eluyentes mezclas al 5, 10 y 15% de cloroformo-n-hexano. Los compuestos fueron caracterizados por espectroscopía IR, EM y RMN⁴⁹ en sus variantes protónicas H¹ y carbono C¹³.

Además de resultar insuficientes los antecedentes acerca de la extracción, aislamiento y caracterización de componentes de las hojas del tamarindo, éstos a su vez resultan limitados en cuanto a su extensión, pues cada uno se concentra en la determinación de un tipo particular de metabolito, sin ofrecer una panorámica general de la composición química del órgano. Estudios con esta perspectiva integral resultan necesarios para poder evaluar la verdadera riqueza fitoquímica de las hojas del tamarindo.

1.3.2 Principales metabolitos aislados en otros órganos de Tamarindus indica L.

Compuestos fenólicos: En los frutos del tamarindo se han aislado los ácidos elálgico, clorogénico, cafeico y varias flavonas⁵⁰. Sin embargo, las mayores concentraciones de compuestos fenólicos han sido determinadas en las semillas. Del pericarpio de la semilla han sido aislados: la 2,3',4'-trihidroxiacetofenona, el metil-3,4-dihidroxibenzoato, el 3,4-dihidroxifenilacetato y la (-)epicatequina⁵¹, así como la (+)catequina, y proantocianidinas polimerizadas (en formas de dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros y hexámeros) o conjugadas con flavonoides, como taxifoleno, apigenina, eriodictiol, luteolina y naringenina. En el interior de la semilla sólo se encuentran las proantocianidinas polimerizadas con predominio de las tetraméricas⁵². De la corteza de la raíz fueron aisladas la apigenina y la vitexina⁵³.

Compuestos volátiles: Para la fruta que crece en Egipto se refieren un total de 61 compuestos volátiles⁵⁴, a las de Malawi se les informan 66⁵⁵, y a las de Cuba 81⁵⁶. Los autores señalan que la mayoría de los compuestos identificados son derivados del furfural o de naturaleza acídica, aunque no existen coincidencias desde un punto de vista cuantitativo ni cualitativo entre los tres estudios. No obstante, algunos de los compuestos mayoritarios determinados en estos trabajos son el 2-fenilacetaldehído, el 2-furfural y el ácido hexadecanoico.

Ácidos grasos: Las semillas contienen ácidos grasos en una proporción elevada. Se han aislado los ácidos palmítico (14,8%), esteárico (5,9%), oleico (27%), linoleico (7,5%), linolénico (5,6%), araquidónico (4,5%), behénico (12,2%) y lignocérico (22,3%)⁵⁷.

Otros compuestos de interés: En las semillas se han aislado compuestos extremadamente tóxicos como son el cardenólido uzarigenina⁵⁸ y el bufadienólido esquilifeosina⁵⁹. También en semillas, se refiere la presencia de xiloglicanos con elevadas potencialidades para la formulación de alimentos y preparados farmacéuticos⁶⁰. Un compuesto de naturaleza proteica con actividad enzimática sobre la quitina fue obtenido también de las semillas⁶¹. En frutos, por su parte, se aisló el L-(-)-di-n-butilmalato, sustancia con gran actividad citotóxica.

Las diferencias químicas entre las sustancias obtenidas en cada órgano son el reflejo de que para una misma especie, la producción y almacenamiento de metabolitos secundarios no es idéntica. Por lo tanto, se deben evitar las comparaciones simplistas entre órganos, que al presentar una composición química diferente, exhibirán probablemente actividades que pueden ser distintas o de diversa intensidad. También son posibles variaciones cuantitativas e incluso cualitativas dentro del mismo órgano, por la influencia de factores ambientales, como ocurre en el aceite esencial del fruto.

I.4 Evaluaciones fármaco-toxicológicas de *Tamarindus indica* L.

I.4.1 Estudios farmacológicos *in vitro-in vivo* de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Al igual que sucede con su composición química, las hojas del tamarindo no han sido muy estudiadas desde el punto de vista farmacológico. Sin embargo, las actividades etnofarmacológicas atribuidas principalmente a este órgano son precisamente las que con mayor frecuencia han sido científicamente abordadas.

La actividad hepatoprotectora de las hojas es una de las que mayor interés ha recibido desde el punto de vista farmacológico. La actividad hepatoprotectora de un extracto acuoso

de las hojas de tamarindo se demostró en el modelo de intoxicación por terbutilhidroperóxido. También se determinó la actividad antiradicalaria frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH)³⁹. En un trabajo similar, pero empleando un extracto en etanol al 50%, se evaluó y comparó su actividad con la de otros ocho extractos procedentes de plantas del Caribe con reconocida actividad hepatoprotectora y antioxidante. El extracto de las hojas del tamarindo resultó el segundo más activo, superior incluso a los del Romero (*Rosmarinus officinalis*)⁶², otra de las catorce especies incluidas en el *Green Pharmacy Herbal Handbook* para el tratamiento de las disfunciones hepáticas⁸. Investigaciones desarrolladas en Cuba demostraron por otra parte, el efecto hepatoprotector de un extracto hidroalcohólico al 80% de hojas de tamarindo en un modelo de intoxicación hepática por tetracloruro de carbono¹⁴.

En estos estudios, fueron empleados modelos de intoxicación hepática que implican en el mecanismo de toxicidad la formación de radicales libres. En dos de ellos, se determinó la actividad del extracto ensayado ante el DPPH y en el estudio realizado en Cuba, se evaluó además, la inhibición del radical superóxido. Estos resultados sugieren que las hojas del tamarindo deben ejercer su efecto hepatoprotector mediante un mecanismo antioxidante, aunque el limitado número de ensayos no permitió aseverarlo. Los trabajos apuntan además, a que los fenoles y flavonoides son los compuestos responsables de dicha actividad, aunque podrían estar sesgados por el propio diseño de la investigación.

Los informes sobre la actividad antimicrobiana de las hojas datan de la década del ochenta del siglo XX. La mayor actividad de los extractos alcohólicos respecto a los clorofórmicos fue demostrada frente a cepas de *E. coli*, *B. subtilis* y *K. pneumoniae*; sin embargo, no se definieron las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas de los extractos⁶³.

En un trabajo más extenso, se prepararon extractos a partir de hojas y de corteza del tamarindo que crece en Nigeria, empleando como solventes agua, etanol y acetona, y se evaluó su actividad ante 13 cepas de microorganismos, cuatro de ellas pertenecientes a especies de hongos o levaduras. Los extractos acetónicos fueron los más activos, mientras que los acuosos resultaron los de menor actividad. Además, los extractos procedentes de la corteza resultaron, en general, más efectivos que los procedentes de las hojas. Ninguno de los extractos evaluados mostró actividad ante las cepas de hongos y levaduras⁶⁴. Esta observación coincide con las evidencias obtenidas en un estudio de acción antifúngica de extractos frente a especies del género *Fusarium*⁶⁵. Adicionalmente, un extracto de hojas en etanol al 80%, mostró actividad contra varias de las cepas bacterianas ensayadas¹⁴.

Estos últimos trabajos señalan a los fenoles y flavonoides como posibles responsables de la actividad antimicrobiana, a pesar de la diversidad fitoquímica del órgano, y del hecho de que en la corteza los niveles de fenoles y flavonoides son menores que los determinados en las hojas.

Otras actividades farmacológicas demostradas en las hojas del tamarindo son sus propiedades anti-inflamatorias y analgésicas, empleando biomodelos estandarizados de ratones⁶⁶.

1.4.2 Principales propiedades farmacológicas evaluadas en otros órganos de Tamarindus indica L.

A diferencia de las hojas, otros órganos del tamarindo han sido más intensamente estudiados, especialmente los frutos y las semillas, resultando mayor además, el número y diversidad de las actividades informadas.

1.4.2.1 Perfil antioxidante

Los componentes presentes en la semilla han sido los más empleados para demostrar la actividad antioxidante de la planta. A diferencia de las hojas, en este órgano además de los polifenoles y flavonoides, se consideran otras sustancias como las responsables de esta actividad.

En este sentido, se demostró en cultivos de células de córnea la actividad protectora del polisacárido de la semilla contra la oxidación del DNA inducida por luz ultravioleta, destacando su posible importancia en el empleo de preparaciones farmacéuticas oftalmológicas⁶⁷.

También se demostró la capacidad antioxidante de un flavonoide polihidroxiado (cianidina 3-O-β-D-glucosido) aislado a partir de la semilla, que actuando sinérgicamente con otros tres componentes polifenólicos ejercía de manera efectiva un efecto protector *in vitro* sobre la oxidación del ácido linoléico⁶⁸. Los estudios *in vitro* e *in vivo* establecieron que dosis superiores a 500 mg/Kg de este glicósido de cianidina modulan la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos⁶⁹.

Por otra parte, un extracto metanólico de la corteza de la semilla, con polifenoles, proantocianidinas y (-)epicatequina en su composición, mostró un efecto antioxidante similar a un equivalente de 0.5 μg/mL de Trolox en modelos *in vitro* de inducción de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, estimulado por la presencia de Cu²⁺ y de

oxidación del DNA a través del radical hidroxilo⁷⁰. En función de estas propiedades antioxidantes seis extractos diferentes encontraron aplicación en cosmetología, al ser incorporados a lociones. Aquellas lociones formuladas con los compuestos extraídos con acetato de etilo resultaron las más activas como antioxidantes⁷¹.

El fruto también ha sido descrito como antioxidante. Extractos metanólicos obtenidos a partir de éste órgano, mostraron la mayor actividad en comparación con los de otras 13 especies evaluadas. Las técnicas para estudiar la actividad antioxidante fueron: inhibición del radical DPPH, inhibición del catión radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonato (ABTS) y la medición del poder antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP)⁷².

1.4.2.2 Perfil antimicrobiano

A diferencia de las hojas y la corteza, extractos metanólicos y acuosos de las flores del tamarindo mostraron, entre las 30 especies vegetales evaluadas, la mayor actividad sobre cinco hongos patógenos oportunistas del hombre. Esta actividad resultó también apropiada frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas⁷³.

La actividad antagonista de hongos y bacterias también se ha informado en extractos acuosos de la fruta, con valores superiores a la media del resto de las diez especies medicinales evaluadas⁷⁴. Estos extractos acuosos de la fruta fueron ensayados frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurim*, mostrando actividad a bajas concentraciones ante todas las bacterias, con excepción de *S. typhimurim*⁷⁵.

Los extractos obtenidos por maceración de la semilla en etanol al 95%, también mostraron potencialidades como antimicrobianos. Ello fue demostrado en un ensayo llevado a cabo con aves de corral, donde se manifestó el efecto antibiótico de los extractos evaluados⁷⁶.

1.4.1.3 Perfil inmunomodulador

Los polisacáridos provenientes de varios órganos del tamarindo han encontrado aplicación práctica como moduladores de la respuesta inmune. A partir de las pruebas de adhesión fagocitaria, inhibición de la migración leucocitaria y la inhibición de la proliferación celular, fue demostrada la acción antitumoral de un polisacárido de la semilla⁷⁷.

Los polisacáridos del fruto también han demostrado su actividad inmunopotenciadora en ratones Balb./c infectados con *Actinomadura madurae*⁷⁸. En otros estudios desarrollados

en ratas y ratones, administrados con extractos de polisacáridos del fruto, se demostró que a bajas dosis (0.005-0.5 $\mu\text{g/mL}$), disminuyen los niveles de interleucina 1 β (IL-1 β) a valores no detectables; sin embargo, a mayores concentraciones (50-100 $\mu\text{g/mL}$) incrementan estos niveles y disminuyen los de la interleucina 6 (IL-6)⁷⁹. Los compuestos obtenidos en forma de extractos hidroalcohólicos, ejercen su efecto sobre las funciones de los neutrófilos humanos, inhibiendo de manera dependiente de la concentración, la generación de las Especies Reactivas de Oxígeno. Esta acción la realizan mediante la inhibición de la actividad enzimática de la NADPH-oxidasa de neutrófilos, lo que evidencia la potencial aplicabilidad de estos extractos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas por la acción de los neutrófilos⁸⁰.

1.4.2.4 Regulación del equilibrio mineral y de las propiedades biofarmacéuticas

Uno de los usos más extensivos del fruto del tamarindo por la población se relaciona con su efectividad en la litiasis renal. Desde hace casi tres décadas, se comprobó experimentalmente que extractos acuosos e hidroalcohólicos del fruto eliminaban significativamente los cálculos renales en humanos, evitando la cristalización del oxalato de calcio en la orina⁸¹. Unos años más tarde, se demostró que esta actividad se debía a la presencia del ácido tartárico⁸². También se evidenció en humanos que el consumo de estos extractos se asocia con la disminución de los niveles de magnesio y zinc y fluoruros en orina; mientras que mantiene los de calcio y fosforo en sus valores normales. Un comportamiento similar ha sido observado también cuando en extractos de hojas⁸³. Se plantea que la apreciable disminución de iones fluoruros ocurre incluso en individuos con bajo consumo de este elemento, como resultado de su movilización desde los huesos. Se observó además un incremento en la eliminación de cobre⁸⁴.

La acción beneficiosa de la eliminación de fluoruros fue evidenciada adicionalmente en un estudio desarrollado en conejos que ingirieron agua fluorinada por adición de fluoruro de sodio. Los conejos tratados con extractos del fruto no mostraron la toxicidad hepática ni nefrológica encontrada en aquellos que formaron parte del grupo control negativo⁸⁵.

También se ha demostrado a través de estudios clínicos, la influencia de extractos acuosos del fruto del tamarindo en la biodisponibilidad de los antiinflamatorios no esteroideos. Investigaciones en voluntarios sanos evidenciaron que la aspirina y su principal metabolito, el ácido salicílico, incrementan notablemente sus niveles plasmáticos al consumirse conjuntamente con refrescos de tamarindo⁸⁶. Otro estudio clínico ofreció resultados

similares cuando se analizaron las concentraciones plasmáticas de Ibuprofeno y sus principales metabolitos: el hidroxí y el carboxi ibuprofeno⁸⁷. Estas observaciones se explican por el desplazamiento que provocan los compuestos acídicos del tamarindo en la unión de las proteínas plasmáticas con los antiinflamatorios no esteroideos. La absorción es otro de los procesos biofarmacéuticos que resulta modificado. Los extractos del fruto afectan notablemente la absorción de metales como el cromo⁸⁸ y estimulan la del hierro, ejerciendo un importante papel regulador en el equilibrio mineral del organismo⁸⁹.

Los extractos de las semillas también alteran las propiedades biofarmacéuticas de sustancias que se administren de forma simultánea. El polisacárido de este órgano ha sido propuesto como un buen candidato de vehículo para formulaciones oftálmicas, al incrementar en conejos la absorción de los antibióticos oftálmicos, tanto en corneas sanas como infectadas por microorganismos en casos de queratitis. La absorción fue directamente proporcional al tiempo de aplicación del antibiótico. Se propone que el mecanismo esté asociado con el retardo del “lavado fisiológico” de los ojos⁹⁰.

El polvo de semillas del tamarindo es empleado en la formulación de la tableta masticable de Nifedipino, aumentando la fuerza de bioadhesión del fármaco, y los porcentos de hidratación y liberación⁹¹. El polisacárido de la semilla ha sido empleado en la formulación de tabletas de diclofenaco sódico con vistas a retardar su liberación. Los resultados obtenidos muestran el efecto positivo de esta sustancia en la modificación de las propiedades biofarmacéuticas del diclofenaco sódico⁹². Muchas de las potencialidades que posee este producto se informan en un artículo de revisión de la temática⁹³.

I.4.3 Estudios toxicológicos de Tamarindus indica L.

Hace apenas unos años, se consideraba erróneamente que los productos naturales estaban prácticamente desprovistos de toxicidad y reacciones adversas por su propia definición de “natural”. El desarrollo actual de la toxicología experimental ha demostrado lo contrario, y se realizan revisiones toxicológicas importantes de plantas tradicionalmente empleadas, internacionalmente y también en nuestro país. No obstante, existen precedentes en el tamarindo difíciles de ignorar. Como se ha comentado anteriormente, el empleo del tamarindo por el hombre data de fechas anteriores a nuestra era, por lo que la experiencia práctica acumulada sobre el uso de esta especie apunta hacia una relativa baja toxicidad, o al menos aquella toxicidad que se manifiesta en cortos períodos de tiempo.

Las evidencias experimentales reunidas hasta la fecha y referidas en la literatura confirman lo anteriormente explicado. En un trabajo realizado en la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana se analizó el estado de las evaluaciones genotóxicas aplicadas a plantas medicinales de amplio consumo por nuestra población. Se particularizó qué tipos de ensayos *in vitro* o *in vivo* han sido utilizados, y los niveles de daño genético detectados. Los resultados reflejaron la carencia total de efectos genotóxicos en la planta (no se especifica el órgano) en los cinco ensayos *in vitro* realizados y en tres de los cuatro ensayos *in vivo*. Sólo la prueba de Ames en *Salmonella typhimurium* resultó ligeramente alterada. Estos hallazgos sugieren la relativa seguridad genotóxica de la especie⁹⁴.

Desde otro punto de vista, se realizó la evaluación de la actividad mutagénica de extractos de la corteza. Los resultados mostraron una apreciable actividad protectora ante el daño producido al DNA por el terbutil-hidroperóxido en *Escherichia coli* IC188⁹⁵.

En un estudio realizado con extractos acuosos de las frutas, se evaluó la actividad clastogénica y/o genotóxica en sangre perisférica y en células hepáticas de ratas *Wistar* y en células de la médula ósea de ratones *Swiss*, empleando el ensayo de micronúcleos. Los resultados mostraron la ausencia total de acción clastogénica y/o genotóxica a niveles de dosis de hasta 2000 mg/kg de peso corporal⁹⁶.

De la bibliografía consultada, sólo dos referencias notifican toxicidad en la especie. Los extractos hidroalcohólicos al 70% de la corteza del tamarindo que crece en Cuba se presentan como tóxicos al ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratones albinos suizos de ambos sexos, aumentando de manera estadísticamente significativa la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de la médula para el sexo femenino a partir de dosis superiores a los 500 mg/kg de peso. Sin embargo, ese mismo extracto resultó no tóxico en el ensayo de *Salmonella*/Microsoma (Test de Ames) para reversión bacteriana⁹⁷. El otro informe de toxicidad está relacionado con los extractos hidroalcohólicos del fruto, señalados como posibles responsables del aumento del riesgo de sufrir cáncer de colon en ratones de experimentación⁹⁸.

I.5 Consideraciones generales sobre el estrés oxidativo

La capacidad de los organismos vivos de emplear el oxígeno molecular (O₂) como fuente de obtención de energía, resultó un paso trascendental en la evolución y el desarrollo de la vida en la tierra. Para ello, el O₂ debe reducirse por incorporación de cuatro electrones; proceso que culmina con la formación de cuatro moléculas de agua por cada molécula de

O₂ reducida. Esta importante adaptación se estima ocurrió en el período Cámbrico hace aproximadamente 570 millones de años.

Cada vez que se incorpora un electrón al oxígeno molecular se obtiene una especie reducida intermedia, que han sido denominadas Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Ellas son: el anión superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH[•]). Aunque estas ERO son las derivadas directas de la reducción del O₂, no son las únicas especies de su tipo. Existen otras ERO de importancia entre ellos se encuentran: los radicales peroxilo y alcoxilo (RO₂[•], RO[•]), productos de la interacción con lípidos, el ácido hipocloroso (HOCl) y el propio oxígeno en su estado de singlete ¹O₂. La literatura también considera la existencia de las Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN) como el Oxido nítrico (NO[•]) y el anión Peroxinitrito (ONOO⁻); aunque químicamente resultan también ERO⁹⁹. Estas especies químicas presentan una elevada reactividad, con tiempos de vida media muy bajos en el orden de microsegundos, y algunos de ellos hasta de nanosegundos. Sus blancos o dianas lo constituyen, en general, proteínas y lípidos de membrana, lipoproteínas, ácidos ribonucleicos y desoxirribonucleicos, entre otras biomoléculas.

El oxígeno molecular es uno de los componentes mayoritarios de la atmósfera terrestre (21% en volumen), y es fuente de vida para la mayor parte de los organismos vivos. Paradójicamente, la existencia de una atmósfera oxigenada es al mismo tiempo un peligro para la vida, pues en condiciones determinadas el oxígeno molecular puede provocar la oxidación espontánea y total de todos los sillares estructurales de la vida. Afortunadamente, éste oxígeno molecular resulta relativamente inerte a las concentraciones, temperatura y presión atmosférica que existen en la Tierra. De tal forma, resulta utilizable y a su vez controlable por los mecanismos bioquímicos de las células aerobias. No obstante, pueden ocurrir desbalances internos dando lugar a lo que se conoce como estrés oxidativo. Un concepto convencional que brinda la literatura sobre estrés oxidativo es el siguiente: *“Es aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente prooxidante y los mecanismos defensivos antioxidantes son sobrepasados de forma que se llega a afectar el estado redox celular”*¹⁰⁰.

1.5.1 Fuentes y Mecanismos Generadores de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Se ha especulado que cerca del 5% del oxígeno inhalado por el ser humano se convierte en ERO, lo que representa aproximadamente 40×10²¹ moléculas/persona/día o un total de

25,000,000,000 moléculas/célula/día¹⁰¹. Las fuentes más comunes de generación son las siguientes:

- ✓ *Cadena de transporte electrónico mitocondrial*: Más del 95% del total del oxígeno consumido es procesado por esta vía; en consecuencia, es esta la vía de mayor capacidad de generación de ERO. De hecho, revisiones actuales del balance REDOX sugieren que es la responsable desde un 95 a un 98% de las ERO producidas¹⁰². El Complejo I (NADH-ubiquinona oxidoreductasa) y el complejo III (ubiquinol-citocromo C oxido-reductasa) son dos de las principales fuentes de generación de ERO en este organelo.
- ✓ *Reacciones enzimáticas no mitocondriales*: Ocurren en otros organelos como los peroxisomas, principalmente por la acción de las enzimas acil-CoA oxidasa y la xantina oxidasa. Otras de estas enzimas que actúan en diversos niveles del organismo son: la monoamino oxidasa, las cicloxigenasas y lipoxigenasas, las óxido nítrico sintasas, las aminoácido oxidasas, la glucosa oxidasa, NADPH oxidasas, entre otras.
- ✓ *Fagocitos activados*. Bajo la influencia de una serie de factores o estímulos externos, la acción fagocítica es activada. Esta activación cursa con la generación de importantes cantidades de ERO. A pesar de ser este un sistema de defensa celular, estudios actuales lo relacionan con la aparición de algunos tipos de cáncer¹⁰³.
- ✓ *Metabolismo de fármacos y otros xenobióticos*. El metabolismo de muchos fármacos y xenobióticos cursa también con la generación de ERO. La producción de ERO ocurre fundamentalmente por la actividad de las monooxigenasas de función mixta-citocromo P450 y por mecanismos de ciclaje REDOX.
- ✓ *Fenómenos de isquemia/reperfusión*: Ocurren cuando hay una disfunción mitocondrial, o de la xantina oxidasa. También, por un incremento del metabolismo del ácido araquidónico, una infiltración de polimorfonucleares (PMN) y una activación de la óxido nítrico sintasa.
- ✓ *Incremento de la concentración de Oxígeno (Hiperoxia)*: Un aumento de la presión de oxígeno en el medio provoca un incremento proporcional en la producción de ERO.
- ✓ *El ejercicio físico intenso*. Las sesiones únicas de ejercicio aeróbico y anaerobio pueden inducir una condición intensa de estrés oxidativo, especialmente en la generación de las Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN). El tipo de ejercicio, su duración e intensidad son factores determinantes en la cantidad de ERO generadas. Desafortunadamente, se ha encontrado que la producción de elevados niveles de ERO ocurre siempre que se

pretende lograr maximizar las adaptaciones inducidas por el entrenamiento y el ajuste de las funciones fisiológicas durante este proceso¹⁰⁴.

- ✓ *Radiaciones ionizantes*: Como lo describe su nombre, las radiaciones ionizantes son capaces de activar los sistemas de generación de ERO. Su incidencia se manifiesta cuando se analizan el número de mutaciones y cambios genéticos que éstas provocan. El incremento de las ERO y las ERN provocan la inhibición de la enzima tirosina fosfatasa, enzima involucrada en los estados de proliferación celular¹⁰⁵. También causan alteraciones en los mecanismos de reparación del DNA, provocando un proceso de neurodegradación progresiva, similar a como ocurre en un tipo de ataxia¹⁰⁶.
- ✓ *Contaminantes ambientales*: Se trata principalmente de gases como el ozono (O₃), y el dióxido de nitrógeno (NO₂), pero también se incluyen otros no gaseosos como son los biocidas y los pesticidas, los cuales aparecen como contaminantes del agua, la flora y la fauna circundante. Entre los más comunes está el piperonil butóxido (PBO), un pesticida que incrementa la expresión del gen *CYP1A1*, una isoforma del citocromo P-450 que cataliza el metabolismo de este producto, cuyos derivados son promotores de tumores hepáticos¹⁰⁷. También inhiben enzimas reguladoras del mecanismo redox celular como la glutatión reductasa, y la NADPH: quinona oxido-reductasa, entre otras.
- ✓ *Estilos de vida*: Resulta éste uno de los factores con mayor influencia en el estrés metabólico en los humanos. Dentro de esta clasificación se encuentran la dieta, y los hábitos tóxicos de la persona como el alcoholismo y el tabaquismo, entre otros.
- ✓ *Calidad de vida*: Dentro de este factor se incluyen el estado de salud de la persona, y la incidencia de enfermedades como la obesidad, diabetes, inmunodepresión asociada con infecciones recurrentes de virus y bacterias, entre otras.
- ✓ *Presencia de iones metálicos*: Los metales de transición son elementos capaces de existir en diversos estados de oxidación; por ello, su presencia en el medio puede alterar el equilibrio REDOX de la célula. Los mayormente reconocidos son el cobre y el hierro, los cuales en sus estados de oxidación Cu⁺ y Fe²⁺ son capaces de cederle un electrón al H₂O₂ y formar el peligroso radical OH• a través de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss¹⁰⁸. A pesar de ser estos dos cationes los más reconocidos, existen otros menos notorios por su poca abundancia en la naturaleza, pero que también pueden participar en la reacción de Fenton y de Haber-Weiss. Ellos son: el cadmio, el cromo, el cobalto, el plomo, el níquel, el manganeso y el vanadio¹⁰⁹.

I.5.2 *Mecanismos antioxidantes del organismo humano*

Como consecuencia de la evolución de las especies, los organismos aerobios desarrollaron mecanismos de protección contra las nocivas especies reducidas intermedias que se producen en el proceso de reducción completa del oxígeno. En el hombre los principales mecanismos antioxidantes son:

- ✓ *Enzimas antioxidantes.* Estas enzimas participan en la neutralización de las ERO en diferentes puntos del proceso. La primera de ellas es la Superóxido dismutasa (SOD). Es la encargada de reducir la primera especie reducida intermedia (O_2^-) que se produce cuando el oxígeno molecular acepta su primer electrón. En el humano existen tres familias de esta enzima: la SOD dependiente de Manganeseo que se encuentra en la mitocondria, la SOD dependiente de Zinc y Cobre que se encuentra en el citosol, y la SOD extracelular. También existe, aunque en menor cuantía, la SOD dependiente del níquel. El H_2O_2 es la segunda especie reducida intermedia. La enzima que por excelencia la neutraliza es la catalasa, que presenta en su núcleo casi siempre un átomo de hierro, aunque las hay manganeseo dependientes. Esta acción también es realizada por la glutatión peroxidasa (GPx), una enzima dependiente de selenio, el cual ocupa generalmente la posición de un átomo de azufre de la cisteína. Para que pueda mantenerse la actividad de la GPx es necesaria la actividad de la Glutatión reductasa (GR). Además de la GPx, la Tiorredoxina/Tiorredoxina reductasa también participa en la neutralización de H_2O_2 .
- ✓ *Antioxidantes preventivos (Secuestradores de metales de transición).* Existen en el organismo una serie de proteínas encargadas de transportar y almacenar numerosos cationes metálicos, indispensables para el funcionamiento celular, pero a su vez peligrosos catalizadores de reacciones de generación de ERO. El hierro (el principal catalizador de las reacciones de Fenton y Haber-Weiss) es el metal de transición con mayor presencia en el organismo, pudiendo significar el equivalente de 4.2 gramos de la masa total de un individuo de 70 kilogramos¹¹⁰. Existe en el organismo un sistema proteico para su transporte y almacenamiento; algunas de estas proteínas son: la transferrina, la lactoferrina, la hemopexina y la ferritina, entre otras. El cobre es otro metal de importancia en la generación de ERO, aunque existe en una proporción mucho menor que el hierro. Proteínas como la ceruloplasmina y la albúmina, son capaces de regular su concentración circulante. Otras proteínas menos específicas actúan como

reguladores de las concentraciones de otros metales; el ejemplo más relevante lo constituyen las metalotioneínas.

- ✓ *Sustancias Endógenas no proteicas con Capacidad Antioxidante.* Otras sustancias de naturaleza no enzimática también son responsables del secuestro de las ERO generadas en los procesos metabólicos vitales. La más notable de ellas la constituye el tripéptido conocido como Glutati6n, el cual existe en su forma reducida (GSH) y su forma oxidada (GSSG). Su concentraci6n en fluidos es muy baja. Por otro lado, la bilirrubina y la albúmina plasmática son los principales compuestos no enzimáticos reguladores de las ERO en plasma, aunque también a este nivel ejerce su acci6n la Ubiquinona (coenzima Q).
- ✓ *Antioxidantes ex6genos obtenidos de la dieta.* Entre los antioxidantes ex6genos se encuentran las vitaminas E y C, carotenos, licopenos y xantinas, polifenoles, elementos inorgánicos integrantes de los sistemas enzimáticos de control end6geno, como el selenio, el hierro, el cobre, y el molibdeno, entre otros.

I.5.3 Efectos del estr6s oxidativo en la salud humana

Dada la elevada reactividad de las ERO, los blancos farmacol6gicos de los mismos son m6ltiples; y en consecuencia, numerosas las patologías asociadas a la acci6n nociva de estas especies. Internacionalmente es aceptado el hecho de que las ERO son responsables de más de 100 desórdenes fisiopatol6gicos, y se relacionan con la aparici6n o agudizaci6n de numerosas enfermedades. A continuaci6n se relacionan ejemplos de las más significativas, por sistema de 6rganos:

- *Sistema cardiovascular:* aterosclerosis, infarto del miocardio, cardiopatía alcoh6lica, enfermedad cardiaca coronaria, hipertensi6n, entre otras¹¹¹.
- *Sistema nervioso:* enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcoh6lica, isquemia o infarto cerebral, diversos tipos de ataxia, enfermedad de Huntington, entre otras¹¹².
- *Sistema respiratorio:* distr6s respiratorio, enfisema pulmonar, asma, enfermedad pulmonar obstructiva cr6nica, entre otras¹¹³.
- *Sistema osteomuscular:* Artritis reumatoidea.
- *Sistema endocrino:* Diabetes.
- *Sistema sensorial:* cataratas, daño degenerativo de la retina, fibroplasia retrolental.
- *Sistema excretor:* nefrotoxicidad.

- *Sistema inmune*: síndromes autoinmunes, SIDA
- *Sistema digestivo*: esteatosis hepática, lesiones hepáticas inducidas por el alcohol, cirrosis hepática, hepatitis tóxicas, entre otras^{114,115}.

Otras enfermedades o estados no localizados, multicasuales o generales y que también están relacionados con el estrés oxidativo son: el cáncer, la psoriasis¹¹⁶, procesos inflamatorios, la apoptosis celular y el envejecimiento, entre otros¹¹⁷.

I.7. Productos vegetales en la terapia antioxidante

Las plantas superiores son los organismos vivos más eficientes en la producción de oxígeno, pero a su vez los que están sometidos a una mayor influencia nociva de éste, debido a las elevadas concentraciones a las que se exponen sus células. Por ello, aunque poco estudiado, el mecanismo de defensa contra las ERO de las plantas debe ser uno de los más eficientes dentro de las especies vivas. No resulta asombroso entonces, el hecho de que la mayoría de los antioxidantes naturales de que dispone el hombre provengan del reino *Plantae*, ni tampoco la diversidad química de los mismos¹¹⁸.

Entre los compuestos presentes en las plantas con mayor actividad antioxidante informada se encuentran: polifenoles (taninos, flavonoides, derivados del ácido cinámico, xantonas, coumarinas, lignanos, quinonas, rotenoides, estilbenos, etc.), aceites esenciales (terpenoides y aromáticos), los ácidos grasos (saturados e insaturados), algunos alcaloides (derivados de la isoquinoleína) y otros compuestos como los carotenos, los ácidos benzoicos y ascórbico, tocoferoles, el sitosterol y elementos minerales. Esta diversidad estructural influye en el hecho de que múltiples especies vegetales se empleen como antioxidantes, resultado de la acción sinérgica de todo el fitocomplejo. Algunas de las especies que se cultivan y utilizan en Cuba, y a su vez presentan actividad antioxidante demostrada son:

- Uva (*Vitis vinifera*): Probablemente sea la planta con mayor número de estudios relacionados con la actividad antioxidante. Esta actividad ha sido asociada básicamente a la presencia de elevadas concentraciones de polifenoles como flavonoides (quercetina, kaemferol, rutina, catequina, epicatequina, procianidinas y antocianidinas), derivados del ácido benzoico como el ácido gálico, derivados del ácido cinámico (ácidos cafeico, cumárico y ferúlico) y estilbenos como el resveratrol^{119,120,121}.

- Pimienta negra (*Piper nigrum*): Produce pequeñas cantidades de ácido ascórbico y beta-caroteno; sin embargo, su elevada producción de aceites esenciales y ácidos grasos saturados e insaturados, convierten al fruto en un excelente antioxidante^{122,123}.
- Jengibre (*Zingiber officinale*): Produce pequeñas cantidades de ácido ascórbico y beta-caroteno, pero importantes cantidades de polifenoles como flavonoides, derivados del ácido cinámico, aceites esenciales, ácidos grasos saturados, selenio y la amina capsaicina^{124,125}.
- Mejorana (*Origanum majorana*): Produce elevadas concentraciones del ácido rosmarínico, apreciables cantidades de ácido ascórbico, y beta-sitosterol pero pequeñas de beta-caroteno. Además, se destaca por la producción de aceites esenciales y polifenoles como taninos, hidroxiquinonas, y fenoles simples¹²⁶.
- Romero (*Rosmarinus officinalis*): Produce importantes cantidades de aceites esenciales, ácido ascórbico, beta-caroteno, beta-sitosterol, así como compuestos polifenólicos como flavonoides, taninos y derivados del ácido cinámico. También se le han determinado importantes concentraciones de los politerpenos ácido ursólico y ácido rosmarínico¹²⁷.
- Mango (*Mangifera indica*): La corteza de esta planta ha sido extensamente estudiada en Cuba, donde sus diferentes formulaciones se comercializan bajo el nombre de Vimang®. Presenta elevadas concentraciones de selenio, pero su actividad antioxidante ha sido atribuida principalmente a los múltiples polifenoles que produce como son derivados del ácido benzoico, ésteres fenólicos, flavonoides (del tipo flavanoles), y su principal componente la xantona mangiferina^{128,129,130}.

Muchas otras especies son empleadas en Cuba como antioxidantes en el tratamiento de múltiples patologías; sin embargo, el limitado número de investigaciones tanto en el área química como en la farmacológica, limitan su empleo extensivo. Una de estas especies es *Tamarindus indica* L., cuyas hojas aunque empleadas por la población, carecen de estudios químicos y farmacológicos profundos que permitan su incorporación al arsenal terapéutico de Cuba y del resto de mundo. Las investigaciones realizadas en el presente trabajo permiten brindar nuevas evidencias del potencial medicinal que ofrecen las hojas del tamarindo al evaluar las propiedades etnobotánicas descritas. Se contribuye así al esclarecimiento de su composición fitoquímica y de los posibles mecanismos por los cuales muestran acción antioxidante y antimicrobiana, lo que facilitaría su empleo en la industria médico-farmacéutica.

Capítulo II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Material Vegetal Las hojas de *Tamarindus indica* L. empleadas en la tesis proceden de una población localizada en la UBPC "Niña Bonita" del poblado de "El Caney" en el municipio de Santiago de Cuba, GPS 20° 2'38.9"N y 075° 45'25.8"W. Para seleccionar la población de tamarindo en estudio, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

- a) Que estuviera alejada de caminos y carreteras para evitar trabajar con material contaminado con plomo proveniente de la combustión de gasolina, pues el mismo puede precipitar los flavonoides en el proceso de extracción. Esto evita, además, el estrés metabólico de la plantas.
- b) Que la población estuviera integrada por más de 5 individuos, y que éstos se encontraran en estado adulto (capaces de experimentar los procesos de floración y fructificación) para evitar posibles diferencias metabólicas debidas al grado de desarrollo de la planta.

La población fue identificada por el Dr. Jorge Sierra Calzado y se depositó la muestra herbario en la sección docente del herbario [BSC] del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente con el registro 052216. Las colectas se realizaron siempre en las primeras horas de la mañana (entre las 7:00 y las 10:00 AM). El material fue secado al sol hasta peso constante (humedad residual en estufa de 8 a 12 %), molinado y tamizado hasta un tamaño de partículas inferior a los cuatro milímetros, según experiencias anteriores de nuestro grupo de investigación¹³¹. Las hojas frescas destinadas a la elaboración de extractos fueron colectadas varios días después, procurando coincidir con la misma fecha de preparación del resto de los extractos.

II.2 Caracterización fitoquímica de extractos totales de las hojas

Con el objetivo de identificar los compuestos mayoritarios producidos por las hojas de *Tamarindus indica* L. se realizó su caracterización fitoquímica general. Para ello, se seleccionaron solventes de diversa polaridad (según lo establecido por la ruta crítica de investigación en Plantas Medicinales)¹⁵, preparando extractos totales que fueron evaluados por diferentes técnicas analíticas. Como material vegetal se empleó droga seca, según experiencias anteriores de nuestro grupo de investigación¹³¹, y droga fresca por tratarse de la forma en que tradicionalmente lo emplea la población.

II.2.1 Extracción en Soxhlet con cloroformo. Análisis por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (CG/EM)

En un equipo de extracción Soxhlet se colocaron 20 g de droga seca que fueron extraídos hasta el agotamiento con 250 mL de cloroformo (BDH, Inglaterra). El extracto clorofórmico se dejó enfriar y posteriormente, se sometió a un análisis químico mediante CG/EM. Se empleó un equipo *FISONS Trio 1000* (Finnigan, Bremen, Alemania), constituido por un cromatógrafo de gases Mega 2 series acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar de impacto electrónico positivo (Modo de ionización) y un intervalo de masas entre 10 y 500 u.m.a. Las condiciones de experimentación fueron las siguientes¹³²:

Columna Capilar de Silicona SPB-1, de 30 m x 0,32 mm y un diámetro interno = 1µm.

Temperatura de inyección = 270⁰C

Temperatura de interfase = 250⁰C

Temperatura de la fuente = 250⁰C

Volumen de inyección = 1 µL

Razón de separación = 100:1

Impacto electrónico positivo 70 e⁻V

Flujo del gas portador (He): 1 mL/min.

Tiempo de Splitless: 60 seg.

Programa de temperatura 30⁰C (3min), 4⁰C/min hasta 250⁰C (10 min.).

La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masas y los índices de retención obtenidos con los existentes en la base de datos IDENT. Algunos espectros de masa fueron comparados con la bibliografía especializada del tema¹³³.

II.2.2 Extracción de los componentes volátiles por hidrodestilación. Análisis por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (CG/EM)

En un balón de destilación se añadió 200 g de hojas frescas recién colectadas y se sometió a un proceso de hidrodestilación por dos horas. Luego de enfriarse y determinar el rendimiento, la solución fue extraída con cloroformo, el cual fue posteriormente removido. El aceite volátil obtenido se sometió a un estudio químico por CG/EM. Se empleó el mismo equipo *FISONS Trio 1000* con algunas condiciones de experimentación diferentes, según experiencias previas de nuestro grupo de investigación^{134,135}:

Temperatura de inyección = 290⁰C

Temperatura de interfase = 270⁰C

Temperatura de la fuente = 270⁰C

Volumen de inyección = 1 µL

Programa de temperatura: 70⁰C (3min), 8⁰C/min hasta 260⁰C (15 min.).

II.2.3 Extracción con solventes de mediana y alta polaridad. Tamizaje Fitoquímico y cuantificación de metabolitos secundarios

En dos percoladores de vidrio ámbar se añadieron 150 g de la droga seca (acápite II.1). La droga se extrajo empleando el método de percolación previa humectación (30 min y volumen de 1mL/g de droga seca), según la Norma Ramal de Salud Pública 311/91¹³⁶ y tres días de extracción. Se emplearon para ello, dos solventes de mediana polaridad, consistentes en mezclas hidroalcohólicas al 30 y al 70 %, obteniéndose finalmente sendos extractos fluidos.

Para la obtención de extractos polares se empleó el agua y el método de decocción¹³⁷ (el mayormente empleado por la población). Se añadieron 30 g, tanto de la droga fresca como de la secada al sol, a 100 mL de agua en ebullición, dejándose en contacto con la misma por 30 minutos. Se dejó reposar, se filtró y a continuación se concentró en un rotoevaporador KIRKA-WERKE (Alemania) hasta obtener 30 mL de cada extracto polar. Los extractos fluidos y las decocciones obtenidas fueron analizados cualitativamente a través de un tamizaje fitoquímico de rutina. Los metabolitos evaluados fueron:

Metabolito	Ensayo	Metabolito	Ensayo
1 Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner	6 Saponinas	Espuma
2 Triterpenos y esteroides	Lieberman-Burchard Rosemheim	7 Mucílagos	Mucílagos
3 Quinonas	Borntrager	8 Grasas Fijas	Papel + Sudán III
4 Cumarinas	Baljet	9 Aceites esenciales	Papel + olor
5 Fenoles y taninos	Cloruro férrico	10 Carotenos	Carr-Price
		11 Azúcares reductores	Fehling
		12 Flavonoides	Benedict Shinoda

Los resultados positivos de estos ensayos fueron contrastados con los obtenidos para soluciones patrones de cafeína (alcaloides), colesterol (triterpenos y esteroides), mangiferina (quinonas), warfarina (cumarinas), ácido tánico (fenoles y taninos), glucosa (azúcares reductores) y quercetina (flavonoides).

Para la cuantificación química de los fenoles totales se empleó un método colorimétrico con el reactivo de Folin-Ciocalteu¹³⁸, registrando los valores de absorbancia a 700 nm. Los resultados se expresaron como ácido tánico a partir de una curva de calibración obtenida para dicho compuesto en el intervalo de 2 a 16 µg/mL. Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible Ultrospec III (Pharmacia LKB. Suecia).

La cuantificación de flavonoides totales se realizó por un método colorimétrico basado en la reacción con cloruro de aluminio al 2,5% en metanol¹³⁹, determinando las absorbancias a 430 nm. Los resultados se expresaron como quercetina a partir de una curva de

calibración obtenida para dicho compuesto en el intervalo de 0.1 a 1 µg/mL. En las mediciones se empleó un espectrofotómetro CECIL CE 7200 (Reino Unido).

Las evidencias obtenidas en el examen fitoquímico cualitativo y cuantitativo de los componentes de las hojas del tamarindo, fueron consideradas en la selección de la naturaleza del menstroo con el propósito de alcanzar los mejores resultados extractivos.

II.2.4 Análisis de elementos minerales por Espectrometría de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP)

En este estudio se consideraron elementos esenciales a los que se les reconoce acción antimicrobiana y aquellos de valencia múltiple que, por sus posibles cambios de estados de oxidación, puedan jugar un papel importante en el balance REDOX de la célula como el Cobre (Cu), Hierro (Fe), Selenio (Se), Molibdeno (Mo), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Manganeso (Mn), Cromo (Cr), y Vanadio (V). Se incluyeron además, aquellos elementos que forman parte de enzimas antioxidantes importantes como el Zinc (Zn), y los que por su toxicidad deben ser monitoreados como es el caso del Plomo (Pb) y del Cadmio (Cd).

Se procedió a la digestión de 2 g de droga seca (acápite II.1) en una mezcla de ácidos nítrico/clorhídrico concentrados y el material resultante fue filtrado y trasvasado a un volumétrico de 25 mL para su posterior análisis por Espectrometría de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP) en un equipo SPECRO ARCOS (Alemania) de vista axial. Igual metodología se empleó para determinar las concentraciones de dichos elementos del suelo donde crece la población de tamarindo en estudio. Todos los reactivos empleados fueron de calidad espectral.

En la preparación de las soluciones se empleó agua des-ionizada con una conductividad menor de 0.1 µΩ/cm. Las condiciones de experimentación se refieren a continuación:

Parámetros	Condiciones	Parámetros	Condiciones
Frecuencia	27 MHz	Tipo de nebulizador	Meinhard (concéntrico)
Energía del plasma	1.4 KW	Tipo de antorcha	De una sola pieza
Tiempo de integración	24 seg	V. Flujo del gas portador	0.4-1.5 L/min (optimizada)
Corrección del fondo	dinámica	V. Flujo del gas auxiliar	1 L/min
Preflujo lento	2,28 rpm	V. Flujo del gas formador plasma	12 L/min
Número de mediciones	3	Preflujo rapido	4,20 mL/min (63 rpm)
Ranura de entrada	25 µm	Distancia de observación	3-10 mm (optimizada)
Dispersión	0.55 mm/min	Resolución del monocromador	0.0137 mm
Factor de tiempo	100 %	Distancia focal del espectro	750 mm

II.3 Influencia de la concentración de etanol y el tiempo de humectación en el proceso de extracción de metabolitos

La experiencia de nuestro grupo de investigación durante 18 años, sugirió que los parámetros concentración hidroalcohólica y tiempo de humectación son los que más influyen en el proceso de extracción de metabolitos en las hojas de *Tamarindus indica* L. Esta es la razón por lo que en la Tesis sólo fueron considerados estos dos parámetros.

II.3.1 Selección del solvente con mayor capacidad de extracción de metabolitos

Para cumplimentar esta parte del trabajo experimental se prepararon extractos fluidos por percolación (similar a II.2.3) de las hojas secas y molinadas (acápite II.1), empleando concentraciones hidroalcohólicas al 60; 70; 80 y 90 %. Las condiciones de laboratorio y la droga con que se prepararon los extractos fluidos fueron las mismas, variando únicamente la naturaleza del menstuo a utilizar. Para aumentar la reproducibilidad con relación a la composición de las formulaciones, se prepararon extractos fluidos provenientes de hojas de plantas en dos etapas diferentes del ciclo de vida: floración y fructificación con vistas a su comparación. Para su caracterización se emplearon los siguientes parámetros cuantitativos, indicativos de la capacidad extractiva:

- **Sólidos Totales:** Se determinaron según la Norma Ramal de Salud Pública 312/91¹⁴⁰
- **Cenizas Totales:** Se determinaron por modificación de la técnica descrita en la NRSP 309/91¹⁴¹, sustituyendo los dos gramos de droga por dos mililitros del extracto a evaluar.
- **Fenoles Totales:** Se empleó la metodología explicada en el acápite (II.2.3)
- **Flavonoides Totales:** Se empleó la metodología explicada en el acápite (II.2.3)
- **Carbohidratos Totales:** Se realizó empleando el método colorimétrico fenol-sulfúrico¹⁴², midiendo las absorbancias a 490 nm, en un espectrofotómetro Ultrospec III (Farmacia LKB. Suecia). Los resultados se expresaron como D-glucosa a partir de una curva de calibración obtenida para dicho compuesto en el intervalo de 0.01 y 0.1 mg/mL.

Debido a las diferencias en cuanto a las unidades de las cinco variables cuantitativas consideradas, se realizó un procedimiento de conversión de los datos cuantitativos continuos en datos ordinales. Además, se efectuó una jerarquización de los datos con vistas

a ponderar el valor ordinal en función de la relevancia o potencialidad farmacológica de la variable medida. Los patrones de conversión fueron los siguientes:

- Asignar valores de cuatro, tres, dos y uno, según los valores de la variable cuantitativa medida: cuatro al de mayor valor y uno al de menor valor.
- Establecer tres niveles de importancia de variables, asignándole valores de tres, dos y uno. Las variables fenoles y flavonoides totales se consideraron las de mayor importancia, asignándoles el valor de tres. A los sólidos totales se les asignó el valor de dos, y a las variables cenizas y carbohidratos totales el valor de uno.

De tal forma, la capacidad extractiva de cada solvente fue definida por un valor matemático calculado para cada extracto, el cual fue el resultado de la sumatoria del producto del nivel jerárquico de cada variable por los valores ordinales asignados en cada caso. El solvente con mayor capacidad extractiva será aquel cuyo valor matemático calculado sea mayor.

Además de estas variables cuantitativas, indicativas de la capacidad de extracción, se consideraron otras dos variables de naturaleza cualitativa para, en caso necesario, reforzar la selección de uno u otro solvente. Estas variables fueron:

- **pH:** Se determinó según la Norma Ramal de Salud Pública 312/91
- **Espectro UV-Visible:** Se evaluaron los máximos de absorbancia en la región comprendida entre 190 y 900 nm en un espectrofotómetro CECIL CE 7200 (Reino Unido) por un analista. El experimento se repitió por un segundo analista en un espectrofotómetro Ultrospec III (Farmacia LKB. Suecia).

II.3.2 Evaluación de la influencia de la concentración de etanol y tiempo de humectación en el proceso extractivo

Se realizó un diseño de experimentos del tipo compuesto central 2^3 más principal (8 experimentos del diseño y dos puntos centrales), en el que se fijaron todas las condiciones de extracción (acápites II.1 y II.2.3) modificando exclusivamente los parámetros concentración de etanol y tiempo de humectación por las razones antes expuestas. Se evaluó la influencia de los mismos sobre cada una de las variables dependientes cuantificadas en el acápite anterior (sólidos, cenizas, fenoles, flavonoides y carbohidratos totales) en los extractos fluidos preparados. Se empleó el software STATGRAPHICS Plus versión 5.1 para Windows (Graphics Software Systems, STCC, 2000, Rockville, MD, USA). La calidad de los modelos se evaluó a partir de los valores del coeficiente de

determinación (r^2), del p-valor de la prueba de Durbin-Watson y el p-valor de la prueba de falta de ajuste. Los niveles empleados para cada variable fueron:

Variables independientes	Código	Niveles de Variable				
		-1.414	-1	0	1	1.414
Concentración de etanol (%)	X ₁	55.86	60	70	80	84.14
Tiempo de humectación (min)	X ₂	17.57	30	60	90	102.43

La opción de optimización de respuesta múltiple del programa estadístico STATGRAPHICS Plus se empleó para obtener la combinación adecuada de parámetros en la que la expresión de las cinco variables dependientes cuantificadas sea un máximo. Para esto, el programa tiene implementada la opción de “función de conveniencia”. Al igual que en el acápite anterior, se realizó una jerarquización bajo los mismos criterios, de cada una de las variables respuesta.

Se comprobó la efectividad de las predicciones realizadas en la función conveniencia, mediante la reproducción experimental de la combinación de factores (concentración de etanol y tiempo de humectación) sugerida por el modelo. Se determinaron los valores de cada una de las cinco variables respuesta por quintuplicado, y fueron comparados estadísticamente con los predichos por la función, empleando una prueba de contraste de hipótesis.

II.4 Formulación y caracterización del extracto fluido en etanol al 70 %

II.4.1 Formulación de los extractos fluidos. Características organolépticas

Se prepararon extractos fluidos según las condiciones obtenidas en el proceso de evaluación del proceso extractivo desarrollado en el acápite anterior. Se partió de 50 g de la droga seca y se realizó el proceso de extracción por percolación durante tres días. Los extractos colectados se reunieron y se concentraron en un rotoevaporador KIRKA-WERKE de procedencia alemana a temperaturas inferiores a los 50 °C hasta los 50 mL establecidos.

Los extractos fluidos se formularon con material vegetal colectado en diferentes etapas del ciclo de vida de la planta en un período de dos años. Se tomó muestra los meses de Junio 2007 y 2008 (Estado vegetativo), Noviembre 2007 y 2008 (Floración) y Marzo 2008 y 2009 (Fructificación). La recolección y el tratamiento del material vegetal se realizó de manera similar a lo descrito en acápites anteriores (II.1). Paralelamente a esto se desarrolló

un estudio de dinámica de acumulación en el período comprendido entre Agosto 2007 a Junio 2008 bajo las mismas condiciones.

Las propiedades organolépticas color, olor y sabor, se determinaron según la Norma Ramal de Salud pública 312/91.

II.4.2 Caracterización físico-química de los extractos fluidos en etanol al 70 %

Cada extracto fue caracterizado desde el punto de vista físico-químico según la metodología descrita en la NRSP 312/91. Los parámetros determinados fueron: pH, sólidos totales, densidad relativa, índice de refracción. Además, se estimaron las cenizas totales según la modificación de la NRSP 309/91 descrita en el acápite II.3.1.

II.4.3 Caracterización química general del extracto fluido en etanol al 70 %

Como variables en la caracterización química de los extractos fluidos se consideraron los fenoles, flavonoides y carbohidratos totales, cuantificados según las metodologías referidas en el acápite II.3.1. Además, se realizó la determinación de los elementos inorgánicos previamente estimados en las hojas (acápite II.2.4), pero empleando en vez de dos gramos de droga seca, dos mililitros del extracto fluido.

II.4.4 Fraccionamiento químico del extracto fluido en etanol al 70 %. Caracterización espectroscópica

El extracto fluido se sometió a un fraccionamiento líquido-líquido con solventes de creciente polaridad (n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol). Las fracciones más apolares (n-hexano y cloroformo) se analizaron por CG/EM en iguales condiciones a las declaradas en el acápite II.2.1. Las fracciones más polares (acetato de etilo y n-butanol) se analizaron por cromatografía de capa delgada: método unidimensional con sistema de solventes fenol-agua (3:1); y método bidimensional con butanol-acético-agua (4:1:3) y (6:1:2) como primer sistema de solvente, y ácido acético al 5% como segundo solvente. Luego de optimizado el sistema de solventes, se realizó una cromatografía en placas de alta resolución (HPTLC) acoplado a un espectrofotómetro UV-visible LINOMAT IV con arreglo de diodo (CAMAG, Suiza). En todos los casos se utilizaron placas de sílica gel de dimensiones 20x20 (Merck EMD, Alemania).

Como reveladores se emplearon el hidróxido de amonio (NH₄OH), una lámpara ultravioleta de onda larga y el cloruro de aluminio (AlCl₃) al 2,5% en metanol. La

caracterización parcial se realizó mediante las razones de flujo (Rf) referidas por Harbone¹⁴³.

La separación cromatográfica por HPTLC se realizó en una cámara horizontal de 10/10 por el método bidimensional con los sistemas móviles: n-butanol-acético-agua (6:1:2, v/v/v) y ácido acético al 5%, sistema de solventes con mejores resultados resolutivos en la técnica de cromatografía de capa delgada (TLC).

La aplicación de las muestras se desarrolló con un aplicador automático en forma de bandas LINOMAT IV (CAMAG, Suiza) con un ancho de bandas de 3 mm y un volumen de 10 µl en placas de sílica gel 60F₂₅₄ (Merck, Alemania) de dimensiones 10x10 con indicador interno de fluorescencia. La lectura de las bandas se realizó por absorción a 254 nm con una velocidad de barrido de 4 mm/s en un densitómetro Scanner II (CAMAG, Suiza).

A las manchas con mayor intensidad de absorción se les registró el espectro de absorción en la región ultravioleta-visible. Se empleó la opción “pureza” del software CATS (*Planar Chromatography Manager*) versión 3.20, el cual realiza una medición espectral al inicio, a mediados y al final de la mancha. Los valores de las razones de flujo fueron determinados automáticamente por el equipo, considerando el centro de la muestra como la zona de mayor intensidad de absorción. Todas las determinaciones se realizaron en el densitómetro Scanner II (CAMAG, Suiza).

II.5 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto fluido y sus fracciones

II.5.1 Actividad frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH)

El radical libre 2,2 difenil -1-picrilhidracilo es un radical que permanece estable cuando se le disuelve en etanol, presentando un máximo de absorbancia a los 517 nm. El ensayo se basa en la reducción del radical libre estable 2,2 difenil -1-picrilhidracilo por los antioxidantes que se encuentren en la solución a evaluar¹⁴⁴. El extracto fluido al 70% y sus fracciones (acápite II.4.3) fueron concentrados a sequedad por liofilización (TELSTAR, LIOALFA-6, España) y redissueltos en etanol absoluto, manteniendo la proporción de 1 mL por cada gramo de droga seca de partida tanto para el extracto fluido como para sus fracciones. El experimento se realizó por triplicado con siete niveles de concentración para cada extracto.

En términos generales, a 2 mL de las disoluciones del extracto a evaluar se les adiciona 1 mL de solución etanólica de DPPH 0,1 mmol/L (Sigma, ref. D9132), se homogeneizó e

incubó 1h a 25 °C. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 517 nm. La solución de DPPH se empleó como control de absorbancia, las disoluciones de los extractos en etanol como blancos, y soluciones etanólicas de Quercetina (Fluka, Alemania) como control positivo. El porcentaje de inhibición del radical DPPH se determinó por la ecuación:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = (AP-AM)/AP * 100$$

ecuación 1

Donde:

AM = Absorbancia del extracto evaluado (Muestra)

AP = Absorbancia del DPPH (control de absorbancia)

Los datos fueron normalizados empleando el logaritmo natural de las concentraciones ensayadas. Posteriormente, se realizó una regresión lineal entre los logaritmos de las concentraciones y los porcentos de inhibición del DPPH. Basado en esta relación se calculó la concentración del extracto necesaria para la inhibición del 50% de la cantidad inicial de DPPH (IC₅₀).

A cada una de las fracciones se les determinó además, los valores de concentración de fenoles y flavonoides totales (III.1). A partir de los valores de fenoles y flavonoides totales calculados para el extracto fluido al 70 % y sus fracciones, se obtuvo la matriz de correlación entre la variable farmacológica (porcentaje de inhibición del DPPH, IC₅₀) vs las variables químicas (concentraciones de fenoles y flavonoides totales), para estimar la posible influencia de dichos compuestos en la actividad evaluada.

II.5.2 Determinación del Poder Reductor

El poder reductor se determinó por la técnica referida por Yen y Chen¹⁴⁵ al extracto fluido al 70 % y sus fracciones, que fueron concentrados a sequedad en un rotoevaporador KIKA-WERKE (Alemania) y redisueltas en etanol al 70% (mL/g de droga seca). Se emplearon cinco niveles de concentración de los extractos analizados. A 1 mL de las muestras o del solvente (blanco) se adicionó 2,5 mL de tampón fosfato 0,2 mol/L, pH 6,6 y 2,5 mL de solución de ferricianuro de potasio (10 mg/mL). Se incubó 20 min. a 50 °C y una vez frescas las muestras, se añadió 2,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de ácido tricloroacético 10 mg/mL. A continuación, se tomaron 2,5 mL de esta mezcla, a los que se adicionó 2,5 mL de agua destilada y 0,5 mL de cloruro férrico (1,0 mg/mL). Las

absorbancias de las muestras se registraron a 700 nm en un espectrofotómetro Ultrospec III (PHARMACIA LKB, Suecia). Como sustancia de referencia se empleó la quercetina.

Los datos fueron normalizados empleando el logaritmo natural de las concentraciones ensayadas. Mediante regresión lineal simple entre los logaritmos de las concentraciones y la absorbancia del complejo de hierro II formado, se determinó la concentración del extracto a la cual se alcanza un valor de absorbancia que resulte común a todas las fracciones activas ($A = 0,300$). En este ensayo, un incremento de la absorbancia es interpretado como un incremento del poder reductor.

De modo análogo al ensayo de reducción del DPPH, fue obtenida la matriz de correlación entre la variable Poder de reducción vs concentración de fenoles y flavonoides totales, determinándose la posible influencia de estos compuestos en la actividad medida.

II.5.3 Determinación de la capacidad de acomplejamiento de Fe^{2+}

La capacidad de acomplejamiento de Fe^{2+} se realizó según el método descrito por Andjelkovic y col¹⁴⁶. Se registró el espectro UV/visible (200-800 nm) de los extractos a evaluar, antes y después de añadir alícuotas de sulfato de hierro heptahidratado ($FeSO_4 \times 7H_2O$) a concentraciones de 0,01 y 0,1 mmol/L en un espectrofotómetro RAY LEIGH UV-2601 (China). Para ello, se emplearon cinco concentraciones diferentes del extracto fluido en etanol al 70%, sus fracciones, etanol al 70% como blanco y la quercetina como sustancia de referencia. Las fracciones fueron previamente concentradas a sequedad en un rotoevaporador KIKA-WERKE (Alemania), y posteriormente redisueltas en etanol al 70% (mL/g de droga seca). La capacidad de acomplejamiento de Fe^{2+} se evaluó a partir de los corrimientos o saltos batocrómicos experimentados por la muestra en estudio, definiendo para cada extracto o fracción las longitudes de onda más significativas. Se consideraron preferentemente la generación de nuevos picos de absorbancia y aquellos incrementos localizados en zonas donde la fracción o extracto no presenta máximos de absorción cercanos. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Todas las soluciones empleadas fueron preparadas periódicamente empleando agua bidestilada, la cual posteriormente se somete a baño ultrasónico por 45 minutos para eliminar el oxígeno libre que pueda promover la oxidación no sólo del Fe^{2+} sino también de componentes del resto de las soluciones empleadas. La totalidad de las mediciones se realizaron en tampón imidazol pH 7,3, preparado según la Farmacopea Británica¹³⁴.

Para cada extracto o fracción se definió la longitud de onda a la cual absorben los productos de la reacción con el Fe^{2+} . Se representó gráficamente el inverso de la absorbancia (a la longitud de onda definida) vs el inverso de la concentración ($1/A$ vs $1/C$), y se estimó la ecuación de la recta que describe el fenómeno.

La capacidad acomplejante de las fracciones se estimó a través de la constante de acomplejamiento según la ecuación:

$$k = \text{intercepto/pendiente}$$

ecuación 2

El secuestro del Fe^{2+} por agentes quelantes es una vía importante para evaluar la actividad antioxidante de una sustancia. Sin embargo, el complejo formado deberá permanecer estable reteniendo el ión para que éste no sea cedido nuevamente al medio. Para evaluar la estabilidad de los complejos formados, se prepararon soluciones del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), las que fueron añadidas en concentraciones de 0,01 y 0,1 mmol/L a los complejos formados en el ensayo anterior. Se determinó el porcentaje de complejo remanente por medición de la intensidad de absorción de la mezcla, antes y después de añadido el EDTA.

II.5.4 Determinación del porcentaje de inhibición de la producción de Oxido Nítrico (NO^{\bullet})

En una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo en U (Rubilabor, España) se depositaron 300 μL de una suspensión de leucocitos humanos en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) (Sigma cod. H8264) preparada a partir de sangre humana total. Posteriormente, se añadieron seis niveles de concentraciones decrecientes de las fracciones a evaluar. Se adicionaron además, 20 μL de solución de HBSS en los pocillos correspondientes a los controles y se incubaron 10 min a 37 °C con agitación horizontal (Incubator SI50, Stuart Scientific, UK). Luego se agregaron 20 μL del Lipopolisacárido bacteriano (LPS) de *E. coli* 0127:B8 (Sigma cod. L3129) como estimulante de la producción de NO^{\bullet} y se incubó la muestra durante una hora a 37°C con agitación horizontal. A continuación se centrifugó a 2700 rpm durante 12 min, y se tomaron 100 μL del sobrenadante que fue transferido a placas de ELISA de 96 pocillos de fondo plano B/UC/50u (Rubilabor, España). Se añadieron 100 μL del reactivo de Griess (Sigma) y se incubó la muestra 15 min a temperatura ambiente, procediendo a su lectura a 540 nm en un lector de microplacas (Benchmark Plus, Bio-Rad Laboratories Inc., USA)¹⁴⁷.

Los datos fueron normalizados empleando el logaritmo natural de las concentraciones ensayadas. Por regresión lineal entre los logaritmos de la concentración y los porcentos de inhibición de producción del óxido nítrico (NO[•]) se determinaron las IC₅₀, definiéndose éstas como la concentración del extracto necesaria para la inhibición del 50% de la cantidad inicial de óxido nítrico. La sustancia de referencia utilizada fue la N-monometil L-arginina (L-NMMA) (Sigma), que posee actividad inhibidora de la óxido nítrico sintasa inducible. Se estimó la matriz de correlación entre las variables químicas: concentración de fenoles y flavonoides totales y la variable farmacológica medida, estimándose la posible influencia de estos compuestos en la actividad evaluada.

II.5.5 Determinación del por ciento de inhibición de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en leucocitos humanos por Citometría de Flujo

En tubos cónicos de polipropileno que contienen 5 mL de la suspensión de leucocitos humanos, se añadió 100 µL de una solución de diacetato de diclorofluorescina (DCFH-DA) a una concentración de 10 µmol/L y 100 µL de solución de azida sódica (NaN₃) de concentración 10 µmol/L. Se incubó 10 min en la oscuridad a 37°C, con agitación horizontal (Incubator SI50, Stuart Scientific, UK). A continuación, se centrifugó 5 min a 3000 rpm y el precipitado se resuspendió en solución salina balanceada de Hanks (HBSS). De la suspensión resultante se tomaron alícuotas de 300 µL, estableciéndose como grupos experimentales: un grupo control, un grupo estimulado con 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) (Sigma, ref. P-8139) y grupos tratados (el estimulante más las fracciones a ensayar); cada muestra se evaluó por duplicado. Primeramente se añadieron los extractos a ocho niveles de concentración, y se incubó en la oscuridad durante 5 min a 37 °C, con agitación horizontal (60-70 ciclos/minuto). Seguidamente, se adicionó el PMA como estimulante de la producción de las ERO a todos los tubos, excepto al grupo control, y se incubó 5 min a 37 °C con agitación horizontal (Incubator SI50, Stuart Scientific, UK). La reacción se detuvo mediante incubación con hielo. Cinco minutos antes del análisis por citometría flujo, se añadió ioduro de propidio (IP) a una concentración final de 10 µg/mL, para estimar la viabilidad celular. Las células no estimuladas presentaron relativamente poca fluorescencia, y sirven de referencia para el análisis de las células estimuladas. La lectura se realizó en un citómetro de flujo *Coulter Epics Elite* (Coulter Corp. Hialeah, USA) de la Unidad de Citometría de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona, entre cinco y quince segundos después de la estabilización del flujo.

Los tipos de células estudiadas fueron poblaciones viables (IP-negativas) de polimorfonucleares y monocitos. Los análisis citométricos fueron procesados empleando los programas: Epic (R) COULTER ELITE versión 4.01 Flow Cytometer Workstation (1994) y WinMDI, versión 2.5 Windows Multiple Document Interface (1997).

Los datos fueron normalizados empleando el logaritmo natural de los ocho niveles de concentración ensayados. Por regresión lineal de los logaritmos de la concentración y los porcentos de inhibición de las ERO se determinaron las IC_{50} , definiendo éstas como la concentración del extracto necesaria para la inhibición del 50% de las ERO producidas. La sustancia de referencia utilizada fue la quercetina.

De igual modo que en el resto de las variables farmacológicas medidas, se estimó la matriz de correlación entre el porcentaje de inhibición de ERO y los valores de fenoles y flavonoides totales en el extracto fluido al 70% y sus fracciones para evaluar la posible influencia de estos compuestos en la actividad medida.

II.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto fluido y sus fracciones

Se elaboraron un total de cinco extractos primarios o totales y cuatro secundarios o fracciones. Se definieron como extractos primarios o totales aquellos que fueron obtenidos a partir de la extracción directa de las hojas del tamarindo (M_1 - M_5), y como extractos secundarios o fraccionados (M_6 - M_9) los que se obtuvieron por fraccionamiento de un extracto primario.

Los extractos M_1 y M_2 reproducen métodos de extracción sencillos empleados por la población. En ambos casos, se obtuvieron por decocción según refiere la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica¹⁴⁸, a partir de 10 g de hojas frescas en 100 mL de agua para el caso de M_1 y 10 g de hojas secas en 100 mL de agua para M_2 . Los extractos M_3 y M_4 son extractos fluidos a partir de la droga seca (30 g) en etanol al 30 y al 70 %, respectivamente. En ambos extractos, el método de obtención empleado fue la percolación, según la Norma Ramal de Salud Pública 311/91. Se seleccionaron estas dos concentraciones etanólicas, al estar comprendidas en niveles intermedios de polaridad entre el agua y el etanol, garantizando así la obtención de extractos de diferente polaridad, y por lo tanto, la existencia de una probable diferencia en cuanto a composición química. Por su parte, M_5 es un extracto de compuestos volátiles, obtenido por hidrodestilación de las hojas frescas de la especie.

Los extractos secundarios (**M₆-M₉**) corresponden a las fracciones de n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol, derivados del extracto fluido al 70 %. Las mismas fueron concentradas a sequedad en rotoevaporador y redisueltas en 300 mL de etanol 70 %. Nuevamente se concentró a presión reducida a 45°C hasta 30 mL, para un equivalente de un mililitro por cada gramo de droga seca de partida.

Todos los extractos fueron caracterizados en cuanto a la concentración de polifenoles y flavonoides, a excepción del extracto M₅, el cual fue analizado por cromatografía gaseosa y espectrometría de masas. En todos los casos se empleó la misma metodología que en los ensayos anteriormente descritos.

II.6.1 Cepas microbianas y sustancias controles

Se emplearon cepas de referencia procedentes de la ATCC (*American Type Culture Collection*), excepto la levadura *Candida albicans*, perteneciente a la colección de cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente.

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	<i>Candida albicans</i>	CCEBI 2048
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028		

Como sustancias de referencia se emplearon discos de antimicrobianos: Gentamicina (10 UI) para la totalidad de las bacterias, y Ketoconazol (30 ug) para la levadura *Candida albicans*, procedentes de la Empresa de Productos Biológicos “Carlos J. Finlay”, (La Habana, Cuba). Se contempló además, un control de crecimiento del solvente utilizado, el cual consistió en 30 mL del resultado de la concentración a presión reducida de 300 mL de etanol al 70 % en rotoevaporador (45 °C); procedimiento similar al realizado al extracto fluido y sus fracciones.

II.6.2 Pruebas de susceptibilidad microbiana. Acción antimicrobiana directa

II.6.2.1 Ensayo de difusión en disco

Se empleó el método recomendado por el Sub Comité de Ensayos de Susceptibilidad del NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), basado en el procedimiento descrito originalmente por Kirby-Bauer¹⁴⁹.

De forma general, se inoculó 0,1 mL de las suspensiones de los microorganismos ensayados a la concentración aproximada de $1-2 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UCF)/mL en placas de Agar Mueller-Hinton (BIOCEN) para las bacterias, y agar Papa-Dextrosa (SIGMA) para la levadura.

A continuación, se colocaron los discos sobre la superficie de las placas inoculadas con los microorganismos, las que se incubaron a 35 °C durante 16-24 h. Transcurrido este tiempo, fueron medidos los diámetros (mm) de la zona de inhibición. Se consideraron como activas aquellas muestras con halos de inhibición mayores de 6 mm de diámetro¹⁵⁰. Este procedimiento fue realizado por triplicado para cada uno de los extractos primarios y secundarios frente a cada microorganismo.

II.6.2.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB)

Este ensayo se realizó a través del método de microdilución en caldo para los extractos primarios o totales que resultaron positivos en la prueba de Kirby-Bauer.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) corresponde a la menor concentración del extracto capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento visible del microorganismo. Para su estimación, se prepararon ocho diluciones seriadas de los extractos en caldo nutriente estéril. Los intervalos de concentración resultaron de 0,15 a 0,001 g/mL para los extractos M₁ y M₂ y de 1,5 a 0,01 g/mL para los extractos M₃ y M₄. Se incluyeron además, un control de esterilidad y un control de crecimiento. Se añadieron a continuación, 100 µL de los inóculos microbianos ajustados a 0,5 en la escala de MacFarland, excepto al de control de esterilidad, y se inoculó a 35°C durante 16-20 h.

La CMI se estimó como la menor concentración de los extractos que a simple vista inhibió completamente el crecimiento del microorganismo estudiado. La interpretación de los resultados, se facilitó tomando como referencia el crecimiento observado en los tubos usados como control de crecimiento¹⁵¹.

Una vez obtenida la CMI, se procedió a la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) mediante subcultivos en placas con medio Mueller-Hinton de los tubos inoculados previamente, en los que no se observó crecimiento. Las placas fueron incubadas a 35°C durante 24 horas. La concentración mínima bactericida se refirió a la mínima concentración de los extractos que permite sobrevivir a menos del 0,1% del inóculo original.

II.6.2.3 Correlación de la actividad con la composición de polifenoles y flavonoides

Basado en que las muestras de los extractos para la determinación de las CMI y las CMB se prepararon por el método de doble dilución, se estimó la concentración de fenoles y flavonoides presentes en las CMI y CMB para cada extracto, definiéndolas como $C_{x,y}$ donde:

x se refiere al metabolito considerado (fenoles o flavonoides)

y se refiere a la cepa considerada.

Posteriormente, se determinó el coeficiente de variación (CV) entre las $C_{x,y}$ de cada extracto (ecuación 3). Se partió de la premisa que de ser los fenoles o los flavonoides los responsables únicos de la actividad, entonces independientemente del método de preparación y el menstuo empleado, los valores de $C_{x,y}$ deberán ser similares. Se consideró que la concentración de fenoles o flavonoides influye cuantitativamente en la actividad del extracto cuando el coeficiente de variación calculado no excedió el 15%.

$$\text{Coeficiente de variación} = (\text{Desviación estándar} / \text{media}) * 100$$

Ecuación 3

II.6.3 Actividad *in vitro* sobre el sistema del complemento. Acción antimicrobiana indirecta

Se evaluó la actividad *in vitro* del sistema de complemento por la vía clásica y la vía alternativa mediante el ensayo de hemólisis eritrocitaria. El método se fundamenta en la estimación espectrofotométrica de la lisis de los eritrocitos por el complejo de ataque a la membrana (CAM).

Para los experimentos de la vía clásica, se utilizaron eritrocitos obtenidos a partir de sangre fresca de carnero (SRBC), procedente de la granja de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Las células fueron lavadas dos veces con solución salina y sensibilizadas con anticuerpos anti-eritrocitos de carnero (ShEA) (ICN Ibérica, España). Como fuente de proteínas del complemento se empleó suero humano, obtenido de sangre procedente de voluntarios sanos.

En los ensayos de la vía alternativa se emplearon eritrocitos (no sensibilizados) de conejo (New Zeland White, PiPetit/Harlan-Ibérica). La activación de la vía clásica se inhibió mediante la adición de etilenglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-ácido tetracético (EGTA), agente quelante del calcio. Como fuente de proteínas del complemento, se empleó igualmente, suero humano, obtenido de sangre procedente de voluntarios sanos.

En placas de fondo en U (Rubilabor, España) se incubaron 100 μ L de diluciones dobles seriadas en tampón de barbital sódico (Veronal, VSB⁺⁺ para la vía clásica y Veronal, EGTA-VB, para la vía alternativa) de las muestras correspondientes al extracto fluido al 70 % de las hojas de *Tamarindus indica* L. y sus fracciones, con 50 μ L de suero humano inactivado. Se incubó a 37 °C durante 30 min. y a continuación se añadió a cada pocillo 50 μ L de los eritrocitos (de carnero sensibilizados con anticuerpos para la vía clásica, y de conejo no sensibilizados para la vía alternativa), incubando a 37°C (60 min. para la vía clásica y 30 min. para la vía alternativa). Transcurrido ese tiempo, se centrifugó dos minutos a 2500 rpm y se transfirió 50 μ L del sobrenadante de la hemólisis a una placa de fondo plano que contiene en sus pocillos 200 μ L de agua milli-Q. Se procedió al registro de las absorbancias en un lector de microplacas (Benchmark Plus, Bio-Rad Laboratories Inc., USA) a 405 nm.

En los experimentos se incluyeron controles correspondientes al suero, controles de hemólisis espontánea y de hemólisis total. Los datos fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la lisis en función de las concentraciones de las muestras evaluadas. A partir de esas curvas fueron estimados los valores de IC₅₀. Se empleó como sustancia de referencia para ambos métodos la quercetina.

II.7 Análisis estadístico

Todos los análisis de los resultados se realizaron empleando el software STATGRAPHICS-plus versión 5.1 para Windows (Graphics Software Systems, STCC, Inc., Rockville, MD, USA). En la evaluación del proceso de extracción de metabolitos se empleó un diseño de experimentos de compuesto central 2³ más principal así como su expresión gráfica en la forma de superficie respuesta. También se empleó la prueba de contraste de hipótesis para comprobar diferencias entre los valores predichos y observados. Las diferencias entre grupos de tratamiento se evaluaron mediante la prueba de la t de Student para el caso de la comparación entre dos muestras, y el análisis de varianza (ANOVA) acoplado a la prueba de las máximas diferencias significativas de Tukey (HSD) para las comparaciones múltiples.

Los datos correspondientes a los diferentes ensayos antioxidantes fueron normalizados por transformación logarítmica de los valores de concentración empleados. Las IC₅₀ de cada actividad considerada se determinaron por análisis de regresión lineal entre los logaritmos de las concentraciones y la actividad medida. Además, se estimaron las matrices de

correlación existentes entre las IC_{50} calculadas y los valores de concentración de fenoles y flavonoides totales determinados al extracto fluido al 70 % y sus fracciones, para evaluar la posible influencia de estos compuestos en la actividad medida.

Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Caracterización fitoquímica de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L.

La exploración fitoquímica de las especies medicinales a estudiar resulta de especial importancia, pues permitirá determinar aquellos metabolitos mayoritarios que potencialmente podrán participar en la actividad/toxicidad de la especie investigada. Se prefiere por ello, que el estudio fitoquímico se desarrolle explorando más de un método de extracción y más de un solvente, para garantizar así el conocimiento de los diferentes componentes mayoritarios de la planta¹⁵².

III.1.1 Extracción en Soxhlet con cloroformo. Análisis por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (CG/EM)

La extracción con cloroformo en Soxhlet rindió un total de 18 compuestos mayoritarios que representaron el 90,83% del total extraído (Tabla I, Anexo I).

Las hojas del tamarindo han sido poco estudiadas con relación a su composición química, por lo que 11 de los 18 compuestos identificados constituyen un primer informe para el órgano, y algunos el primero para la planta. Analizando su naturaleza, se observa que los compuestos designados desde el 1-5 así como el 9 y el 10 son compuestos volátiles. Ello constituye una primera referencia mundial para el órgano en experimentación. Estudios anteriores han informado aceites esenciales en los frutos^{55,56}, pero de los compuestos determinados en el presente trabajo, sólo el *p*-cimeno y el limoneno coinciden con los referidos por otros autores. Este tipo de comportamiento es característico de los aceites esenciales, pues existe una variabilidad importante de producción de estos metabolitos, incluso dentro de un mismo órgano. Desde el punto de vista químico, los compuestos volátiles determinados se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, a excepción de la farnesilcetona (compuesto 9), una cetona lineal tri-insaturada de distribución restringida, aunque ha sido anteriormente aislada del tomate y el tabaco¹⁵³.

Los aceites esenciales han sido frecuentemente descritos como agentes antimicrobianos¹⁵⁴, antifúngicos¹⁵⁵, antivirales¹⁵⁶ e incluso como acaricidas¹⁵⁷ y larvicidas¹⁵⁸. Diferentes autores han evaluado la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de mayor distribución en la naturaleza¹⁵⁹; sin embargo, otros consideran que esta actividad de las plantas, radica en la acción sinérgica de sus aceites esenciales y no en su efecto individual¹⁶⁰. El mecanismo de acción que con mayor frecuencia ha sido informado es la

Tabla I. Compuestos identificados por CG/EM en hojas de *Tamarindus indica* L. secadas al sol y extraídas en Soxhlet con cloroformo

Pico	Compuesto (Estructuras químicas en el anexo I)	FM	MM	IR	%
1	<i>p</i> -cimeno	C ₁₀ H ₁₄	134	1046	4,76
2	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	136	1054	9,05
3	Difenil-éter	C ₁₂ H ₁₀ O	170	1396	5,47
4	Longifoleno	C ₁₅ H ₂₄	204	1402	7,51
5	α -cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	204	1438	5,56
6	2,6-di- <i>ter</i> -butil-4-metil fenol (BHT)	C ₁₅ H ₂₄ O	220	1519	7,24
7	Metil 3,5-di- <i>ter</i> -butil-4-hidroxibenzoato	C ₁₆ H ₂₄ O ₃	264	1872	2,76
8	Éster metílico del ácido Palmítico (C _{16:0})	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	1909	6,41
9	Farnesilcetona	C ₁₈ H ₃₀ O	262	1918	2,93
10	Linalool antranilato	C ₁₇ H ₂₃ O ₂ N	274	1959	3,96
11	3-eicosino	C ₂₀ H ₃₈	278	1987	4,62
12	Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (C _{18:3})	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	2089	2,26
13	Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	2106	4,06
14	Ester metílico del ácido 7,10- octadecadienoico (C _{18:2})	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	2149	3,49
15	Ácido 10-octadecenóico o Ácido Oleico (C _{18:1})	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	2170	2,83
16	Criptopinona	C ₂₀ H ₃₀ O	286	2177	5,28
17	Éster metílico del ácido 15-tricosenoico (C _{23:1})	C ₂₄ H ₄₆ O ₂	366	2681	8,39
18	β -Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414	3114	4,25
Total					90,83%
FM→ Formula Molecular		MM→ Masa Molecular		IR→ Índice de retención	

alteración de la estabilidad de la membrana celular, a la cual penetran debido a su carácter apolar, interfiriendo así con las importantes funciones biológicas que se realizan a este nivel¹⁶¹.

Además de su actividad antimicrobiana, los aceites esenciales también son considerados importantes agentes antioxidantes^{162,163,164}. De manera análoga a la actividad antimicrobiana, existen datos individuales de la actividad antioxidante de aceites esenciales; sin embargo, se dispone de evidencias experimentales de que la acción sinérgica de estas sustancias resulta más efectiva que la de un compuesto en particular¹⁶⁵. Aunque estructuralmente existe una variedad muy amplia de aceites esenciales, su actividad antioxidante debe estar fundamentada por la presencia de múltiples funciones oxigenadas e insaturaciones.

Otro grupo importante de compuestos identificados lo constituyen los ácidos grasos (compuestos 8; 12; 14; 15 y 17), metabolitos que han sido descritos no sólo en hojas, sino también en los frutos⁴⁷ y semillas¹⁶⁶. Estudios realizados señalan que las hojas del tamarindo producen mayoritariamente ácidos grasos de naturaleza C_{16:0}, C_{18:1}, C_{18:2} y C_{18:3}, coincidiendo con las características de los compuestos 8; 12; 13 y 14⁴⁷. No obstante, en dicho trabajo no se detectaron ácidos grasos con cadena de 23 átomos de carbono como presenta el compuesto 17. En estudios más recientes, se determinó en muestras procedentes de Pakistán el ácido tricosanoico⁴⁹, análogo saturado del referido compuesto 17. En esta publicación, se refirió también, la presencia del β-sitosterol (compuesto 18), sustancia a la cual se le han atribuido características antioxidantes¹⁶⁷.

El último grupo de compuestos químicos identificado en este extracto correspondió a los derivados fenólicos. Este tipo de metabolitos, ha sido descrito con anterioridad en las hojas del tamarindo; sin embargo, ninguno de los compuestos identificados en la tesis (compuestos 6 y 7) ha sido informado previamente en ningún órgano de la planta, constituyendo una primera referencia mundial para la especie en estudio. El BHT (compuesto 6) es un antioxidante natural de gran poder inactivante de virus con envolturas lipídicas¹⁶⁸; por ello, es comúnmente empleado como preservante y antioxidante en varios productos alimenticios¹⁶⁹. Tanto el BHT como el compuesto 7 presentan escasa distribución en el reino *Plantae*. En general, la mayoría de los compuestos fenólicos muestran en alguna medida actividad antioxidante y antimicrobiana.

El difenil-éter (compuesto 3) es un importante componente aislado del té verde, aunque también ha sido identificado en varias especies como *Isatis tinctoria*, *Capparis spinosa* L., *Rosa damascena* Mill, y *Mangifera indica* L¹⁷⁰.

Por su parte, el 3-ecosino (compuesto 11) es un acetileno de amplia distribución en plantas. Los poliacetilenos constituyen los productos finales de la vía biosintética del acetato, ruta altamente desarrollada en aquellas especies pertenecientes a las subclases taxonómicas de la parte media-alta del árbol filogenético, como es el caso de la subclase *Rosidae*, a la cual pertenece el tamarindo.

El último de los compuestos determinados que constituye una novedad química para la especie es la criptopinona (compuesto 16). Desde el punto de vista estructural, es un diterpeno tricíclico, tipo aldehídico, aislado principalmente en especies de *Pinus sp.*, aunque otros géneros como el *Crotton*, *Eritroxilum* y *Aralia* también lo producen.

El fitol (compuesto 13), por su parte, es un alcohol de cadena larga que forma parte de la clorofila, por lo que su presencia en el extracto está relacionada con la actividad metabólica del órgano en estudio.

Esta variedad de compuestos: fenólicos, volátiles (esenciales o no), ácidos grasos; casi todos con actividad antioxidante y/o antibacteriana informada en la literatura, apoya la hipótesis de que en las hojas del tamarindo existe una riqueza estructural tal que las propiedades etnobotánicas descritas para la especie, podrían ser explicadas por la acción sinérgica de sustancias de diferente naturaleza química.

III.1.2 Extracción de los componentes volátiles por hidrodestilación. Análisis por Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas (CG/EM)

La extracción de los componentes volátiles suele realizarse a partir del material vegetal fresco, para evitar su pérdida por evaporación o degradación química. Sin embargo, en el acápite anterior (III.1.1) a pesar de utilizar material vegetal secado al sol, se determinó la presencia de compuestos volátiles. Por tal motivo, se procedió a la extracción de los mismos por el método de hidrodestilación de las hojas. Como resultado de este proceso se identificaron 13 componentes volátiles (Tabla II, Anexo I), con un rendimiento de 0.8 mL/kg de droga fresca. Los compuestos identificados representaron el 97.7 % del total extraído. El informe de estos compuestos constituye una novedad mundial, pues con anterioridad no habían sido descritos este tipo de compuestos en las hojas del tamarindo.

Tabla II. Compuestos volátiles identificados por CG/EM en hojas frescas de *Tamarindus indica* L., como resultado de una hidrodestilación y posterior extracción con cloroformo

Pico	Compuesto (Estructuras químicas en el anexo I)	FM	MM	IR	%
1	2-hexenal	C ₆ H ₁₀ O	98	848	1,7
2	α-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	136	937	1,0
3	β-Pineno	C ₁₀ H ₁₆	136	979	1,4
4	(E)-β-Ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	136	1037	Trazas
5	p-Cimeno	C ₁₀ H ₁₄	134	1045	0,6
6	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	136	1055	24,4
7	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1113	1,0
8	α-Terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1194	0,7
9	Nerol	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1211	1,0
10	Benzoato de bencilo	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	212	1725	40,6
11	Pentadecanol	C ₁₅ H ₃₂ O	228	1773	8,2
12	Hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	242	1866	12,4
13	Antranilato de Linalol	C ₁₇ H ₂₃ O ₂ N	274	1959	4,7
Total				97,7 %	
Rendimiento				0,8 mL/kg	
FM→ Formula Molecular		MM→ Masa Molecular		IR→ Índice de retención	

De los compuestos identificados, el 2-hexanal y el benzoato de bencilo son los de distribución más restringida. El 2-hexanal es un aldehído insaturado que ha sido encontrado en las hojas de varias plantas y en algunas glándulas de muchos insectos; mientras que el Benzoato de Bencilo se puede encontrar en el bálsamo de Perú y también en el tabaco como uno de los agentes odorizantes con funciones repelente de insectos. El resto de los compuestos son de amplia distribución en la naturaleza, incluyendo al limoneno que constituye el aceite esencial con mayor distribución en el reino vegetal. Son precisamente el limoneno y el benzoato de bencilo los compuestos mayoritarios, representando el 24.4 y el 40.6% del total identificado, respectivamente.

Al comparar estos resultados con los descritos en la fruta, resulta evidente que los 84 compuestos y el rendimiento superior a los 3 mL/kg de pulpa de fruto son apreciablemente mayores que los obtenidos para las hojas⁵⁶. Esto indica que, a pesar de ser las hojas el órgano donde se sintetiza la mayor parte de los compuestos de la planta, el destino de este tipo de metabolito es preferentemente el fruto, al cual enriquecerán con su aroma característico.

III.1.3 Extracción con solventes de mediana y alta polaridad. Tamizaje Fitoquímico y cuantificación de metabolitos secundarios

A los extractos fluidos en etanol al 30 y al 70 % y las decocciones al 10 % de las hojas frescas y secadas al sol, se les determinó la composición química por técnicas cualitativas (Tabla III). Los metabolitos secundarios de mayor importancia farmacológica (fenoles y flavonoides totales) fueron cuantificados (Tabla IV).

A pesar de que el tamizaje fitoquímico ofrece información cualitativa, permite identificar los tipos de sustancias mayoritarias presentes en los extractos, y en consecuencia discernir cuáles de los solventes son capaces de extraer las sustancias que ofrecen una mayor probabilidad de actividad farmacéutica. Esta información representa un antecedente de estudios químicos más profundos.

De los tipos de metabolitos extraídos, los fenoles y flavonoides han sido anteriormente referidos en la especie y asociados a la actividad farmacológica que le atribuye la población^{40,41,64}. También algunos fenoles simples fueron aislados en el presente trabajo en la extracción con Soxhlet, por lo que sin dudas, es un tipo de metabolito ampliamente producido por las hojas de la especie. Las saponinas, así como los triterpenos y esteroides son sustancias químicamente muy relacionadas, difiriendo una de otra sólo en la presencia

Tabla III. Metabolitos identificados cualitativamente en el Tamizaje Fitoquímico de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L.

Extracto	Decocción Hojas Frescas	Decocción Hojas Secas	Extracto Fluido etanol 30%	Extracto Fluido etanol 70%
Alcaloides	-	-	-	-
Triterpenos y Esteroides	-	-	+	++
Carotenos	-	-	-	-
Coumarinas	-	-	-	-
Quinonas	-	-	+	+
Aceites Esenciales	-	-	-	-
Flavonoides	+/-	+/-	++	+++
Grasas Fijas	-	-	-	+
Fenoles y Taninos	++	++	++	+++
Azúcares Reductores	++	+++	++	+
Saponinas	++	++	++	++
Mucílagos	-	-	-	-

(-) Resultado negativo (+/-) Resultado dudoso (+) Resultado positivo leve
 (++) Resultado positivo evidente (+++) Resultado positivo intenso

Tabla IV. Concentración de fenoles y flavonoides totales en extractos fluidos y decocciones de hojas de *Tamarindus indica* L.

Extracto	Fenoles (mg/mL)	Flavonoides (mg/mL)
Decocción Hojas Frescas al 10 %	14,83 ± 0,03 ^c	0,049 ± 0,01 ^c
Decocción Hojas Secas al 10 %	9,80 ± 0,04 ^d	0,058 ± 0,01 ^c
Extracto Fluido etanol 30 %	16,52 ± 0,05 ^b	1,106 ± 0,02 ^b
Extracto Fluido etanol 70 %	25,24 ± 0,11 ^a	2,474 ± 0,02 ^a

Letras distintas indican diferencias significativas entre los extractos para cada metabolito (ANOVA, Tukey (HSD), p< 0,05)

de unidades sacáridas enlazadas por enlaces glicosídicos. Al respecto, el lupeol es un triterpeno que ha sido aislado de las hojas del tamarindo⁴⁹.

Los azúcares reductores son sustancias producidas en el metabolismo primario de las plantas, el cual es prácticamente el mismo en todas las especies del reino. Existen además, numerosos polisacáridos con importantes actividades farmacológicas como las descritas para un compuesto de esta naturaleza, aislado de las semillas del tamarindo. Las grasas fijas son también un producto del metabolismo primario; dentro de ellas se encuentran los ácidos grasos, cuyas actividades antioxidantes han sido descritas¹⁸⁸. Estos compuestos fueron determinados por CG/EM en la extracción con Soxhlet (acápite III.1.1).

Las quinonas son el único tipo de compuesto identificado cualitativamente del cual no se tiene información previa. Son productos biosintéticamente relacionados con los flavonoides, con los que comparten cierta similitud estructural. Su determinación en los extractos hidroalcohólicos podría ser resultado de un falso positivo, pues los muchos tipos de flavonoides en estado de disolución pueden formar tautómeros quinónicos¹⁷¹.

De todos los metabolitos determinados, los fenoles y flavonoides son los que mayor importancia han recibido desde el punto farmacológico en el tamarindo; y además, se extraen en todas las formulaciones preparadas. Es por ello, que la cuantificación química de metabolitos se centró en este tipo de compuesto.

En el extracto fluido en etanol al 70 % se logró extraer significativamente las mayores cantidades de fenoles y de flavonoides. Esta observación, unida a las evidencias aportadas en el análisis cualitativo, señala al solvente con menor polaridad (etanol al 70%) como el de mejores resultados extractivos (Tabla IV).

III.1.4 Análisis de elementos minerales por Espectrometría de Plasma Inductivamente Acoplado (ICP)

En la tabla V se muestran las concentraciones de los elementos determinados en las hojas de *Tamarindus indica* L. y en el suelo donde crece la población estudiada, comparadas con informes previos en la literatura del tema. Tradicionalmente, el análisis elemental de las drogas vegetales incluye la determinación de elementos comunes como sodio, calcio, potasio y magnesio, entre otros. Sin embargo, el alcance del presente trabajo no se limitó a un análisis elemental de esta naturaleza, sino que se enfocó al estudio de los elementos que usualmente forman parte de enzimas y proteínas celulares involucrados en el sistema defensivo antioxidante y de aquellos con un grado de oxidación múltiple que pudieran

Tabla V. Concentración de los diferentes elementos inorgánicos presentes en hojas de *Tamarindus indica* L. y suelo donde crece, determinado por Espectroscopia de Plasma Inductivamente Acoplada (ICP)

Elementos ($\mu\text{g/g}$)	Cu	Fe	Se	Zn	Mo	Co	Ni	Mn	Cr	V	Pb	Cd
Hojas (Fructificación)	7,90	16,16	4,723	7,990	0,260	0,880	0,461	2,510	0,250	0,330	0,703	0,019
El-Siddig et al. (2006)	2,00	5,20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Khazada et al. (2008)	0,76	14,07	nd	8,520	nd	nd	nd	25,900	nd	nd	0,270	3,360
Suelo	0,96	34,60	0,303	0,835	0,086	0,199	0,188	14,500	0,214	0,483	0,312	0,030
Relación Hoja/Suelo	819	46,7	1561	956	302	442	245	17,3	117	68,3	225	63,3

nd→ No determinado por los autores

Los resultados se comparan con informes previos de otros autores.

estar involucrados en el equilibrio REDOX del organismo, o bien les hayan sido atribuidas propiedades antimicrobianas. Por esta razón, muchos de los elementos incluidos en el estudio no se encuentran referidos en trabajos anteriores. Se consideran además el plomo y el cadmio por sus posibles efectos tóxicos.

A modo de comparación, aquellos elementos definidos como posibles reguladores del equilibrio REDOX del organismo mostraron un comportamiento variable. Mientras el cobre se encontró en concentraciones superiores a las referidas en los trabajos precedentes, el manganeso se determina en niveles inferiores. Por su parte, el hierro y el zinc mostraron concentraciones similares a las determinadas por Khazada y col⁴⁸.

Con relación a los metales considerados por su posible toxicidad, también se observó un comportamiento variable con respecto a los estudios precedentes. Mientras el plomo se determinó en mayores concentraciones en el presente estudio, el cadmio se presentó en cantidades casi veinte veces inferiores a la del informe de Khazada y col⁴⁸. No obstante a las diferencias encontradas, las concentraciones de estos metales se hallan muy por debajo de los límites tóxicos permitidos, 500 mg/día y 250 µg/día para plomo y cadmio respectivamente¹¹⁰.

Por otra parte, se evidencia las propiedades reguladoras y bioacumuladoras del tamarindo (homeostasis); pues la relación entre las concentraciones en las hojas y el suelo varía desde un 17,3% para el manganeso hasta un 1561 % para el selenio. Se destacan también los elevados porcentos de bioacumulación de cinc (956 %) y cobre (819 %), dos de los elementos de mayor trascendencia en las propiedades farmacológicas atribuidas al tamarindo.

Adicionalmente a la importancia que se le pueda dar al hecho de que muchos de estos metales no habían sido informados con anterioridad en las hojas del tamarindo, se destacan los elevados valores de selenio, cobre y cinc, por tratarse de elementos de especial relevancia en el equilibrio REDOX de los organismos vivos. El cobre y en particular, el cinc, adquieren relevancia por su reconocida acción antimicrobiana^{172,173,174}.

III.2 Influencia de la concentración de etanol y tiempo de humectación en el proceso de extracción de metabolitos

III.2.1 Selección del solvente con mayor capacidad de extracción de metabolitos.

Considerando los resultados obtenidos en los acápite III.1.1 y III.1.3 se infiere que mientras más polar sea el solvente, menor cantidad y calidad de principios activos logra

extraer. El empleo de solventes orgánicos para la preparación de extractos farmacéuticos tiende a evitarse, pues deberá ser eliminado de forma total antes de incorporar las sustancias por él extraídas a una formulación. Esto genera no sólo un gasto económico, sino también posibles daños ecológicos. El etanol, por su parte, es una sustancia de polaridad media, pero económicamente más asequible y de menor impacto ecológico. Además, pequeñas cantidades del mismo son tolerados por el organismo, constituyendo un solvente de excelencia para la preparación de formulaciones farmacéuticas en las que se pretenda extraer sustancias apolares. Por ello, se seleccionó para continuar el estudio, preparándose soluciones hidroalcohólicas al 60, 70, 80 y 90 %, que fueron empleadas en la obtención de extractos fluidos por percolación.

Los resultados de las variables cualitativas consideradas se presentan en las tablas VI y VII. A una mayor concentración de etanol, la acidez de los extractos preparados aumenta, independientemente de la época del año en que se colecte el material vegetal. En la etapa de fructificación la acidez de los extractos es menor.

En la tabla VII se observa que los máximos de absorbancia resultaron esencialmente similares en los diferentes extractos, diferenciándose sólo por la intensidad de absorción. Esta observación es invariable independientemente del cambio de analista y de equipo. Como tendencia general se apreció, que los máximos valores de intensidad de absorción se determinaron en el extracto fluido donde se empleó etanol al 70 %. De ello se infiere que los metabolitos que absorben a estas longitudes de onda se extraen en mayor proporción con este solvente. La etapa del año donde mayor intensidad se observó es la fructificación, pues aunque se obtienen valores de absorbancia similares a los de la etapa de floración, la solución medida se preparó a una menor concentración (12 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ para la fructificación y 18 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ para la floración).

Los resultados de la caracterización cuantitativa de los extractos fluidos en las dos etapas consideradas del ciclo de vida de la planta se muestran en la tabla VIII. Se observó que el comportamiento de las variables estudiadas varió de un extracto a otro, posibilitando una comparación de las características particulares de cada formulación. Esta variación fue evidente independientemente de la etapa en que se colectó el material vegetal. Por otro lado, se apreciaron diferencias entre las etapas del ciclo de vida de la planta, resultando superiores las concentraciones de los metabolitos estudiados durante la fructificación.

Para seleccionar el solvente de mayor capacidad de extracción de metabolitos y debido a las diferencias en cuanto a las unidades de medida de cada una de las cinco variables

Tabla VI. Valores de pH determinados a los diferentes extractos fluidos preparados a partir de hojas de *Tamarindus indica* L. en las etapas de floración (noviembre) y fructificación (marzo)

Etapa/Extracto	Extracto Fluido en etanol 60 %	Extracto Fluido en etanol 70 %	Extracto Fluido en etanol 80 %	Extracto Fluido en etanol 90 %
Floración	3,15 ±0,02 ^a	3,04 ±0,01 ^b	2,90 ±0,01 ^c	2,75 ±0,02 ^d
Fructificación	3,84 ± 0,02 ^a	3,85 ± 0,01 ^a	3,65 ±0,01 ^b	3,30 ±0,02 ^c

Letras distintas indican diferencias significativas entre los extractos (ANOVA, Tukey (HSD), p< 0,05).

Tabla VII. Valores máximos y mínimos de absorbancias en la región UV-Visible de los extractos fluidos de hojas de *Tamarindus indica* L. preparados a diferentes concentraciones de etanol. Comparación entre dos analistas y equipos

Extracto Evaluado	Floración		Floración		Fructificación		Fructificación	
	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2	
	λ	A	λ	A	λ	A	λ	A
Extracto Fluido EtOH 60%	202	1,940	202	1,354	203	1,098	202	1,365
	277	0,279	276	0,189	275	0,153	276	0,132
	-	-	-	-	325	0,099	324	0,088
Extracto Fluido EtOH 70 %	203	1,756	202	1,171	202	1,244	202	1,543
	276	0,250	276	0,170	274	0,171	275	0,145
	324	0,139	324	0,095	326	0,100	325	0,098
Extracto Fluido EtOH 80 %	203	1,687	202	0,965	203	1,127	202	1,425
	275	0,256	273	0,149	273	0,162	274	0,138
	326	1,161	324	0,091	327	0,100	326	0,077
Extracto Fluido EtOH 90 %	202	1,229	202	0,756	202	0,912	203	1,057
	275	0,235	273	0,129	272	0,163	275	0,111
	-	-	-	-	323	0,128	325	0,069

Nota: En el período de floración se emplean 18 µL/100 mL, mientras que en fructificación 12 µL/100 mL.

Tabla VIII. Caracterización química de extractos fluidos en etanol 60; 70; 80 y 90 % de hojas de *Tamarindus indica* L. correspondientes a los estados de floración (noviembre) y fructificación (marzo) de la planta

FLORACIÓN					
Extracto	Sólidos Totales (%)	Cenizas Totales (%)	Fenoles (mg/mL)	Flavonoides (mg/mL)	Carbohidratos (mg/mL)
E.F.60%	17,01 ±0,07^a	0,79 ±0,01^a	23,19 ±0,07 ^c	2,031 ±0,11 ^c	40,01 ±0,89^a
E.F.70%	17,05 ±0,05^a	0,55 ±0,02 ^b	25,24 ±0,11^a	2,474 ±0,02 ^b	33,65 ±0,05 ^b
E.F.80%	16,02 ±0,03 ^b	0,51 ±0,02 ^b	24,23 ±0,30 ^b	2,885 ±0,03^a	31,82 ±0,09 ^c
E.F.90%	12,70 ±0,22 ^c	0,23 ±0,02 ^c	17,07 ±0,04 ^d	2,919 ±0,04^a	25,60 ±0,90 ^d
FRUCTIFICACIÓN					
Extracto	Sólidos Totales (%)	Cenizas Totales (%)	Fenoles (mg/mL)	Flavonoides (mg/mL)	Carbohidratos (mg/mL)
E.F. 60%	21,95 ±0,08^a	1,74 ±0,02^a	38,69 ±0,05 ^c	2,424 ±0,01 ^d	64,90 ±1,53^a
E.F. 70%	22,11 ±1,49^a	1,51 ±0,04 ^b	43,71 ±0,07^a	2,768 ±0,01 ^c	57,02 ±2,01 ^b
E.F. 80%	19,67 ±0,05 ^b	1,03 ±0,03 ^c	40,43 ±0,05 ^b	3,525 ±0,02^a	49,07 ±0,62 ^c
E.F. 90%	16,96 ±0,84 ^c	0,73 ±0,01 ^d	27,26 ±0,03 ^d	3,097 ±0,01 ^b	36,38 ±1,63 ^d

Letras distintas indican diferencias significativas entre extractos dentro de una misma etapa del ciclo de vida de la planta. (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$)

consideradas, se realizó un procedimiento de conversión de los datos cuantitativos continuos en datos ordinales, homogeneizando de esta manera los mismos. Además, se decidió realizar una jerarquización de datos con vistas a ponderar el valor ordinal en función de la relevancia o potencialidad farmacológica de la variable medida. Los valores asignados a cada una de las variables cuantitativas consideradas, a partir de los datos reflejados en la tabla VIII, se presentan en la tabla IX.

De la tabla IX se concluye que con la combinación hidroalcohólica al 70% se consiguen los mejores parámetros extractivos, pues la misma adquiere la máxima puntuación en dos de las cinco variables y mantiene valores intermedios en las tres restantes. Esta observación se cumplió en ambas etapas del ciclo de vida de la planta, logrando en las dos un valor total de 32 puntos, equivalente a un 80 % del total de puntos asignados. Los extractos preparados empleando el menstuo etanol al 80 %, se ubicaron en una segunda posición; alcanzando un 75 y 73 % de los puntos en las etapas de floración y fructificación respectivamente. Esta diferencia se acentúa cuando consideramos el resto de las variables no incluidas en el análisis cuantitativo. En ambas etapas del ciclo de vida, el pH del extracto al 70 % fue menos ácido que el del 80%, lo que propiciaría que la formulación a preparar con este solvente causara una menor irritabilidad. En cuanto al comportamiento espectroscópico, con el etanol al 70 % se alcanzaron mayores concentraciones de los metabolitos que absorben en esta región. Ello potencia aún más la conclusión de que bajo las condiciones del estudio, el etanol al 70 % resultó el solvente más efectivo para la extracción de los metabolitos de las hojas de tamarindo.

Tomando en consideración estas observaciones, el etanol al 70 % fue seleccionado como el menstuo con mayor capacidad extractiva, y se propone su utilización en la elaboración de una formulación con fines farmacéuticos.

III.2.2 Evaluación de la influencia de la concentración de etanol y tiempo de humectación en el proceso extractivo

En la tabla X se muestra la matriz experimental y los valores de las variables respuesta en el diseño de experimentos, del tipo compuesto central 2^3 más principal, propuesto para la evaluación de la influencia de la concentración de etanol y el tiempo de humectación en el proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L. Las diferentes combinaciones de las variables independientes genera variación en las variables respuesta, demostrando su influencia sobre las mismas.

Tabla IX. Valores asignados por escala ordinal jerarquizada a las cinco variables consideradas en la selección del solvente con mayor capacidad de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Extracto	FLORACIÓN						FRUCTIFICACIÓN					
	TA	TC	ST	TP	TF	Total 40	TA	TC	ST	TP	TF	Total 40
E.F. 60 %	4	4	8	6	3	25 (63 %)	4	4	8	6	3	25 (63 %)
E.F. 70 %	3	3	8	12	6	32 (80 %)	3	3	8	12	6	32 (80 %)
E.F. 80 %	3	2	4	9	12	30 (75 %)	2	2	4	9	12	29 (73 %)
E.F. 90 %	1	1	2	3	12	19 (48 %)	1	1	2	3	9	16 (40 %)
TA Cenizas Totales			TC Carbohidratos Totales			ST Sólidos Totales			TP Fenoles Totales			
TF Flavonoides Totales			E.F. Extracto Fluido									

Tabla X. Matriz experimental y valores de las variables respuestas (variables dependientes) en el diseño de experimentos del tipo compuesto central 2^3 más principal, propuesto para la evaluación de la influencia de las variables independientes en el proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Variables Independientes			Variables dependientes				
Exp.	X ₁ (%)	X ₂ (min)	TP (mg/mL)	TF (mg/mL)	ST (%)	TA (%)	TC (mg/mL)
1	70,00	60,00	25,24	2,474	17,05	0,55	43,80
2	84,14	60,00	19,32	2,919	12,70	0,23	18,25
3	70,00	102,43	26,07	2,533	19,27	0,55	49,48
4	60,00	90,00	23,88	2,256	18,87	0,75	52,54
5	70,00	17,57	17,56	1,627	12,34	0,21	30,15
6	55,86	60,00	23,19	1,656	16,89	0,81	67,32
7	80,00	90,00	24,47	3,001	16,81	0,48	22,69
8	80,00	30,00	21,63	2,221	13,33	0,18	19,03
9	70,00	60,00	25,86	2,378	16,78	0,51	44,10
10	60,00	30,00	21,05	1,876	14,29	0,38	44,14
Exp. → Experimento			X ₁ → Concentración de Etanol		X ₂ → Tiempo de Humectación		
TP → Fenoles Totales			TF → Flavonoides Totales		ST → Sólidos Totales		
TA → Cenizas Totales			TC → Carbohidratos Totales				

El uso del programa estadístico STATGRAPHICS Plus reveló que las variables respuestas (VR) tienen una dependencia cuadrática con las variables independientes (X_1 y X_2), dada por el siguiente polinomio

$$VR = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_1^2 + a_4X_2^2 + a_5X_1X_2$$

ecuación 4

donde a_n ($n = 0, \dots, 5$) son los coeficientes del polinomio, cuyos valores se muestran en la tabla XI para cada variable respuesta. Se presentan también, los estadígrafos r^2 (%), los p-valores de Durbin-Watson y el Test de falta de ajuste.

En la tabla XI se evidencia un predominio de la influencia de los términos constantes y lineales, siendo más evidente para la variable X_1 . Este resultado confirma que la concentración de etanol ejerce la mayor influencia en el proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L. Ello se corresponde con observaciones previas, y fundamenta la decisión de realizar en una primera instancia la evaluación de la influencia de la variable concentración de etanol sobre el proceso de extracción.

Según los estadígrafos seleccionados, todos los modelos explican un elevado porcentaje de la varianza del fenómeno extractivo, por lo que bajo este criterio todas las ecuaciones pueden ser aceptadas. Los valores del coeficiente de determinación (r^2) varían desde un 81,43 % para los sólidos totales hasta un 95,15 % para las cenizas totales.

El estadígrafo de Durbin-Watson permite conocer si existe correlación entre los residuales. Cuando el p-valor es superior a 0,05, no hay indicios de correlación de serie en los residuos, como ocurre en los modelos obtenidos para cada variable respuesta. Bajo esta premisa, se puede afirmar que todas las ecuaciones obtenidas describen el proceso extractivo de metabolitos presentes en las hojas de tamarindo en las condiciones experimentales desarrolladas. Por último, la prueba de falta de ajuste permite determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados. Cuando el p-valor es superior a 0,05, se interpreta como que el modelo parece ser adecuado para describir los datos observados al 95 % de confianza.

A juzgar por los resultados presentados en la tabla XI, el modelo obtenido para la variable respuesta carbohidratos totales (TC) no cumple con este requisito y por tanto debe ser rechazado. Este hecho puede estar relacionado con la alta variabilidad observada durante los experimentos y a su vez, a la cercanía de los valores de las dos determinaciones realizadas a los compuestos centrales (experimentos 1 y 9).

Tabla XI. Coeficientes del polinomio y estadígrafos obtenidos con el programa estadístico STATGRAPHICS Plus para cada una de las variables respuestas en el proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

<i>Factor/Variable</i>	<i>TP</i>	<i>TF</i>	<i>ST</i>	<i>TA</i>	<i>TC</i>
Constante	-71,59200	-1,3357	-1,2237	0,54805	0,7323
X ₁	2,52484	0,0587	1,2937	-0,00474	1,8431
X ₂	0,28139	0,0047	0,14090	0,01896	0,9396
X ₁ ²	-0,018422	- 0,0003	-0,0099	-0,00006	-0,0225
X ₁ *X ₂	0,00001	0,0003	-0,0001	-0,00006	-0,0039
X ₂ ²	-0,00174	-0,0002	-0,0005	-0,00008	-0,0041
<i>r</i> ² (%)	81,4299	94,3109	94,049	95,1532	93,8124
Durbin-Watson p-valor	0,4533	0,4028	0,3984	0,0824	0,2443
Test falta de ajuste p-valor	0,1481	0,2497	0,1374	0,2457	0,0221
X ₁ → Etanol (%)	X ₂ → Tiempo de Humectación	TP→ Fenoles Totales	TF→ Flavonoides Totales		
ST→ Sólidos Totales	TA→ Cenizas Totales		TC→ Carbohidratos Totales		

Los gráficos de superficie respuesta constituyen una vía sencilla de interpretar los modelos obtenidos. Las figuras 1, 2, 3 y 4 representan los gráficos de superficie respuesta para las variables fenoles, flavonoides, sólidos y cenizas totales, respectivamente. No se considera la variable carbohidratos totales, pues según lo expuesto anteriormente, el modelo que la describe no cumple con las exigencias estadísticas para su aceptación.

La figura 1 sugiere que la región donde se obtiene una mayor concentración de fenoles totales es próxima a una concentración etanólica del 70 % y de un tiempo de humectación de 81 minutos, como se muestra en la tabla XII. Un comportamiento similar a éste se observó para la variable sólidos totales (Figura 3, Tabla XII), pero con valores de concentración alcohólica ligeramente más bajos (65 %) y tiempo de humectación superiores (102 minutos).

Para la variable flavonoides totales, el programa refiere el máximo de extracción fuera del intervalo definido en el experimento: 84 % de concentración de etanol y 102 minutos de tiempo de humectación, (Tabla XII, Figura 2). En toda la región espacial comprendida en el experimento no aparece ningún punto de inflexión apreciable, sugiriendo que para esta variable, pudiera ser necesario un estudio en los que se considere un intervalo que comprenda una mayor variación de los parámetros independientes.

A diferencia de las figuras 1-3, en la figura 4 se observó que un incremento de la concentración alcohólica trae aparejado una rápida disminución del porcentaje de cenizas totales extraídas, en correspondencia con el valor negativo del coeficiente que modifica esta variable (Tabla XI). Para el parámetro tiempo de humectación, la inflexión de los valores de la variable dependiente cenizas totales se logra en un valor cercano a los 93 minutos.

Para obtener una visión general del proceso extractivo que se evalúa, se estimó la función de conveniencia, que no es más que la opción de respuesta múltiple implementada en el programa estadístico empleado. Esta función expresa el compromiso entre los parámetros (variables independientes) del modelo, de forma tal que maximice los valores de las variables respuestas; asume valores entre 0 y 1, donde 1 corresponde a la maximización total de todas las variables respuestas.

El valor de la función de conveniencia estimada de 0,8377 se obtuvo cuando en el proceso extractivo se combinan una concentración de etanol de 71,73 % con un tiempo de humectación de 92,37 min (Figura 5).

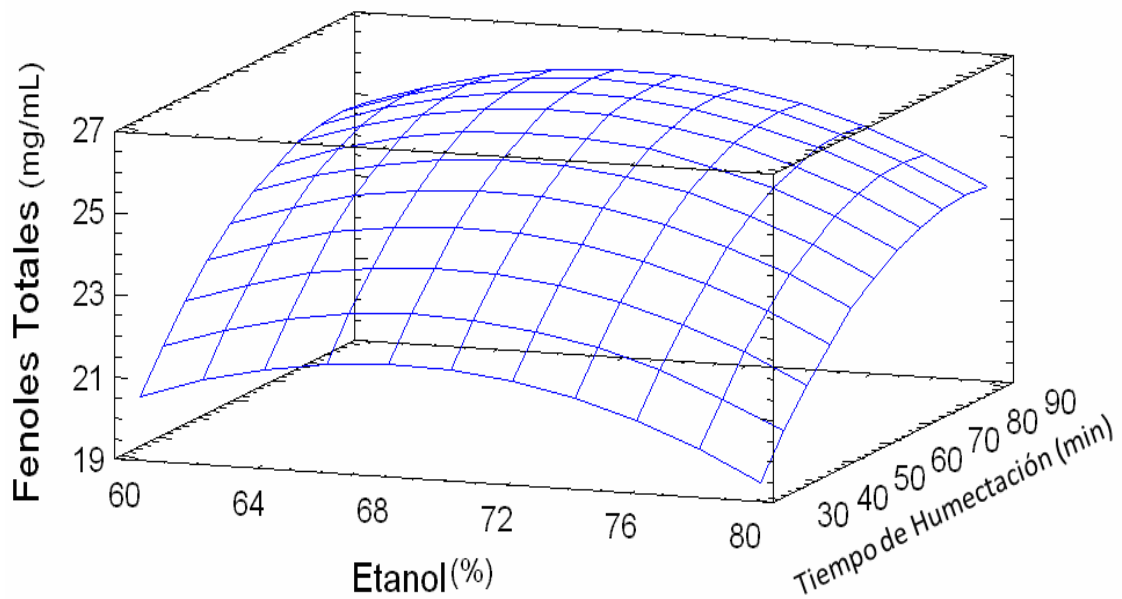


Figura 1. Gráfico de Superficie-Respuesta estimada para la variable fenoles totales en el diseño de experimentos compuesto central 2^3 más principal, en la optimización del proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

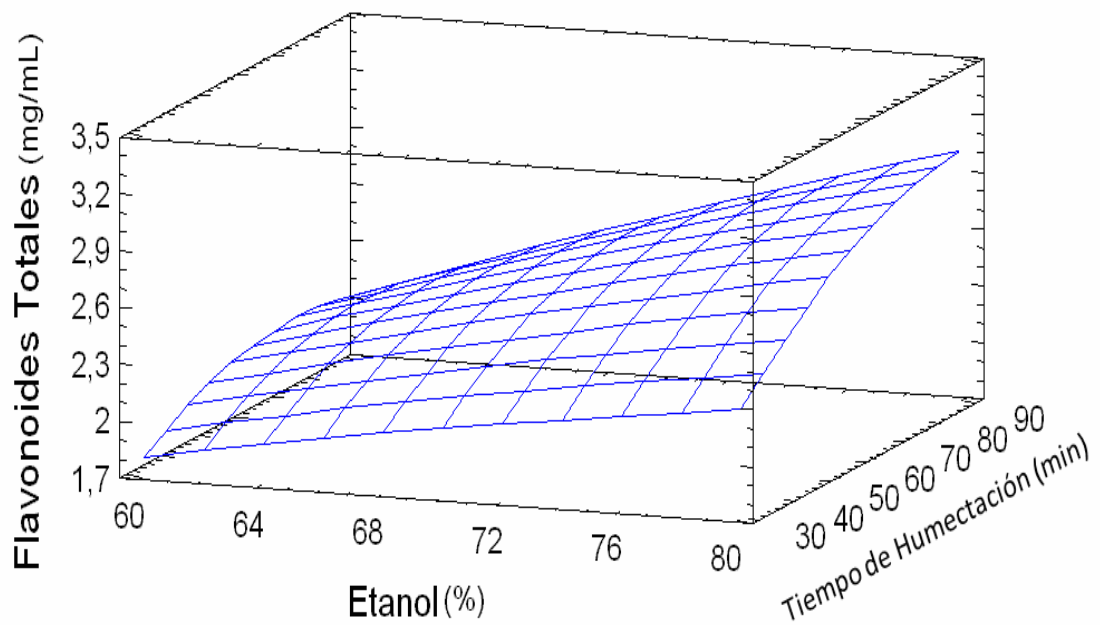


Figura 2 Gráfico de Superficie-Respuesta estimada para la variable flavonoides totales en el diseño de experimentos compuesto central 2^3 más principal, en la optimización del proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

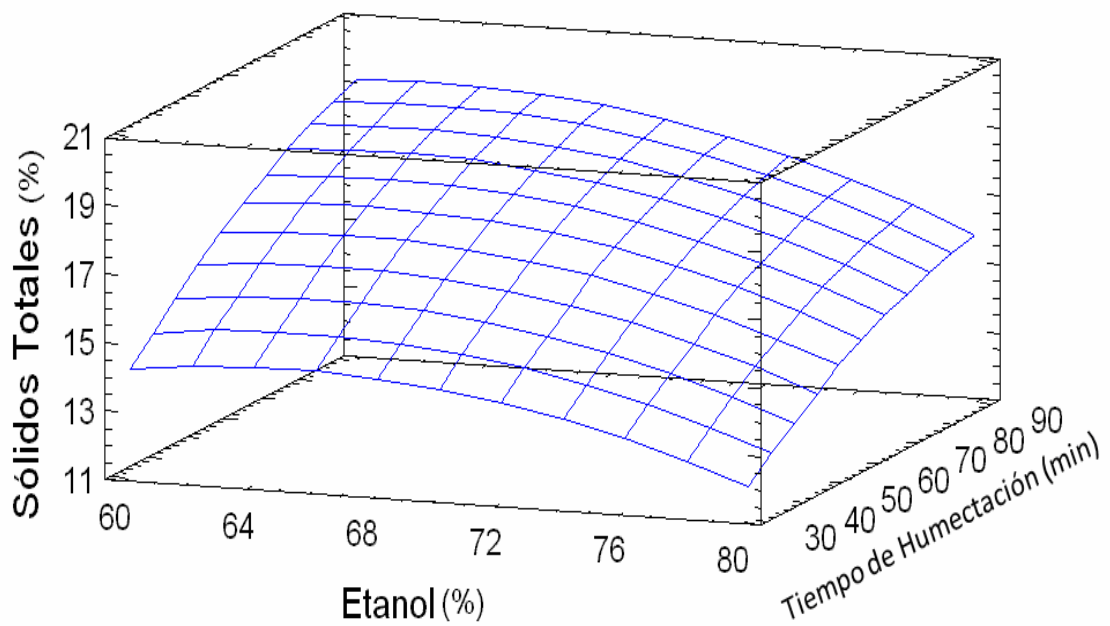


Figura 3 Gráfico de Superficie-Respuesta estimada para la variable sólidos totales en el diseño de experimentos compuesto central 2^3 más principal, en la optimización del proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

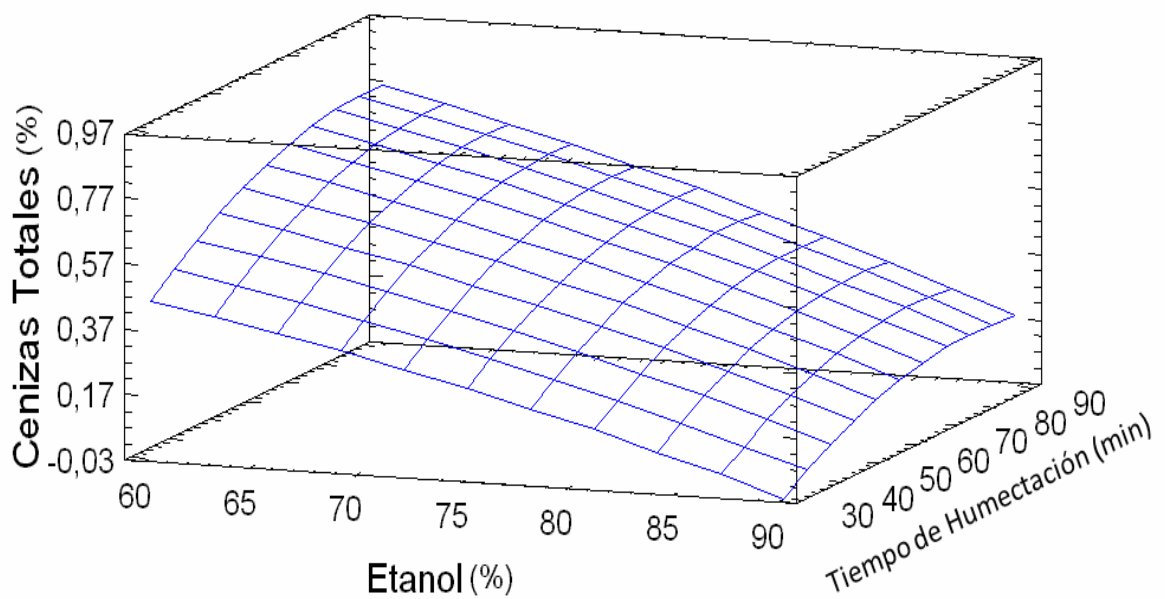


Figura 4 Gráfico de Superficie-Respuesta estimada para la variable cenizas totales en el diseño de experimentos compuesto central 2^3 más principal, en la optimización del proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Tabla XII. Combinación de factores a los cuales se obtienen valores máximos para las variables dependientes consideradas en el proceso de extracción de metabolitos de hojas de *Tamarindus indica* L.

<i>Factor/Variable</i>	Fenoles	Flavonoides	Sólidos Totales	Cenizas Totales
Concentración de etanol (%)	68,54	84,14	64,81	55,86
Tiempo de Humectación (min)	81,26	102,43	102,43	93,44
Valor máximo predicho	26,373	3,236	19,19	0,841

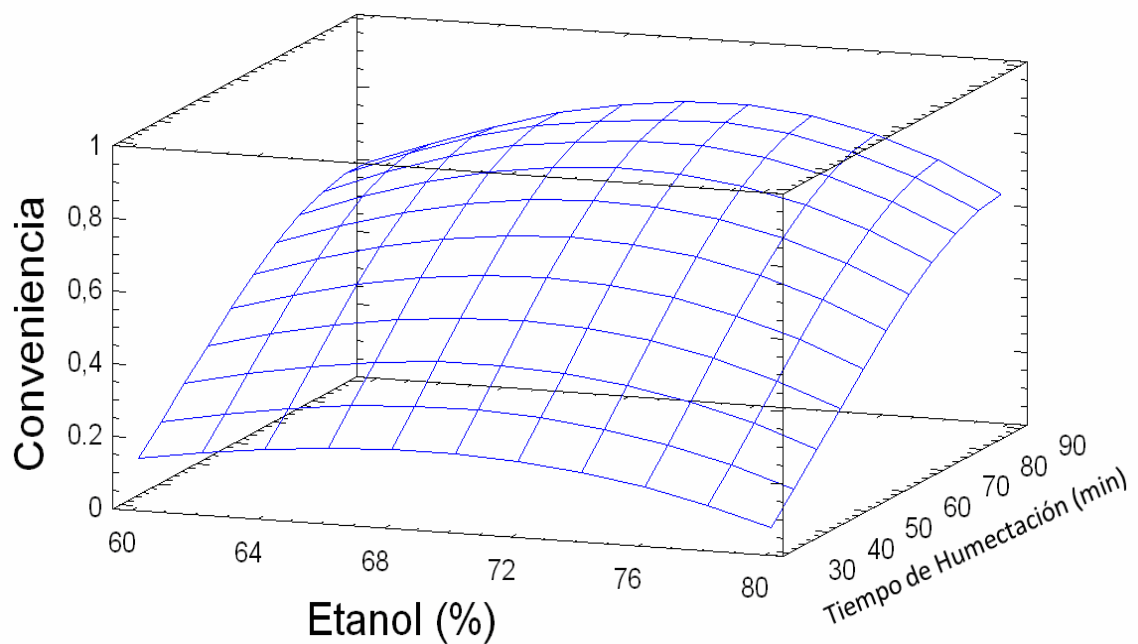


Figura 5 Gráfico de Superficie-Respuesta estimada para la función de conveniencia en el diseño de experimentos compuesto central 2^3 más principal, en la optimización del proceso de extracción de metabolitos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Los valores predichos por esta función de conveniencia bajo las condiciones anteriormente descritas para cada una de las variables respuesta analizadas fueron: 25,97 mg/mL y 2,68 mg/mL para las variables fenoles y flavonoides totales; así como 18,42 % y 0,57 % de sólidos y cenizas totales, respectivamente. Si se comparan estos valores con los máximos determinados experimentalmente para cada variable (Tabla X), se observa que todos se encuentran cercanos al máximo, con la excepción de la variable cenizas totales, cuyo valor máximo determinado experimentalmente fue de 0,81 %. Este hecho es una expresión de la jerarquización realizada, donde el modelo está condicionado a tratar las cenizas totales como la variable respuesta de menor nivel jerárquico y por tanto, la que deberá ejercer menor influencia sobre el resultado de la función de conveniencia.

Para evaluar la capacidad de predicción del modelo de conveniencia, se realizaron cinco experimentos donde se fijaron las condiciones establecidas por el modelo (etanol al 72 % y 92 min de tiempo de humectación). A los extractos obtenidos bajo estas condiciones se le determinó cada una de las variables respuesta consideradas en el diseño experimental. La media y desviación estándar correspondientes a cada variable respuesta, se muestran en la tabla XIII, conjuntamente con los valores predichos por la función conveniencia y los errores absolutos. El error absoluto fue calculado mediante la expresión:

$$e_r = [(E - O)/O] * 100$$

ecuación 5

donde e_r , E y O son el error absoluto, el valor predicho por la función conveniencia y el valor medio observado, respectivamente.

Se encontró que para las variables fenoles totales, sólidos totales y cenizas totales los valores observados son estadísticamente similares a los predichos por la función conveniencia para el nivel de significación $\alpha = 0,05$. Esto es consistente con los errores absolutos asociados a cada una de estas variables ($\leq 1,4$ %). Sin embargo, esto no se cumple para la variable flavonoides totales que adquiere su máxima expresión cuando se consideran valores extremos de 84,14% de concentración alcohólica y de 102,43 minutos de tiempo de humectación (Figura 2, Tabla XII). Este comportamiento se corresponde con el alto error absoluto calculado (11 %), sugiriendo que: en el caso de la respuesta de flavonoides totales se requiere explorar una región más amplia del intervalo de variación de los parámetros estudiados para encontrar su máxima expresión.

Tabla XIII. Valores predichos por la función conveniencia y observados experimentalmente (n = 5) al fijar las condiciones de optimización del proceso de extracción de metabolitos en hojas de *Tamarindus indica* L.

Parámetro	Variables Dependientes			
	Fenoles (mg/mL)	Flavonoides (mg/mL)	Sólidos T. (%)	Cenizas T. (%)
Valor Predicho	25,972	2,678	18,417	0,566
Valor Observado	25,687	2,409*	18,158	0,574
(desviación estándar)	(± 0,337)	(± 0,141)	(± 0,926)	(± 0,034)
Error absoluto (%)	1,1	11,2	1,4	1,4

* Diferencias significativas entre el valor predicho por la función conveniencia y el observado (t de Student, $p < 0,05$).

La buena correspondencia entre los valores predichos por la función de conveniencia y los observados experimentalmente indican, en una buena aproximación, que los parámetros concentración de etanol y tiempo de humectación tienen una contribución importante, principalmente el primero, al proceso de extracción de los metabolitos activos de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Un estudio futuro en el que se consideren otras regiones de exploración y parámetros que puedan tener influencia en el proceso extractivo aportaría nuevos elementos al problema abordado. Para esto, se pueden proponer diseños factoriales de k^3 (k es el número de parámetros) o el método probabilístico de Monte Carlo. Este último, permite obtener el máximo absoluto de todos los máximos relativos que se encuentren en la región de variación de los parámetros que tengan significación desde el punto de vista práctico.

III.3 Formulación y caracterización del extracto fluido en etanol al 70 %

III.3.1 Formulación de los extractos fluidos. Características organolépticas

El extracto fluido formulado a partir de las hojas de tamarindo en etanol al 70% es de color verde-marrón intenso, ligeramente denso y untuoso al tacto. Su olor es el característico de las hojas de la planta y su sabor ligeramente amargo, ácido y astringente. A pesar de que las propiedades declaradas se mantienen invariables en los extractos preparados en las diferentes etapas del ciclo de vida de la planta, es posible observar diferencias entre ellos. La intensidad del color varía de una etapa a otra, siendo más oscuro, hacia el negro, en los meses correspondientes a la fructificación y más verdes, en los meses correspondientes al estado vegetativo de la planta. Este comportamiento puede estar condicionado al hecho que después del período de fructificación, el árbol del tamarindo sufre un proceso importante de defoliación. Las hojas comienzan a ser regeneradas inmediatamente después, o sea en el período vegetativo. En esta etapa abundan las hojas frescas, tiernas, y ricas en clorofila, transmitiéndole ese color a los extractos formulados.

III.3.2 Caracterización físico-química del extracto fluido en etanol al 70 %

Casi todos los parámetros físico-químicos evaluados en los extractos difieren estadísticamente en las diferentes épocas del ciclo de vida de la planta e incluso de un año al otro (Tabla XIV). Ello corrobora la decisión inicial de considerar diversos estadios de vida de la planta para realizar una caracterización físico-química más objetiva, tomando en cuenta las variaciones fisiológicas, climatológicas y del ecosistema que pudieran influir en

Tabla XIV. Caracterización físico-química del extracto fluido en etanol al 70 % de hojas de *Tamarindus indica* L. colectadas en las diferentes etapas del ciclo de vida de la planta.

Parámetro	Período 2007-2008			Período 2008-2009		
	E.Vegetativo	Floración	Fructificación	E.Vegetativo	Floración	Fructificación
pH	3,01 ±0,01 ^c	3,04 ±0,01 ^b	3,85 ±0,01^a	3,76 ±0,01 ^b	3,88 ±0,02^a	3,53 ±0,02 ^c
Densidad	0,912 ±0,01 ^b	0,927 ±0,02^a	0,932 ±0,01^a	0,926 ±0,01^a	0,899 ±0,003 ^b	0,907 ±0,001 ^b
Índice de Refracción	1,393±0,001 ^b	1,394±0,001 ^b	1,397 ±0,001^a	1,394±0,001 ^b	1,390±0,001 ^c	1,399 ±0,001^a
Sólidos Totales	18,85 ±0,65 ^b	17,05 ±0,05 ^b	22,11 ±1,49^a	14,01 ±0,15 ^b	15,63 ±0,34^a	12,58 ±0,33 ^c
Cenizas Totales	0,83 ±0,11 ^b	0,55 ±0,02 ^c	1,51 ±0,04^a	0,44 ±0,02 ^b	0,35 ±0,04 ^b	1,06 ±0,14^a

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes etapas del ciclo de vida de la planta en un mismo período (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$)

su producción metabólica. Los parámetros con mayor coeficiente de variación fueron las cenizas y los sólidos totales con un 55,6 y 20,6% respectivamente, mientras que la variable de menor coeficiente de variación fue el índice de refracción con un 0,22 %. Los valores de pH confirman la sensación de acidez detectada en el estudio organoléptico, aún cuando los mismos resultan no irritantes para la mucosa oral y gástrica, según resultados obtenidos en los ensayos toxicológicos de Irritabilidad aguda de la mucosa oral e Irritabilidad aguda de la mucosa gástrica (Anexos II y III).

A pesar de que en el período 2008-2009 se observó cierta dispersión en las variables, la etapa de fructificación al parecer, es la más indicada para lograr los mejores parámetros físico-químicos en los extractos fluidos de hojas de tamarindo.

III.3.3 Caracterización química del extracto fluido en etanol al 70 %

Con el objetivo de ofrecer un ensayo químico fiable para el control de la calidad de la formulación propuesta, se realizó la validación del método de cuantificación de fenoles totales en el extracto fluido de etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L., con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Anexo IV).

En la tabla XV, se muestran las concentraciones de las variables químicas Fenoles, Flavonoides y Carbohidratos totales en los extractos fluidos preparados. Al igual que en los parámetros físico-químicos, existe una gran variabilidad entre los diferentes estados del ciclo de vida de la planta, y de un año a otro. Los coeficientes de variación fueron altos y oscilaron entre 50,9 y 23,2% para los fenoles y flavonoides totales, respectivamente. No obstante, estos parámetros químicos apuntan a que el período de fructificación parece ser la mejor etapa de recolección para preparar un fitofármaco con elevadas concentraciones de estos metabolitos.

La caracterización química del extracto fluido incluyó además, un análisis de los elementos inorgánicos presentes en los extractos en dos etapas diferentes del ciclo de vida de la planta. Los resultados obtenidos para esta variable comparados con los determinados en las hojas se muestran en la tabla XVI.

Se observó que a excepción del hierro, manganeso, y níquel, para el resto de los metales las concentraciones determinadas en el período de fructificación fueron mayores que en el de floración. Se destacan en particular los incrementos alcanzados en el selenio, cobre y cinc de una etapa a la otra. El selenio es un constituyente fundamental de múltiples enzimas¹⁷⁵, las que superan el número de 30; varias de las cuales se encuentran

Tabla XV. Caracterización química del extracto fluido en etanol al 70 % de hojas secas de *Tamarindus indica* L. en las diferentes etapas del ciclo de vida de la planta

Variable (mg/mL)	Período 2007-2008			Período 2008-2009		
	E.Vegetativo	Floración	Fructificación	E.Vegetativo	Floración	Fructificación
Fenoles Totales	15,29 ±0,06 ^c	22,46 ±0,07 ^b	43,77 ±0,07^a	11,75 ±0,24 ^c	25,28 ±0,08 ^b	34,75 ±0,05^a
Flavonoides Totales	1,727 ±0,04 ^c	2,474 ±0,02 ^b	2,768 ±0,01^a	1,426 ±0,01 ^c	2,422 ±0,01^a	2,189 ±0,03 ^b
Carbohidratos Totales	23,88 ±1,25 ^c	31,40 ±0,09 ^b	57,02 ±2,01^a	17,97 ±0,96 ^c	40,35 ±0,88 ^b	42,83 ±1,03^a

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes etapas del ciclo de vida de la planta en un mismo período (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$)

Tabla XVI. Concentración de los diferentes elementos inorgánicos en el extracto fluido al 70 % de hojas de *Tamarindus indica* L. en dos etapas de su ciclo de vida

Etapa	Elementos metálicos (µg/g de droga)											
	Cu	Fe	Se	Zn	Co	Ni	Mn	Cr	V	Mo	Pb	Cd
Extracto Fluido Floración	0,857	1,107	0,991	0,292	0,108	0,052	0,75	0,079	-	-	0,05	0,013
Extracto Fluido Fructificación	1,173	0,726	1,65	1,875	0,139	-	0,229	0,144	0,03	-	0,15	0,026
Hojas Fructificación	7,90	16,6	3,07	7,99	0,88	0,461	2,51	0,25	0,33	0,26	0,703	0,19

(-) → no detectado

Los resultados se comparan con el contenido determinado en las hojas.

involucradas en el balance REDOX del organismo y en el metabolismo de la hormona tiroidea¹⁷⁶. Ha sido establecida una cantidad óptima de 55 µg de selenio por día, con un amplio margen terapéutico que puede llegar hasta los 400 µg¹⁷⁷. Estudios clínicos han incluido cantidades variables de selenio en formulaciones antioxidantes con resultados terapéuticos esperanzadores^{178,179,180}. También ha sido evaluada la influencia del selenio en las enfermedades hepáticas, demostrando que existe una carencia de este elemento en las cirrosis alcohólicas, las no alcohólicas y en las virales¹⁸¹, y que su suministro acelera la remisión del paciente. Adicionalmente, se ha referido la importancia de su empleo en las necrosis hepáticas¹⁸².

El cobre es otro microelemento que aparece en concentraciones apreciables en el extracto fluido al 70% de *Tamarindus indica* L. Este elemento ha sido descrito como prooxidante, participando al igual que el hierro en la reducción del peróxido de hidrógeno para formar el radical hidroxilo^{183,184}. Sin embargo, el cobre es un cofactor de varias enzimas involucradas en el balance REDOX del organismo, entre ellas la superóxido dismutasa cobre y cobre-zinc dependientes, la ceruloplasmina, la citocromo oxidasa y la monoaminoxidasa. Su presencia/ausencia es importante en las enfermedades hepáticas, no sólo por su incorporación en la ceruloplasmina y excreción en la bilis, sino también porque se ha demostrado que la administración de pequeñas cantidades de cobre en animales de experimentación disminuye la formación de hepatomas en modelos inducidos. Se ha encontrado, además, que en su unión con el tripéptido Glicil-Histidil-Lisina puede regular el crecimiento y adhesividad de las células hepáticas normales¹⁸⁵. Adicionalmente, el cobre resulta importante dada su reconocida actividad antimicrobiana frente a microorganismos, especialmente en bacterias; aunque también es muy activo frente a hongos. Sus niveles de toxicidad para el humano son elevados (600 mg/kg de peso). Ello ha propiciado que se desarrollen medicamentos que incluyan este metal en su estructura, como algunos fármacos antimicrobianos y anti-inflamatorios.¹⁸⁶

El cinc por su parte, mucho menos tóxico que el cobre, es cofactor de más de 300 enzimas, siendo un elemento indispensable en todas las formas de vida. De hecho, es el único elemento metálico para el que se conocen enzimas en cada una de las seis categorías en que éstas se clasifican. El cinc desempeña un papel esencial en la división celular, estando asociado su déficit a problemas en el crecimiento y desarrollo de los humanos. Su acción antimicrobiana, la cual ha sido descrita más de un mecanismo de acción, ha sido extensamente abordada^{187,188}. En virtud de esta actividad, múltiples fármacos

antimicrobianos han sido ligados en forma de sal o complejos a este elemento con vistas a potenciar su acción^{189,190} siendo utilizado además en filtros de agua comerciales¹⁹¹.

Otros microelementos de interés en el balance REDOX del organismo y que han sido determinados en el presente trabajo fueron el manganeso y el níquel, aún cuando este último sólo se detectó en una etapa del ciclo de vida de la planta. El níquel se ha referido como hepatoprotector, al incrementar la acción de la superoxido dismutasa eritrocítica Cu-Zn dependiente¹⁹².

Por otro lado, elementos de relevancia toxicológica, como el plomo y el cadmio se encuentran en valores inferiores a los límites toxicológicos establecidos para el ser humano (500 mg/día y 250 µg/día respectivamente)¹¹⁰.

Paralelamente a la caracterización físico-química y química de los extractos, se realizó un estudio de dinámica de acumulación con una frecuencia mensual. La tendencia de la acumulación de los metabolitos considerados, se representa en la figura 6. Los meses de febrero y marzo (fructificación) mostraron incrementos en los valores de la mayoría de las variables estudiadas, mientras que en los meses de Junio y Agosto (ciclo vegetativo) se detectó una baja producción metabólica. Incrementos discretos en la producción metabólica media fueron observados en los meses de Octubre-Noviembre.

La acumulación metabólica concentrada en los meses donde la fruta está en crecimiento y desarrollo, puede estar relacionada con las necesidades energéticas de la planta. En los árboles frutales, la fruta se convierte en un almacén de glúcidos y otros requerimientos nutricionales que aportarán a la semilla los recursos necesarios para una germinación exitosa, garantizando así la reproducción de la especie. Para que esto ocurra, la biofábrica metabólica de las plantas (las hojas) deberá incrementar su proceso fotosintético en función de la producción de glucosa como primer eslabón de materia orgánica, y posteriormente otros carbohidratos, proteínas y sustancias del metabolismo primario.

Esta acumulación metabólica primaria aumenta el peligro de ataque de depredadores heterótrofos, obligando a la planta a potenciar también su metabolismo secundario hacia la producción de compuestos con actividad fitoalexínica que le permitan protegerse de ese entorno agresivo. En este sentido, los compuestos fenólicos, los flavonoides y los mineralocomplejos, son entre otras, las sustancias repelentes y antimicrobianas por excelencia; ello explicaría el incremento en su producción por la planta durante la fructificación. De manera general, tanto las variables físico-químicas como las químicas señalan el período de fructificación como el de mayor producción de metabolitos.

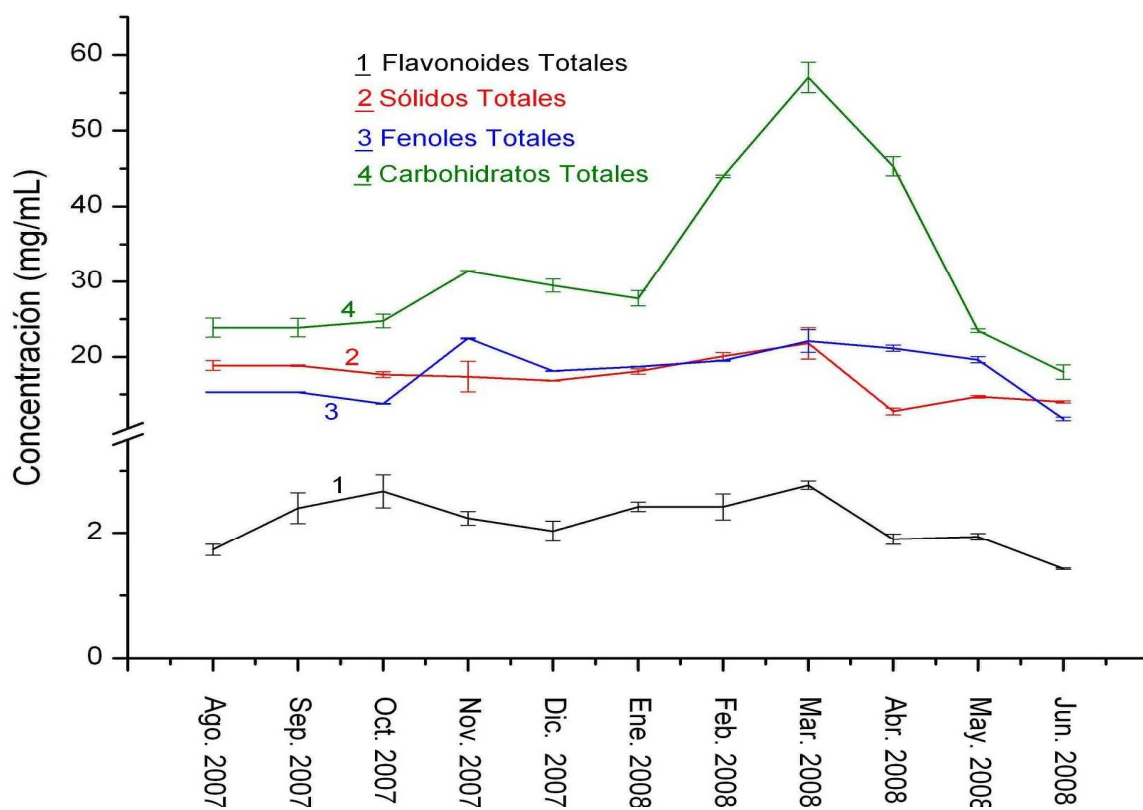


Figura 6. Dinámica de acumulación de metabolitos en el extracto fluido en etanol al 70 % de hojas de *Tamarindus indica* L., colectadas en el período comprendido entre agosto del 2007 y junio del 2008.

III.3.4 Fraccionamiento químico del extracto fluido en etanol al 70%. Caracterización espectroscópica

Como parte de la necesidad de una caracterización química más profunda, el extracto fluido en etanol al 70% fue fraccionado por separación líquido-líquido, empleando cuatro solventes de polaridad creciente. La fracción de n-hexano presentó un color verde oscuro y su rendimiento de extracción fue de 12,35% del residuo seco total. Su análisis por CG/EM rindió un total de seis picos identificados (Tabla XVII). Por su parte, la fracción clorofórmica presentó un color verde-carmelita y un rendimiento de extracción del 32,75% del residuo seco total. El análisis por CG/EM reveló la presencia de siete compuestos mayoritarios identificados (Tabla XVII).

Los compuestos identificados en la fracción de n-hexano fueron, a excepción del 3-eicosino y la farnesilcetona, ácidos grasos en su estado libre o esterificados, como comúnmente se les encuentran dentro del reino vegetal. Los poliacetilenos (3-eicosino) son compuestos de reconocida actividad antimicrobiana y citotóxica¹⁹³, mientras que los compuestos volátiles (farnesilcetona) son también metabolitos muy relacionados con la actividad antioxidante y antimicrobiana¹⁹⁴.

Desafortunadamente para la actividad farmacológica, la farnesilcetona es el único de los compuestos volátiles identificados anteriormente en la planta que logra ser extraído en esta fracción; ya que como se describió en el acápite III.1.1, la actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites volátiles suele ser mayor cuando actúan de modo sinérgico¹⁹⁵. Dos factores influyen directamente en este hecho: el primero radica en que se trabaja con la droga secada al sol, y al ser estos compuestos de naturaleza volátil, los mismos pueden perderse en el proceso de secado; el segundo factor es relativo al solvente, los aceites volátiles son solubles en solventes apolares y el etanol es un solvente de mediana polaridad. No obstante, las condiciones empleadas en la investigación cumplen un esquema lógico de relación beneficio/riesgo.

En la fracción clorofórmica fueron identificados siete compuestos. Los primeros tres son ácidos orgánicos de cadena corta. Tanto el ácido málico como el tartárico son componentes que han sido informados con anterioridad en las hojas de tamarindo. El ácido tartárico es el principal responsable del sabor ácido en hojas y frutos de tamarindo. Este es un ácido inusualmente distribuido en el reino vegetal, pues es biosintetizado a partir de los carbohidratos producidos en la fotosíntesis, y una vez sintetizado no puede ser reutilizado,

Tabla XVII. Caracterización química por CG/EM de las fracciones de n-hexano y cloroformo resultantes del fraccionamiento líquido-líquido del extracto fluido en etanol al 70 % de las hojas de *Tamarindus indica* L.

Fracción de n-hexano					
Pico	Compuesto Identificado	FM	MM	IR	%
1	Farnesilcetona	C ₁₈ H ₃₀ O	262	1916	9,70
2	Ácido Hexadecanoico (ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	1968	20,99
3	3-eicosino	C ₂₀ H ₃₈	278	1989	21,99
4	Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico(C _{18:3})	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	2091	13,57
5	Éster metílico del ácido 7,10- octadecadienoico (C _{18:2})	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294	2150	16,13
6	Ácido 10-octadecenoico o Ácido Oleico (C _{18:1})	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	2169	12,74
Fracción de Cloroformo					
Pico	Compuesto Identificado	FM	MM	IR	%
1	Ácido Málico	C ₄ H ₆ O ₅	134	944	15,95
2	Ácido Tartárico	C ₄ H ₆ O ₆	150	1262	21,96
3	Ácido Ftálico (Acido 1,2 di-carboxil benceno)	C ₈ H ₆ O ₄	166	1643	9,45
4	Metil 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzoato	C ₁₆ H ₂₄ O ₃	264	1872	11,06
5	Ácido Hexadecanoico (ácido palmítico)	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	1968	18,39
6	Ácido 10-octadecenoico o Ácido Oleico (C _{18:1})	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282	2169	7,77
7	Ácido n-Nonadecanoico	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298	2236	7,57
FM→ Fórmula Molecular		MM→ Masa Molecular		IR→ Índice de retención	

por la ausencia en la planta de las enzimas necesarias para ello. El ácido tartárico es producido en las hojas y su destino final es el fruto¹⁹⁶. El ácido ftálico también es un ácido con muy pobre distribución en las plantas. Nunca ha sido descrita su presencia en el tamarindo.

El cuarto compuesto es un fenol; mientras que el resto de los metabolitos identificados son ácidos grasos, dos de ellos (ácido palmítico y ácido oleico) aislados con anterioridad en la fracción de n-hexano. A pesar de que estas dos fracciones aparentemente extraen el mismo tipo de metabolitos, resulta evidente que en la fracción de n-hexano quedan retenidos aquellos compuestos más apolares como los poliacetilenos, aceites volátiles, y ácidos grasos esterificados; mientras que en la fracción clorofórmica se extraen los más polares como los fenoles y los ácidos grasos libres y ácidos orgánicos de cadena corta.

Cinco ácidos grasos fueron determinados en el extracto fluido en etanol al 70 %, comprendiendo las categorías ácido libre/esterificado y saturado/insaturado. Los ácidos grasos han sido ampliamente descritos en la literatura por su actividad antioxidante^{197,198}. De manera específica, los ácidos palmítico (C_{16:0})¹⁹⁹, oleico²⁰⁰ (C_{18:1}) y linoleico (C_{18:2})²⁰¹ presentan un mayor número de informes. La actividad antioxidante de estos compuestos se atribuye con mayor frecuencia a los ácidos grasos libres que a los conjugados o esterificados. Esto obedece al hecho de que el grupo carboxilo resulta indispensable para esta actividad. La participación del grupo carboxilo en la actividad antioxidante al parecer es lógica, pues éste es el único grupo funcional que podría estabilizar la pérdida de un electrón al ser atacado por ERO, aunque existen referencias que plantean que tanto los ácidos grasos libres como los esterificados presentan una buena actividad antioxidante²⁰².

Por otra parte, la actividad antioxidante/pro-oxidante de los ácidos grasos insaturados/saturados resulta aún más controversial. Se conoce que una de las primeras dianas de los ERO son los ácidos grasos insaturados de la membrana, los cuales una vez atacados inician una serie de reacciones en cadena, debido fundamentalmente a su incapacidad química de estabilizar la pérdida de un electrón. Bajo esta premisa, mientras más insaturaciones presente un ácido graso, mayor sería su vulnerabilidad al ataque de las ERO; sin embargo, existen evidencias que indican que cuando se le adiciona a un sistema oleoso un aceite rico en ácidos grasos insaturados estos últimos retardan la oxidación²⁰³. Este hecho puede ser interpretado de dos formas: primero, que la actividad antioxidante/pro-oxidante es relativa al entorno químico, por lo tanto, lo que en un medio se puede considerar antioxidante en otro puede actuar como pro-oxidante; la segunda

interpretación, es que al adicionar un nuevo elemento (de elevada susceptibilidad a ser oxidado) al medio que se estudia, éste será el primer blanco de ataque de las ERO, preservando así por algún período de tiempo la estabilidad del material objeto de estudio. Esto permitiría, en caso de tratarse de un organismo vivo, recuperar a través de los mecanismos endógenos su equilibrio REDOX con una mínima afectación de sus elementos constituyentes. Observaciones recientes sugieren una tercera interpretación: el consumo de ácidos grasos poli-insaturados puede recambiar el contenido de ácidos grasos de las membranas, reciclando los ya oxidados en la síntesis de eicosanoides¹¹³. Tomando en cuenta cualesquiera de las posiciones anteriores, podría interpretarse que una combinación de ácidos grasos libres y esterificados, insaturados y saturados, constituiría una mezcla adecuada con potencial actividad antioxidante. Esto resulta lógico, pues precisamente una mezcla como esta es la que aparecen en la mayoría de las plantas, las cuales son capaces de mantener su balance REDOX interno.

El perfil antimicrobiano de los ácidos grasos también ha sido documentado en la literatura^{204,205}. Existen informes de actividad, incluso ante el virus de inmunodeficiencia humana (VIH)²⁰⁶. En las plantas, los ácidos grasos inactivan a los microorganismos invasores, no sólo por una acción directa, sino que también sirven como precursores biogénicos de compuestos más activos, como el ácido jasmónico, uno de los principales reguladores del sistema defensivo contra herbívoros²⁰⁷.

Han sido descritas múltiples vías a través de las cuales los ácidos grasos desarrollan su actividad antimicrobiana. Se ha demostrado que son capaces de reducir la expresión de factores virulentos de las bacterias, aspecto esencial en el establecimiento de la infección, como son la β -lactamasa y la hemolisina²⁰⁸. Existen, además, evidencias experimentales que indican que los ácidos grasos pueden interrumpir la comunicación célula a célula y prevenir la adhesión bacteriana^{209,210,211}. Su importancia como antimicrobianos en las células humanas de la piel y en mucosas, así como en el sistema inmune innato humano también ha sido informada²¹², llegando algunos autores a considerarlos como los agentes antimicrobianos más potentes de la piel humana^{213,214}. La acción antimicrobiana no sólo se logra por acción bactericida directa, sino también porque mantienen el pH ácido de la superficie de la piel²¹⁵.

Desde el punto de vista estructural, existen evidencias que indican que los ácidos grasos libres presentan una mayor actividad con respecto a los esterificados. Por su parte, las

insaturaciones de los ácidos grasos influyen de manera positiva en su actividad antimicrobiana, siendo la configuración *cis* la más activa²¹⁶.

En la bibliografía consultada, no existe consenso sobre el mecanismo de acción de estos compuestos, aunque existe coincidencia en cuanto a que su blanco primario es la membrana celular. Dadas sus características anfipáticas, los ácidos grasos pueden embeberse en las biomembranas creando poros temporales o permanentes en las mismas. A concentraciones más altas, su acción detergente puede solubilizar la membrana, en tal grado que ocurra la lisis celular^{217,218}, o que se dispersen las proteínas presentes en la bicapa lipídica. En consecuencia, se afectarían los múltiples procesos que ocurren a este nivel, como el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones²¹⁹, la interrupción de la fosforilación oxidativa por inhibición directa de la ATP sintasa y/o por incremento de la permeabilidad de los protones a través de la membrana mitocondrial²²⁰, y la inhibición de la actividad enzimática. En relación con este aspecto, múltiples son las enzimas de membrana que son inhibidas por los ácidos grasos insaturados²²¹. Ellos son capaces de inhibir la propia síntesis de ácidos grasos en la membrana de las bacterias, produciendo alteraciones en su fluidez y en la permeabilidad²²².

Las dos restantes fracciones del extracto fluido en etanol al 70 % de hojas de *Tamarindus indica* L. fueron analizadas por TLC y HPTLC/UV-visible. La fracción de acetato de etilo mostró un color amarillo-anaranjado y su rendimiento de extracción fue de 20.72% del residuo seco total. El análisis por TLC empleando el sistema de solvente fenol-agua 3:1 (v/v) y el método unidimensional fraccionó, tanto en el extracto de acetato de etilo como en el de n-butanol, un total de tres manchas dispuestas a la misma altura y con idénticos valores de razones de flujo (Rf). El revelado de las placas evidenció la presencia de compuestos flavonólicos del tipo de las flavonas y/o flavonoles.

Los otros dos sistemas de solventes fueron desarrollados por el método bidimensional con las mezclas butanol-acético-agua 4:1:3 (v/v/v) ó 6:1:2 (v/v/v) como primer solvente y ácido acético al 5 % como segundo. Los resultados obtenidos en estos dos sistemas fueron similares, con la ventaja de que para la segunda mezcla (al igual que en el sistema fenol-agua 3:1) existen valores de Rf informados en la literatura para los principales fenoles y flavonoides.

Con estos sistemas, el extracto de acetato de etilo presentó nuevamente tres manchas mayoritarias y cinco minoritarias; en cambio el de n-butanol (color rojo pardo intenso y

30.14% de rendimiento) evidenció cuatro mayoritarias y cinco minoritarias. Con estos elementos, se realizó el análisis por HPTLC/UV-Visible (Figura 7).

Los resultados de las razones de flujo y las principales características espectrales de los compuestos mayoritarios aislados en las fracciones de acetato de etilo y n-butanol se presentan en la tabla XVIII. Se aprecia que los seis primeros compuestos presentaron un comportamiento similar, característico de los flavonoides del tipo flavona/flavonol. Estos compuestos exhiben picos de absorción cercanos a los 270 nm (banda II) y entre 330-360 nm (banda I)²²³. En cambio, el compuesto siete presentó sólo un máximo de absorción quedando, excluido del grupo de los flavonoides. Probablemente se trate de un compuesto polifenólico, que comúnmente aparecen asociados a los extractos flavonólicos por sus características químicas similares. Una información importante del espectro UV de los flavonoides consiste en la diferencia aritmética entre las longitudes de onda de ambos picos de absorbancia, a partir de la cual se puede definir el patrón de sustitución del anillo B²²⁴. Cuando estos valores son inferiores a 83, en el anillo B existe una sustitución hidroxílica (OH) única (manchas 3 y 6), mientras que valores por encima de 83 reflejan una doble sustitución hidroxílica (manchas 1; 2; 4 y 5). El compuesto 3 presentó coincidencia con los valores cromatográficos (Rf) y espectroscópicos (λ) con la apigenina. Los compuestos 1, 2 y 5 presentaron características espectroscópicas casi idénticas, pero diferentes razones de flujo. Es de inferir que se tratan de una misma aglicona, pero con diferentes gliconas. La luteolina 7-o-glucósido, luteonina y orientina, respectivamente, fueron las asignaciones realizadas atendiendo a sus razones de flujo. Sobre la base de los valores cromatográficos (Rf) y espectroscópicos (λ) fueron asignados a las manchas 4 y 6 las sustancias isorientina y vitexina (anexo I).

De las manchas minoritarias, las tres últimas de cada fracción presentaron iguales razones de flujo, pero su baja concentración no permitió determinar sus espectros de absorción. Su estudio empleando los agentes reveladores sugiere que se trata también de compuestos polifenólicos, preferentemente del tipo flavonólico. En general, se puede afirmar que el método empleado detectó un mínimo de 13 compuestos de naturaleza polifenólica y un máximo de 16 en el extracto fluido en etanol al 70 % de las hojas de tamarindo.

En trabajos precedentes se detectaron 11 compuestos polifenólicos empleando cromatografía líquida de alta resolución acoplado a dos espectrómetros de masas (HPLC/MS/MS) en un extracto fluido de las hojas en etanol al 80%. Nueve de dichos

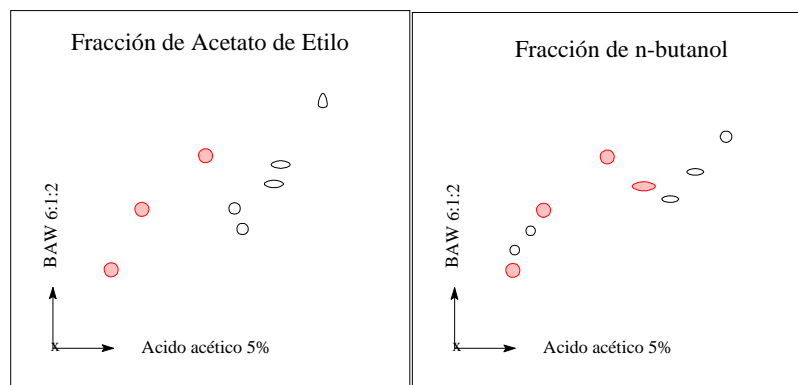


Figura 7. Esquemas de los cromatogramas bidimensionales obtenidos por HPTLC para las fracciones de acetato de etilo y n-butanol del extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L.

Se utilizó como sistema de solventes n-butanol-acético-agua 6:1:2 (v/v/v) y ácido acético al 5%. Se empleó placas 10x10 de sílica gel (60F₂₅₄).

Tabla XVIII. Caracterización química por HPTLC-UV de las fracciones de acetato de etilo y n-butanol resultantes del fraccionamiento líquido-líquido del extracto fluido en etanol al 70 % de hojas de *Tamarindus indica* L.

Fracción de acetato de etilo						Fracción de n-butanol					
No.	Compuesto determinado	Rf	λ_1	λ_2	λ_3	No.	Compuesto determinado	Rf	λ_1	λ_2	λ_3
1	luteolina 7-o-glucósido	0,31	212	267	358	4	isorientina	0,26	205	260	357
2	luteolina	0,45	212	267	357	5	orientina	0,44	214	266	358
3	apigenina	0,62	205	267	336	6	vitexina	0,62	213	270	342
-	-	-	-	-	-	7	ácido cafeico	0,63	-	-	322

Las estructuras químicas se muestran en el anexo I.

compuestos presentaron naturaleza flavonólica (8 flavonas y 1 flavonol) y dos fueron compuestos fenólicos⁴³.

Sobre la base de la similitud de los resultados obtenidos entre ambas técnicas, del comportamiento UV-Visible obtenido en el análisis espectral realizado (III.2.1) y de la concentración de fenoles y flavonoides totales determinada para los extractos fluidos al 70 % y al 80 % de etanol (III.2.1), es posible inferir que el número y la naturaleza de compuestos fenólicos aislados en los extractos fluidos al 70 y al 80 % de etanol son similares, diferenciándose sólo en cuanto a su concentración.

En sentido general, se observó que el acetato de etilo extrae principalmente agliconas y compuestos poco glicosilados (más liposolubles), mientras que el n-butanol extrae preferentemente flavonoides diglicosilados (más polares), acorde con la naturaleza química de los mismos.

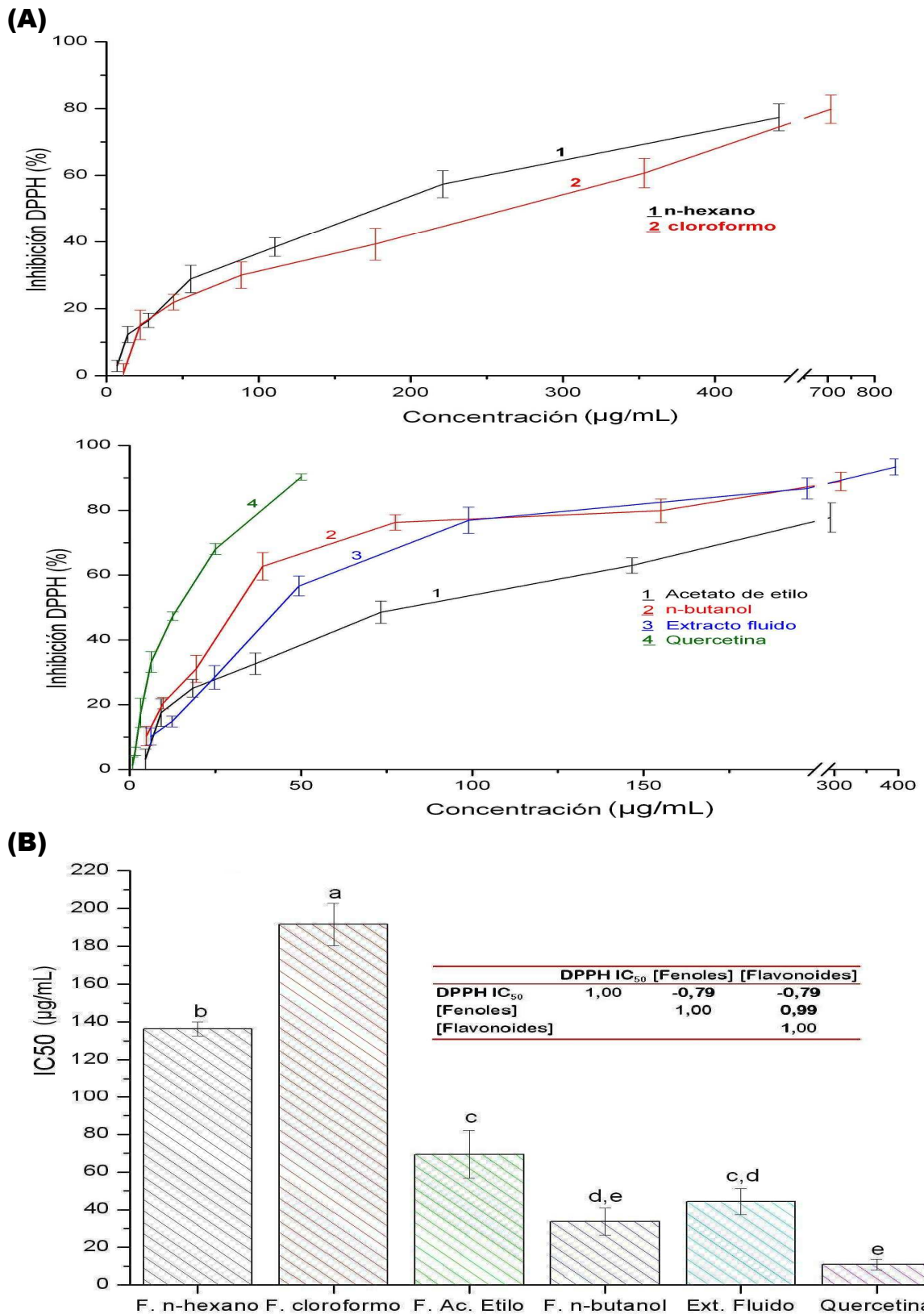
Como consecuencia de éste fraccionamiento y caracterización química del extracto fluido al 70 % en etanol, se lograron identificar diversos tipos de metabolitos que permiten predecir una buena respuesta en los estudios preclínicos a desarrollar en el tamarindo, y además ofrecen información importante en el esclarecimiento de los posibles mecanismos de acción asociados a la actividad.

III.4 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto fluido y sus fracciones.

III.4.1 Actividad frente al radical 2,2 difenil -1-picrilhidracilo (DPPH)

El radical conocido como DPPH es un radical estable, por tal motivo ha sido empleado ampliamente en la determinación de las características antioxidantes de una sustancia o extracto. Si la sustancia evaluada posee actividad antioxidante directa, entonces la misma será capaz de reducir al 2,2 difenil -1-picrilhidracilo por acción directa sobre él, ya sea por transferencia de un electrón o de un radical hidrógeno²²⁵. El DPPH absorbe significativamente a 517 nm, por lo que la disminución de la absorción a esta longitud de onda se interpreta como la desaparición del mismo, producto de la acción del antioxidante. Este ensayo fue realizado tanto para el extracto fluido en etanol al 70% como para las fracciones obtenidas en el proceso de separación líquido-líquido. En el experimento se empleó quercetina como sustancia antioxidante de referencia.

Los resultados relacionados con la reducción de radicales DPPH por el extracto fluido y sus fracciones, así como los valores de IC₅₀ estimados, se muestran en la figura 8.



(C)
 Figura 8. Actividad antioxidante frente al radical DPPH del extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L., sus fracciones y la quercetina (A y B). Valores de IC₅₀ y matriz de correlación entre las variables químicas y farmacológicas (C). Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$).

Las fracciones de n-hexano y cloroformo constituyeron las de menor actividad inhibitoria del DPPH con respecto al resto de las evaluadas. Las mismas se caracterizan químicamente por un elevado contenido de ácidos grasos; no obstante, la fracción de n-hexano mostró una mayor actividad antioxidante, con una $IC_{50}=136,28 \mu\text{g/mL}$ significativamente menor que la obtenida para la fracción de cloroformo $IC_{50}=191,56 \mu\text{g/mL}$ ($p<0,05$). Como se planteó con anterioridad, la actividad antioxidante de los ácidos grasos libres es superior a la de los ácidos grasos esterificados, debido a la probable capacidad del grupo carboxilo ($R\text{-COOH}$) de ceder un radical hidrógeno. Bajo esta premisa, resultaría lógico suponer que al disponer de mayor número de compuestos acídicos, la fracción de cloroformo fuese la más activa. Sin embargo, los ácidos málico, tartárico y ftálico, según sus pK_a , se deben encontrar disociados en el medio de experimentación. Esto provoca que el protón hidrógeno del grupo carboxilo se encuentre donado al medio o esté comprometido en la formación de enlaces por puentes de hidrógeno con el etanol, imposibilitando que pueda ser cedido como radical hidrógeno. Algunos ejemplos de este tipo de comportamiento radicalario de los ácidos orgánicos aparecen explicados en un excelente artículo de revisión publicado en 1997 por el reconocido internacionalmente como “el padre de la modelación molecular” Corwin Hansch²²⁶. Dado que estos tres ácidos de cadena corta representan casi el 50% del total extraído, resulta lógico aceptar el hecho que la fracción de n-hexano sea más activa, máxime cuando en ella se identifica además el compuesto volátil farnesilcetona, con una probada acción antioxidante²²⁷.

Ambas fracciones mostraron acción antioxidante dependiente de la concentración, aún cuando ésta puede considerarse como moderada o débil, si se compara con la actividad de la quercetina y de las otras dos fracciones del tamarindo. Sin embargo, la actividad observada fue superior a la informada para extractos de otras especies de plantas productoras de ácidos grasos, como ocurre en una variedad de bananas (*Musa acuminata*)²²⁸.

Las fracciones de acetato de etilo y n-butanol se caracterizan por contener flavonoides y fenoles, sustancias descritas como potentes antioxidantes. Los valores de IC_{50} calculados confirmaron esta observación: $69,41 \mu\text{g/mL}$ para la fracción de acetato de etilo, y $33,73 \mu\text{g/mL}$ para la fracción de n-butanol. Ambas fracciones, por tanto, son significativamente más activas que las fracciones apolares de n-hexano y cloroformo ($p < 0,05$). Sus valores de IC_{50} fueron similares a los de extractos considerados muy activos para este tipo de ensayo como el abedul amarillo, entre otros²²⁹.

La fracción de n-butanol fue mucho más activa que la de acetato de etilo, y de actividad comparable a la sustancia de referencia quercetina. Desde el punto de vista cualitativo, los fenoles tipo catecol son mucho más activos que aquellos de naturaleza fenólica simple. Al analizar los compuestos mayoritarios de cada fracción, se evidenció que ambos solventes extraen tres flavonoides, dos de naturaleza catecólica y uno de naturaleza fenólica. No obstante, la fracción de n-butanol logró extraer además, el ácido cafeico, polifenol de naturaleza catecólica. Los ácidos p-hidroxicinámicos, particularmente el ácido cafeico han mostrado una potente actividad secuestrante del radical DPPH con valores de IC_{50} similares a la quercetina^{230,231}. El mecanismo por el cual el ácido cafeico puede ejercer su acción antioxidante es similar al descrito para los flavonoides. La pérdida del electrón en su reacción con la especie oxidante, es compensada por una deslocalización electrónica estabilizada por resonancia y favorecida por la conjugación adicional que ofrece la función propenoica al grupo catecol²³². Bajo estas premisas, la fracción de n-butanol a juzgar por los compuestos mayoritarios, debería resultar cualitativamente más activa que la fracción de acetato de etilo, como ocurrió experimentalmente. Los resultados de la cuantificación de fenoles y flavonoides del extracto fluido y sus fracciones (Tabla XIX), corroboró esta evidencia experimental.

La actividad antioxidante de estas dos fracciones está bien documentada, a juzgar por su composición química. Los compuestos polifenólicos ocupan el centro de atención mundial en cuanto a actividad antioxidante respecta^{233,234,235}, y entre ellos los flavonoides constituyen el tipo de compuesto mayormente estudiado^{236,237}.

La bibliografía muestra un elevado número de publicaciones que incluyen la medición de la actividad frente al DPPH, tanto de extractos totales de plantas como de sustancias aisladas. Para extractos totales, las actividades referidas como IC_{50} varían desde 25 hasta 2021 $\mu\text{g/mL}$ ²³⁸, aún cuando la mayoría de las especies comúnmente informadas como antioxidantes exhiben valores entre los 50 y 250 $\mu\text{g/mL}$ ^{239,240,241}. Existen productos de algunas especies muy activos, cuyos valores son inferiores a 15 $\mu\text{g/mL}$ ²⁴². La variación en la actividad de las sustancias puras puede resultar mayor, pero en general las más activas presentan valores bajos de IC_{50} como el ácido gálico con 3,4 $\mu\text{g/mL}$ ²⁴³. Precisamente, empleando el ácido gálico como control se realizó un estudio donde se evaluaron las actividades de varios flavonoides aislados de la especie *Inula britannica*. De ellos, la luteonina, compuesto presente en la fracción de acetato de etilo de *Tamarindus indica* L., resultó ser la tercera más activa con un valor de IC_{50} igual a 11,7 $\mu\text{g/mL}$, mientras que un

Tabla XIX. Valores de fenoles y flavonoides totales en el Extracto Fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L. y sus fracciones

Extracto/fracción	Fenoles Totales (mg/mL)		Flavonoides Totales	
	Media	Desv. Estándar	Media	Desv. Estándar
n-Hexano	0,82	0,01	0,01	0,00
cloroformo	1,32	0,02	0,20	0,01
acetato de Etilo	6,08	0,05	0,89	0,01
n-Butanol	10,03	0,06	1,35	0,01
Extracto fluido en etanol al 70%	18,49	0,05	2,49	0,01

derivado 7-o-glucosilado diferente al aislado en esta misma fracción mostró una IC₅₀ de 10,6 µg/mL²⁴⁴.

Múltiples autores han intentado establecer una correlación entre la concentración de especies antioxidantes cuantificadas en forma de fenoles totales y la actividad antioxidante frente al radical DPPH. Los resultados son divergentes, mientras algunos obtienen buenos parámetros de correlación^{245,246,247}, otros refieren poca correlación entre estas dos variables²⁴⁸. Una posible explicación a este comportamiento podría estar relacionada con la variación en la composición cualitativa de los extractos. Mientras las técnicas de cuantificación de fenoles no discriminan en la naturaleza de los mismos, la actividad intrínseca de cada uno de ellos es muy diferente. Trabajos recientes establecen la siguiente escala de actividad antioxidante para polifenoles: dímeros de proantocianinas > Flavonoles > Flavonas > ácidos hidroxicinámicos > fenoles simples^{249,250}. De tal forma, extractos con bajos niveles de fenoles pueden mostrar una buena actividad antioxidante debido a la actividad intrínseca de los mismos, mientras que otros con elevada concentración no resultan tan efectivos como se esperaría. No obstante, es prácticamente una regularidad el hecho de que extractos con elevados niveles de fenoles muestren buena actividad antioxidante²³⁵.

En la figura 8 se muestran también los resultados obtenidos para el extracto total en experimentación (extracto fluido 70%) y para la quercetina. El valor estimado de IC₅₀ de este extracto fue 44,36 µg/mL, similar desde el punto de vista estadístico al de la fracción butanólica, la más activa (p < 0,05).

Al comparar el valor de IC₅₀ del extracto fluido de *Tamarindus indica* L. con respecto a los valores medios de extractos totales de plantas referidos anteriormente, se evidencia que dicho extracto presentó una muy buena actividad en cuanto a la captura del radical DPPH respecta.

Extractos de varios órganos de la especie *Tamarindus indica* L han sido evaluados por este ensayo antioxidante. En este sentido, un extracto hidroalcohólico al 80% de las hojas del tamarindo que crece en Cuba fue evaluado frente al DPPH, pero los resultados fueron expresados en función del volumen añadido y no en base a la concentración del extracto, lo que imposibilita la comparación de los datos¹⁴. También de las hojas se preparó un extracto acuoso que a una concentración de 250 µg/mL inhibió el 57% del radical DPPH⁶³, valor aproximadamente seis veces superior a los obtenidos en el presente trabajo. Se confirma

así la observación de que los solventes de mediana polaridad presentan una mayor capacidad extractiva de compuestos con potencial antioxidante.

En la preparación de un extracto antioxidante a partir de la pulpa del fruto se empleó como menstruo etanol al 70 %. A la concentración de 100 µg/mL, este extracto capturó el 42 % del DPPH añadido, actividad significativamente menor que la obtenida en las hojas, aún cuando la concentración de polifenoles determinada para el extracto del fruto fue de 32 mg/mL²⁵¹. Extractos de corteza de la semilla y de la semilla entera también han sido evaluados con este ensayo. El extracto de la corteza de semilla seca extraída con metanol resultó muy activo con una IC₅₀ de 38,66 µg/mL, similar a la obtenida para las hojas. Este extracto metanólico fue a su vez, el que mayor concentración de fenoles logró extraer 32.96 mg/mL²⁵². Asimismo, existen informes de extractos de la semilla completa con valores de IC₅₀ de 2000 µg/mL, lo que confirma el hecho de que las especies antioxidantes de las semillas se encuentran en su pericarpio²⁵³.

La matriz de correlación elaborada a partir de los valores de la variable biológica y de las correspondientes variables químicas medidas (Figura 8), demostró que la actividad secuestrante de este radical está igualmente relacionada con la concentración de fenoles que con la de flavonoides. Aunque en ambos casos el coeficiente de correlación fue elevado, el p-valor del mismo no es significativo, por lo que bajo estas condiciones no se puede afirmar que la actividad intrínseca de inhibición del DPPH por el extracto de las hojas de tamarindo dependa exclusivamente de la concentración de fenoles y/o flavonoides.

III.4.2 Determinación del Poder Reductor

El método del poder reductor se basa en la capacidad de la sustancia que será evaluada de reducir las especies férricas (Fe³⁺) a ferrosas (Fe²⁺) por una transferencia electrónica directa. Este ensayo se presenta en la literatura en dos variantes: la conocida como FRAP (*Ferric Reducing/Antioxidant Power*) y la conocida como *Reduction Power* que es la empleada en nuestro trabajo, diferenciándose una de otra principalmente en la fuente de Fe³⁺ que se adiciona al sistema²⁵⁴. Ambas técnicas han sido referidas como métodos dependientes del solvente²⁵⁵, por lo que se evitaron comparaciones. En este experimento, se realizó una medición espectrofotométrica a 700 nm, longitud de onda donde absorbe el complejo de Fe²⁺ formado. El incremento de la absorbancia a esta longitud de onda es proporcional a la cantidad de Fe³⁺ reducido a Fe²⁺ por la especie antioxidante evaluada.

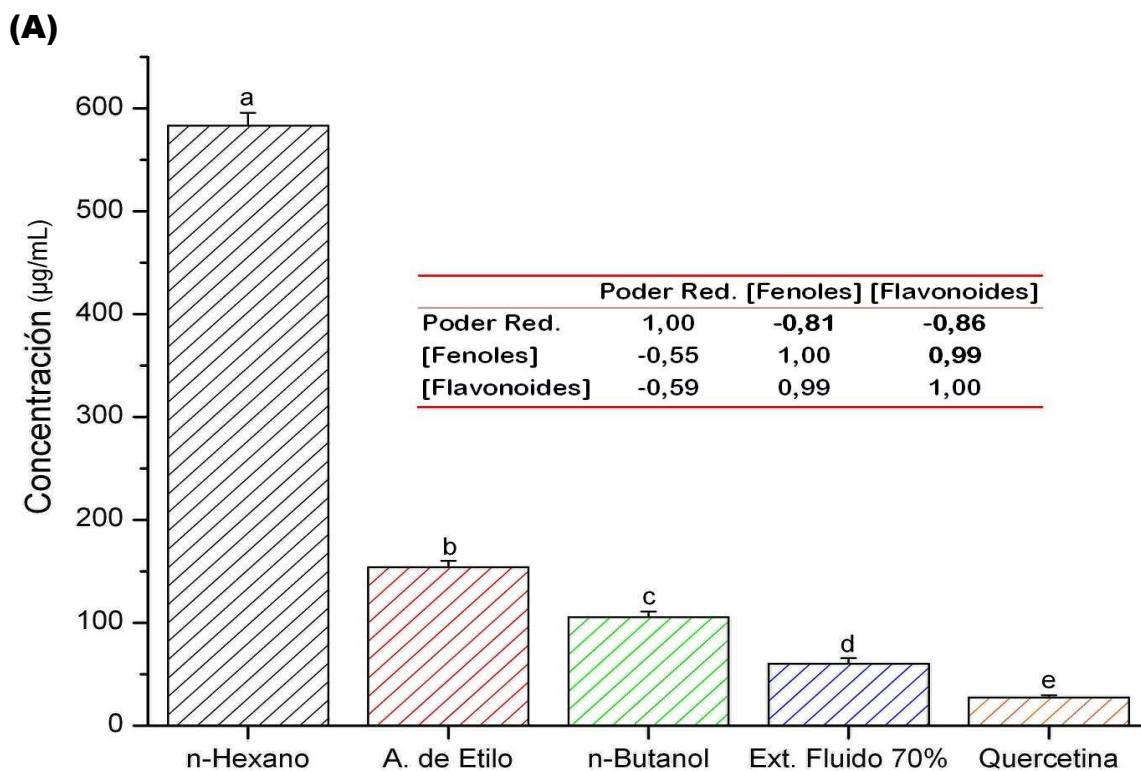
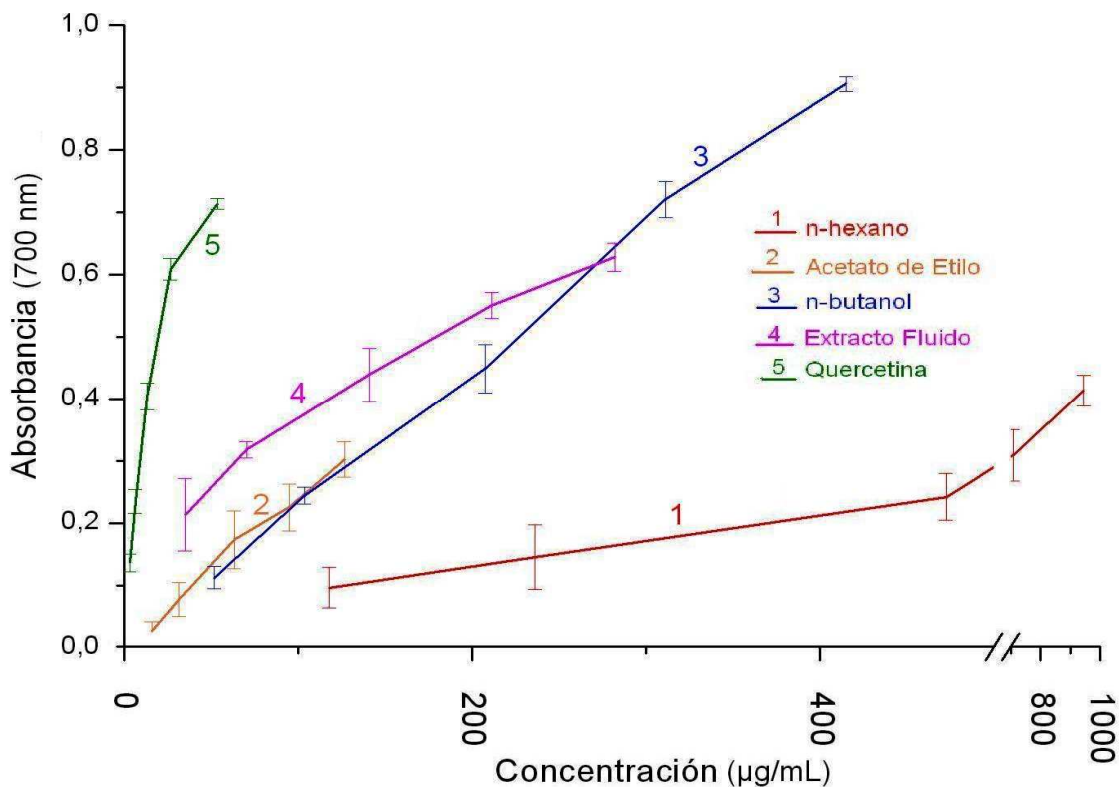
Este ensayo fue realizado tanto para el extracto fluido en etanol al 70% como para las fracciones obtenidas en el proceso de separación líquido-líquido. Se refirió el poder reductor como la concentración de la fracción o extracto a la que se alcanza un valor de absorbancia de 0,3 (Figura 9). Se omitió la fracción clorofórmica, por no presentar actividad a las concentraciones evaluadas.

Los resultados evidenciaron una moderada actividad, llegando a ser baja, en la fracción de n-hexano, si las comparamos con la de la sustancia de referencia.

Para el ensayo de captación del radical DPPH se planteó que el mismo podía ser neutralizado por transferencia de un electrón o de un radical hidrógeno; sin embargo, para este ensayo, la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} sólo es posible por transferencia electrónica. De tal manera, la actividad antioxidante aportada por el grupo carboxilo de los ácidos grasos libres frente al DPPH queda totalmente anulada cuando se evalúa el Poder Reductor. Resulta lógico que la fracción clorofórmica sea inactiva o poco activa, pues tres de sus cuatro componentes con posible actividad antioxidante quedan inhabilitados químicamente de reducir el ión Fe^{3+} a Fe^{2+} .

La fracción de n-hexano presenta algunos elementos coincidentes con los de la fracción clorofórmica; sin embargo, existen algunos que las diferencian. Esta fracción extrae de las hojas del tamarindo principalmente ácidos grasos (libres o esterificados) insaturados, mientras que en la fracción clorofórmica predominan los de naturaleza saturada. Como se ha explicado, la actividad antioxidante de los ácidos grasos también ha sido asociada a la presencia de insaturaciones múltiples, donde existe una elevada disponibilidad de electrones debido a la naturaleza química del enlace π - π . En particular, los derivados metilados del ácido linolénico y linoleico extraídos en la fracción de n-hexano, son ricos en electrones y poseen una elevada capacidad de reaccionar con las especies oxidantes. Igual comportamiento puede ocurrir con el 3-eicosino, una sustancia con elevada densidad electrónica en su triple enlace, y al aceite volátil farnesilcetona (tres insaturaciones), los cuales son aislados exclusivamente en la fracción de n-hexano.

No obstante, desde un punto de vista químico, el hecho de que un ácido graso insaturado o un alquino sea capaz de transferir un electrón, y de esta forma reducir al Fe^{3+} es un evento químico de baja probabilidad de ocurrencia. Por esta razón no se descarta el hecho de que los compuestos minoritarios no identificados por la técnica empleada puedan aportar a la actividad evaluada.



(B) Figura 9. Poder de Reducción del extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L., sus fracciones y la quercetina (A). Valores de concentración a los cuales se obtiene una absorbancia de 0,3, y matriz de correlación entre las variables químicas y farmacológicas (B).

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$).

En cuanto a las fracciones de acetato de etilo y de n-butanol, nuevamente la fracción de n-butanol resultó más activa que la de acetato de etilo. Al igual que ocurre en el ensayo de captación del radical DPPH, la actividad determinada puede estar relacionada con la mayor concentración de fenoles y flavonoides en el sistema (Tabla XIX).

A pesar de que los valores del coeficiente de correlación entre los flavonoides y fenoles totales *versus* el poder reductor (Figura 9) son elevados, no se encontró significación estadística ($p < 0,05$). Además, en su estimación no fue incluida la fracción de cloroformo, pues pese a contener concentraciones apreciables de fenoles y flavonoides totales no presentó actividad farmacológica medible. Algo similar ocurrió con la fracción de n-hexano a la cual no se le determinan flavonoides; sin embargo, presentó actividad, por lo que no se puede afirmar que el poder reductor del extracto de las hojas de tamarindo elaborado y de sus fracciones dependa exclusivamente de la concentración de fenoles y/o flavonoides.

La observación más llamativa de este experimento es el hecho de que el extracto fluido resultó más activo que el resto de sus fracciones (Figura 9). El análisis de la metodología experimental empleada evidencia que en la misma la concentración de la especie Fe^{3+} es elevada, la cual actúa como sustancia en exceso. Si la fracción en experimentación resulta poco activa y además, funge como sustancia limitante, entonces la actividad individual observada será baja y dispersa entre las fracciones²⁵⁶. Sin embargo, el extracto fluido concentra a todos los compuestos activos en una única formulación, los cuales independientemente de su velocidad de reacción podrán interaccionar con el exceso de la especie Fe^{3+} existente en el medio, logrando una actividad superior por la acción sinérgica de los diferentes compuestos activos.

Precisamente en esta acción sinérgica de los compuestos antioxidantes de igual y diferente polaridad química se basa la hipótesis antioxidante de los naturalistas que defienden el enfoque conocido como “*Polymeal*”. Este enfoque consiste en la aplicación de extractos totales de plantas (multicomponentes) en vez de fracciones élites aisladas, ya que al utilizar el extracto total, se emplearía todo el sistema del balance redox de la planta. Debido a que la capacidad antioxidante/pro-oxidante de una sustancia depende del entorno químico, con esta hipótesis naturalista se evitaría que uno o unos pocos componentes, por su marcado carácter antioxidante, pudieran en un medio adverso constituir *per se* especies pro-oxidantes. Ello ha sido informado para la quercetina y para las antocianinas²¹³.

Esta observación corrobora el hecho de que las hojas del tamarindo producen una diversa gama de antioxidantes con estructura y actividad química diversa, y que la separación de los mismos en “fracciones bioactivas” disminuye su utilidad práctica.

III.4.3 Determinación de la capacidad de acomplejamiento de Fe^{2+}

El ión hierro II (Fe^{2+}) participa como catalizador de numerosas reacciones de oxidación-reducción en el organismo. En algunas de ellas, como en la reacción de Haber-Weiss y en la reacción de Fenton, el resultado es la formación del radical hidroxilo ($OH\cdot$) que es la especie químicamente más agresiva a las biomoléculas de la célula. Por tal motivo, el empleo de agentes que logren formar complejos estables con dicho metal, constituye un enfoque promisorio en la terapia antioxidante. Aunque considerados como antioxidantes, los agentes secuestradores del ión Fe^{2+} ejercen su acción de una forma indirecta, pues a diferencia de los ensayos anteriores, se previene la formación de una especie oxidante.

Se realizaron tres experimentos, uno para determinar el intervalo de concentración a la cual se acompleja todo el Fe^{2+} añadido como sustancia limitante, otro en el que el Fe^{2+} es añadido en exceso para calcular la constante de acomplejamiento, y el último donde se evalúa la estabilidad de los complejos formados ante dos concentraciones diferentes del agente quelante EDTA.

Tanto el extracto fluido como cada una de las fracciones absorbieron en mayor o menor grado en el intervalo espectral evaluado, y todos modificaron su comportamiento basal cuando se añadieron al medio, concentraciones de Fe^{2+} . Los espectros de absorción del extracto fluido y la fracción de n-butanol fueron similares, de modo análogo a su comportamiento frente a la adición de Fe^{2+} . Los comportamientos basales de las fracciones de n-hexano y cloroformo también resultaron similares entre ellos; sin embargo, difieren ante la adición del Fe^{2+} (Figura 10).

El intervalo de concentración del extracto fluido y sus fracciones a las que se secuestra la totalidad de Fe^{2+} añadido se presenta en la tabla XX. Se puede inferir que la naturaleza de la interacción entre los extractos evaluados y el Fe^{2+} no es la misma en todos los casos. Para la queretina, el extracto fluido y las fracciones de acetato de etilo y n-butanol, el producto formado genera un máximo de absorbancia (salto batocrómico) a longitudes entre los 400 y 450 nm, región donde no absorben ninguno de los reactantes. De manera contraria, en las fracciones de cloroformo y n-hexano, el salto batocrómico producido por

Tabla XX. Determinación de la capacidad acomplejante de Fe^{2+} por los extractos de hojas de *Tamarindus indica* L. a través de la medición de la absorbancia en la región UV-visible.

Extractos	λ_{max} (nm) de la fracción	λ_{max} (nm) de la fracción + Fe^{2+}	Concentración (mg/mL) necesaria para acomplejar 0,01 mmol/L de Fe^{2+} .
quercetina	237, 338	450	$0,227 \leq C \leq 0,265$
Extracto fluido	235, 273, 338	418	$0,8 \leq C \leq 1,6$
n-Hexano	237, 256	312	$56 \leq C \leq 112$
cloroformo	237	280	$28 \leq C \leq 56$
acetato de etilo	265, 334	406	$28 \leq C \leq 56$
n-butanol	234, 276, 350	418	$1,6 \leq C \leq 3,2$

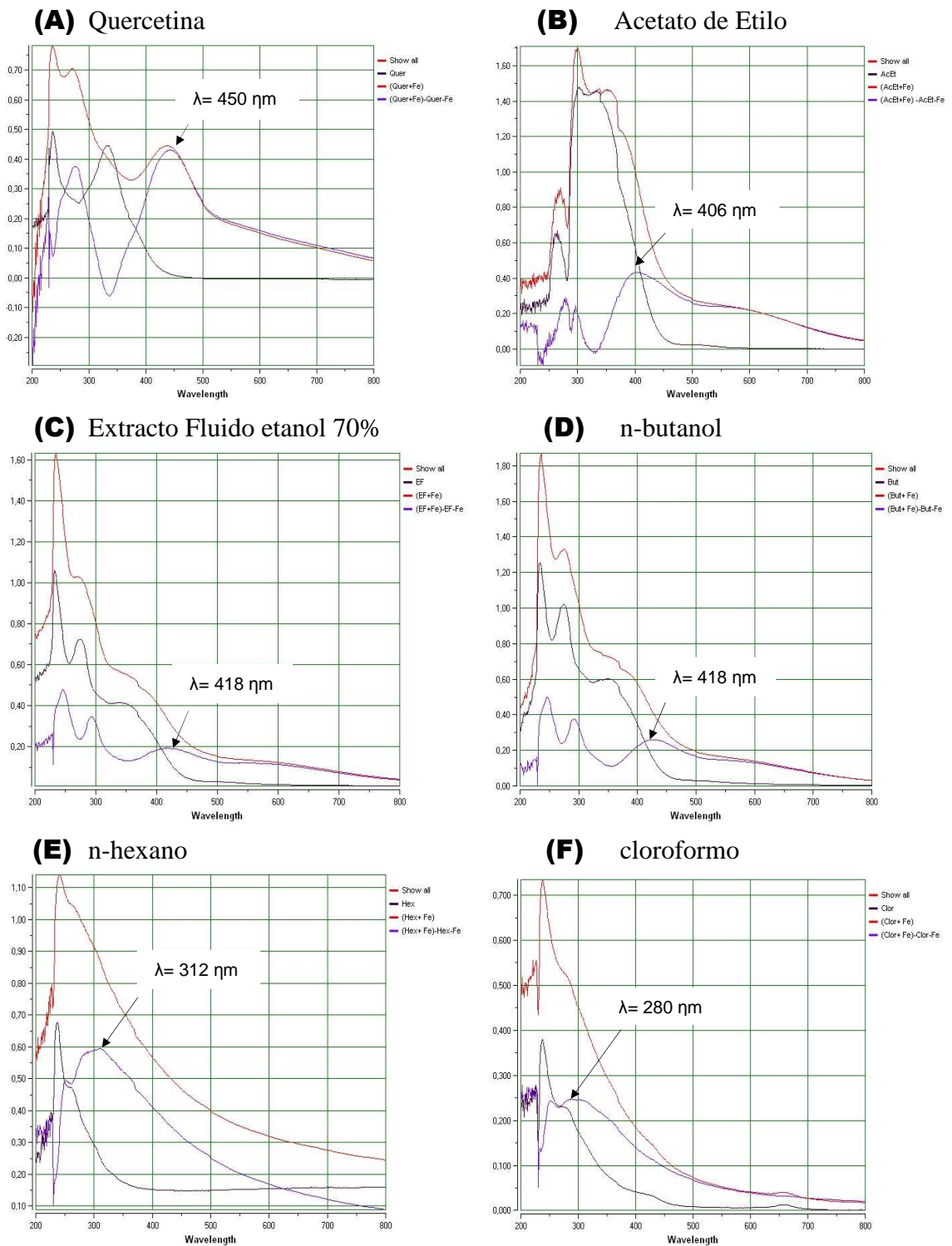


Figura 10. Espectros UV-visible de la quercetina, del extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L. y sus fracciones. Se presentan además, los espectros correspondientes a las interacciones con el Fe^{2+} y las diferencias de absorbancia entre los espectros.

la adición de Fe^{2+} no es lo suficientemente pronunciado como para desplazar el máximo de absorbancia hasta dichas longitudes de onda (Figura 10).

La formación de complejos con el Fe^{2+} por parte de los compuestos polihidroxilados, especialmente aquellos que contienen un agrupamiento catecol, ha sido extensamente debatida en la literatura consultada^{257,258}. Se refiere que a pH 7.4, los catecoles forman rápidamente bi-complejos termodinámicamente estables con el hierro, el cual se une a los hidroxilos adyacentes actuando así como un ligando bidentado²⁵⁹. La formación de dicho complejo resulta fácil de detectar, pues provoca saltos batocrómicos que desplazan los máximos de absorbancia de los fenoles catecólicos hasta la región visible¹⁴³.

Un comportamiento similar a lo anteriormente descrito se observó con la quercetina, el extracto fluido y las fracciones de acetato de etilo y n-butanol. La quercetina es un flavonoide catecólico, al igual que la luteolina-7-o-glucósido, la luteolina, la orientina, la isorientina y el ácido cafeico, compuestos aislados en la fracción de acetato de etilo o en la de butanol, y por ende, presentes en el extracto fluido analizado. Sin embargo, las fracciones de n-hexano y cloroformo no logran este desplazamiento, por lo que se deduce que el producto de la reacción de esta fracción frente al Fe^{2+} es de naturaleza diferente a la del resto de las evaluadas.

Las fracciones de n-hexano y cloroformo son ricas en ácidos grasos y en ácidos orgánicos de cadena corta, respectivamente. Estos compuestos pueden reaccionar con el Fe^{2+} no por la formación de complejos, sino probablemente por formación de sales o por formación de un agregado químico debido al efecto umbral (*Threshold*)²⁶⁰. De tal forma, este mecanismo constituye una vía alternativa para disminuir la concentración de Fe^{2+} del medio, aspecto por el cual se consideran importantes los resultados obtenidos con estas fracciones.

El análisis de los resultados apoya las predicciones anteriores. La fracción clorofórmica, con seis de los siete compuestos identificados con grupos carboxilos libres y la de menor capacidad antioxidante en los dos ensayos anteriores, presentó una mayor actividad (menor intervalo de concentración a la que logra secuestrar el Fe^{2+} añadido) que la de n-hexano, e igual a la de la fracción de acetato de etilo (rica en compuestos polifenólicos de naturaleza catecólica). Por su parte, la fracción de n-hexano con sólo dos ácidos grasos libres identificados, aparece como la fracción menos activa.

A pesar de que la actividad de la fracción de n-butanol resultó notable, la misma resulta inferior nuevamente a la del extracto fluido, apuntando a que la actividad debe ser enfocada desde una visión global y no desde un punto de vista de “compuestos élites”. La

superioridad en la actividad de la fracción de n-butanol con respecto a su homóloga de acetato de etilo, puede deberse a las diferencias cuantitativas con relación a la concentración de fenoles y flavonoides (Tabla XIX), pues al añadirse Fe^{2+} en defecto; las sustancias con capacidad acomplejante de la fracción evaluada, podrán acomplejar el Fe^{2+} independientemente de su velocidad de reacción.

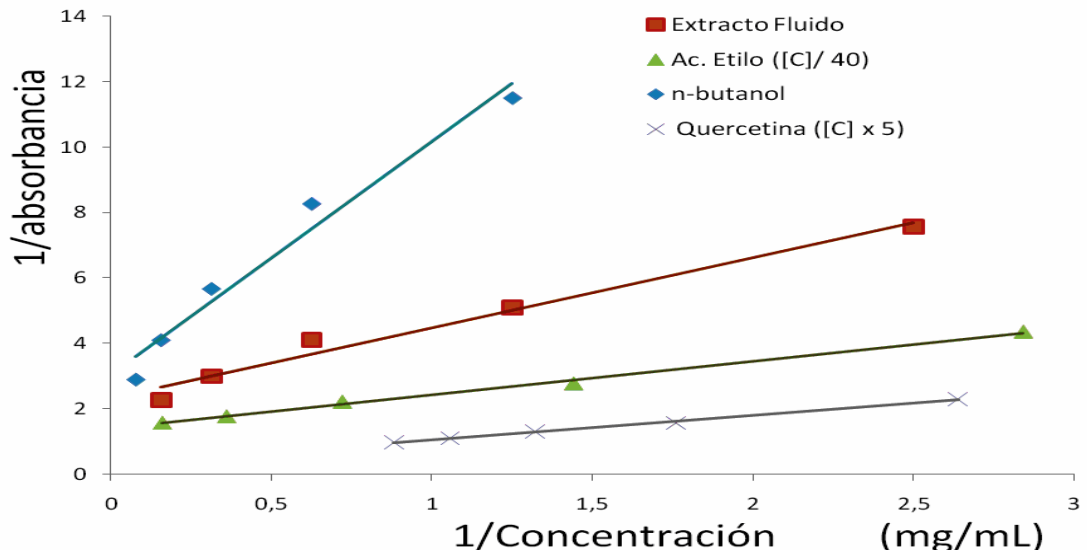
Por otra parte, los resultados de los experimentos, donde se emplearon concentraciones elevadas de Fe^{2+} , demostraron que el proceso de acomplejamiento de Fe^{2+} es dependiente de la concentración.

El valor de la constante de acomplejamiento (k) para la quercetina (sustancia de referencia) fue de $2,00 \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 11). Este valor es equivalente al informado para otras sustancias catecólicas con similares características estructurales, como el ácido 3,4 dihidroxi-benzoico ($k=1,81 \text{ mol L}^{-1}$) y el ácido 3,4 dihidroxi-bencílico ($k=2,66 \text{ mol L}^{-1}$).

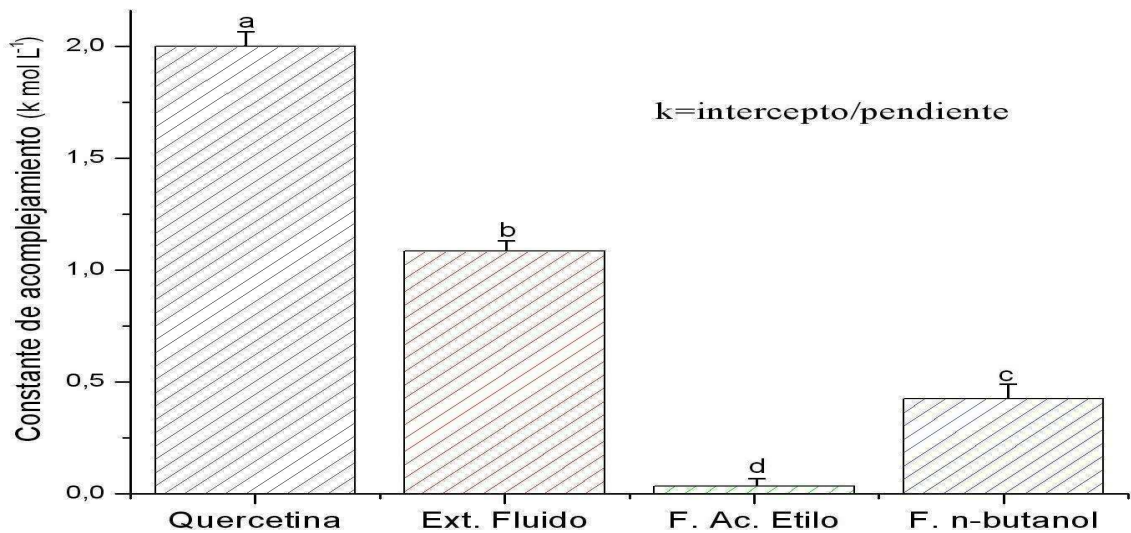
De las muestras en experimentación, el extracto fluido en etanol al 70% mostró los mejores valores ($k=1,085 \text{ mol L}^{-1}$). Su constante de acomplejamiento estimada resultó aproximadamente 30 veces superior a la calculada para la fracción de acetato de etilo ($k=0,035 \text{ mol L}^{-1}$), y poco más del doble de la correspondiente a la fracción de n-butanol ($k=0,426 \text{ mol L}^{-1}$). Si bien es cierto que estas diferencias entre las constantes de acomplejamiento parecen notorias, este comportamiento es normal entre compuestos catecólicos de estructura incluso similar. Así ocurre, con el valor de $1,81 \text{ mol L}^{-1}$ del ácido 3,4 dihidroxi-benzoico y el de $20,31 \text{ mol L}^{-1}$ del ácido clorogénico¹⁴³. Dado que las fracciones de n-hexano y cloroformo no secuestran al Fe^{2+} por un mecanismo de formación de complejos, sus valores no fueron considerados en este análisis.

En contraste con el primer experimento, las diferencias de actividad entre las fracciones de n-butanol y acetato de etilo podrían estar sustentadas más en los aspectos cualitativos de su composición química que en los cuantitativos, aunque estos últimos no deben ser ignorados. En el segundo experimento, el Fe^{2+} fue añadido en exceso, de tal forma que aquellos compuestos capaces de acomplejarlo pudieran reaccionar totalmente, independientemente de su cinética de reacción, pues al ellos representar la sustancia limitante superarían los procesos de competencia por el sustrato.

En términos generales, se observó que el extracto fluido fue el que mayor capacidad acomplejante del Fe^{2+} presenta, tanto cuando se añade Fe^{2+} por defecto como por exceso. En su calidad de extracto total, reúne todas las sustancias con capacidad secuestrante de Fe^{2+} , mientras que en las fracciones, los compuestos se separan en función de su afinidad



(A)



(B)

Figura 11. Representación gráfica de los dobles inversos ($1/A$ vs $1/C$) empleado en la determinación de la constante de acomplejamiento de Fe^{2+} por el extracto fluido en etanol 70% de hojas de *Tamarindus indica* L., sus fracciones y la quercetina (A). Valores estimados para las constantes de acomplejamiento (B).

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$).

química. De tal forma, el extracto fluido se concibe como un sistema multicomponente en el cual la heterogeneidad química interactúa por diversos mecanismos con el Fe^{2+} añadido eliminándolo del medio, ya sea por acomplejamiento, o formación de agregados químicos debido al efecto umbral (*Threshold*). Las fracciones, por su parte, son la expresión fragmentada de esa acción total observada en el extracto fluido.

Si bien la formación de complejos u otro mecanismo capaz de secuestrar el Fe^{2+} es importante por el papel que este metal de transición juega en la generación de las ERO, más relevante es aún la capacidad de la nueva sustancia formada de mantenerlo retenido en condiciones adversas. Por tal motivo, resultó de interés la evaluación de la estabilidad de las sustancias formadas al añadir al medio EDTA, molécula con gran afinidad por el Fe^{2+} . En este ensayo, la mayor concentración de la fracción a evaluar se hizo reaccionar con Fe^{2+} sí 0,1 mmol/L. Posteriormente se añadieron concentraciones de EDTA a 0,01 y 0,1 mmol/L, y se evaluó el comportamiento de la absorbancia en el máximo establecido para cada extracto en el experimento anterior (Tabla XXI).

A concentraciones bajas de EDTA (0,01 mmol/L), la estabilidad de los complejos formados, tanto para la quercetina como para el extracto fluido y las fracciones evaluadas, resultó ser superior al 50 %. De modo que, cuando se emplea esta concentración de EDTA, el equilibrio químico permanece desplazado hacia el producto formado entre la fracción en estudio y el Fe^{2+} . Sin embargo, cuando se añade EDTA a 0,1 mmol/L, solamente el complejo entre la quercetina y el Fe^{2+} permanece en concentraciones apreciables, pues para el resto de las fracciones evaluadas el complejo desaparece casi en su totalidad.

Del análisis anterior se deduce que los polifenoles y flavonoides producidos por las hojas del tamarindo y extraídos mayoritariamente en las fracciones de acetato de etilo y n-butanol, no son capaces de retener el hierro quelado frente a concentraciones de EDTA de 0,1 mmol/L. Sin embargo, los complejos que se forman entre el extracto fluido y el hierro añadido son mucho más estables (10,20 % remanente) que los formados entre las fracciones de acetato de etilo y n-butanol. Incluso a la concentración de 0,01 mmol/L de EDTA el extracto fluido se comportó de manera similar a la quercetina. La causa de este comportamiento puede ser la misma a la expuesta para la formación del complejo, pues la heterogeneidad química del extracto fluido le brinda la posibilidad de reunir a todos los compuestos, mientras que las fracciones presentan sólo algunos de ellos por separado.

Para las fracciones de n-hexano y cloroformo se describió la sustracción del ión Fe^{2+} a partir de otro mecanismo químico, el cual se manifiesta a menores longitudes de onda

Tabla XXI. Estabilidad de los complejos formados entre el Fe^{2+} y el extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L. y sus fracciones al añadir EDTA

Fracción [mg/mL]	Longitud de onda.	Absorbancia sin añadir EDTA	Absorbancia al añadir EDTA [0,01 mmol/L]	% remanente	Absorbancia al añadir EDTA [0,1 mmol/L]	% remanente
Quercetina [0,227]	450	1,030	0,809	78,54	0,711	69,03
Extracto fluido [6,4]	418	0,441	0,345	78,23	0,045	10,20
Acetato de etilo [224,0]	406	0,629	0,350	55,64	0,019	3,02
n-butanol [12,8]	418	0,346	0,240	69,36	-0,008	0,00

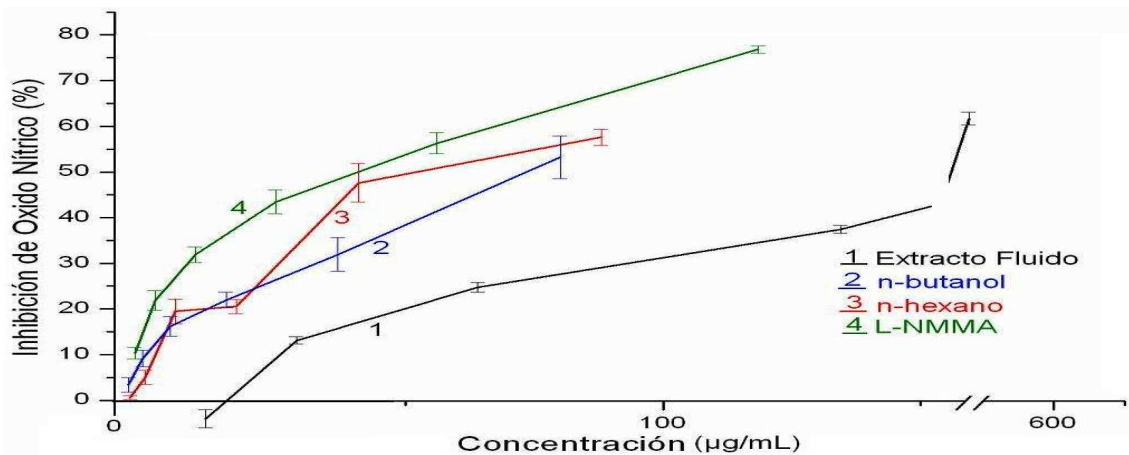
(312 nm para la fracción de n-hexano y 280 nm para la de cloroformo). Para estas fracciones, la cantidad de Fe^{2+} cedido ante la adición de EDTA es baja a las dos concentraciones del agente quelante, lo cual demuestra que el producto de la interacción (fracción apolar- Fe^{2+}) permanece relativamente estable aún ante concentraciones elevadas de EDTA. Este efecto amplía la capacidad del complejo extracto fluido- Fe^{2+} de permanecer estable ante las situaciones adversas, manteniendo secuestrado el Fe^{2+} . De tal manera, garantiza la no participación de este metal en la generación de ERO, ofreciendo una vía única de actividad imposible de alcanzar por ninguna de las restantes fracciones.

III.4.4 Determinación del porcentaje de inhibición de la producción de Oxido Nítrico (NO^{\bullet})

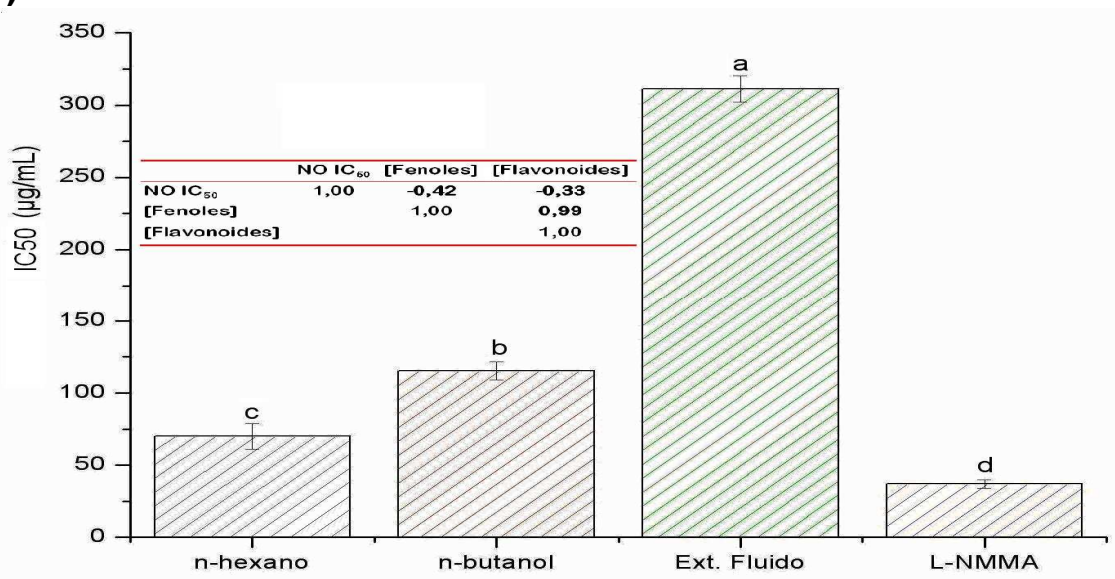
El NO^{\bullet} es producido por varios tipos de células activadas por agentes pro-inflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS), el factor de necrosis tumoral α ($\text{TNF-}\alpha$), la interleucina-1 (IL-1) y el interferón- γ ($\text{IFN-}\gamma$), actuando como un medio de defensa del hospedero. El NO es generado a partir del nitrógeno terminal del aminoácido L-arginina por medio de distintas isoformas de la NO-sintasa (NOS), las constitutivas y las inducibles. Las formas inducibles son las responsables de incrementos sustanciales de este radical libre. Las isoformas de NOS no sólo producen NO, producto primario de la reacción, sino también un grupo de especies reactivas de nitrógeno (ERN) que pueden nitrar u oxidar ciertas biomoléculas. Sin embargo, un exceso en la producción de NO es patogénico para los tejidos del hospedero, al ser esta molécula un radical. Es por ello, que una inhibición efectiva de la acumulación del NO por estímulos inflamatorios representa una estrategia terapéutica beneficiosa²⁶¹.

La evaluación de la inhibición de la formación de NO empleada en nuestro trabajo, parte de la incubación de los diferentes extractos de tamarindo con una suspensión de leucocitos. La activación de la producción de NO se realiza por adición de lipopolisacáridos bacterianos (LPS), estimándose el porcentaje de inactivación del radical NO producido.

Los resultados obtenidos para el extracto fluido y sus fracciones activas, así como para la sustancia de referencia empleada, la N^{G} -monometil-L-arginina (L-NMMA) se presentan en la figura 12. La fracción de cloroformo, aunque mostró una actividad dependiente de la concentración, al igual que la de n-hexano y n-butanol, no alcanzó valores de inhibición cercanos al 50%, aún a la máxima dosis de experimentación (2000 $\mu\text{g/mL}$). La fracción de acetato de etilo; por su parte, mostró un comportamiento variable (Figura 13).



(A)



(B)

Figura 12. Actividad inhibitoria de la producción de óxido nítrico por el extracto fluido en etanol 70% de hojas de *Tamarindus indica* L., sus fracciones y la N-monometil L-arginina (A). Valores estimados de las de las IC₅₀, y matriz de correlación entre las variables químicas y farmacológicas (B).

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$).

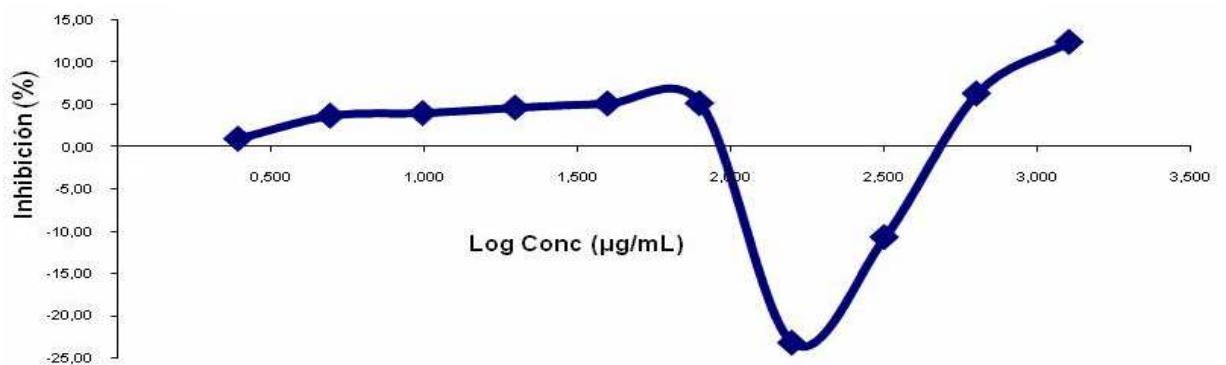


Figura 13. Comportamiento de la fracción de acetato de etilo del extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L. en el ensayo de inhibición de la producción de óxido nítrico.

El extracto más activo estuvo representado por la fracción de n-hexano. En ninguno de los ensayos antioxidantes anteriores, esta fracción figuró como la más activa. La inactivación de NO dependerá de dos factores: la inactivación directa del NO luego de sintetizado a través de un proceso de reducción química del radical, y la inhibición de la síntesis del mismo a nivel de la enzima NO-sintasa. Bajo estas condiciones, consideramos que probablemente algún compuesto de los extraídos en la fracción de n-hexano aporta actividad inhibitoria de la NO-sintasa, como lo hace la sustancia de referencia la N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA).

Desde un punto de vista químico, la composición de la fracción de n-hexano es similar a la de cloroformo; sin embargo, existen algunos elementos que las diferencian. En la fracción de n-hexano, se extraen ácidos grasos con un mayor número de insaturaciones, además de dos metabolitos: el poliacetiteno 3-eicosino, y el aceite volátil farnesilcetona. Dada la poca actividad de la fracción de cloroformo, se infiere que uno o más de estos dos tipos de compuestos ha de ser el responsable de la actividad, a no ser que se trate de alguna sustancia minoritaria no caracterizada por las técnicas espectroscópicas empleadas. Existen informes bibliográficos que señalan la actividad inhibitoria de compuestos de naturaleza poliacetilénica sobre la NO-sintasa²⁶². También ha sido referida la actividad de un diterpeno tricíclico inhibidor de la NO-sintasa²⁶³. Al respecto, la farnesilcetona (aislada en la fracción de n-hexano) es un diterpeno acíclico ligeramente relacionado estructuralmente con el citado inhibidor, pero a su vez resulta un compuesto volátil, los cuales han sido referidos sistemáticamente en la literatura como importantes agentes inhibidores del óxido nítrico^{264,265}. Aún cuando en esta fracción sólo se determinó la farnesilcetona, las hojas del tamarindo producen aceites esenciales (Tablas I y II), de los cuales el α -pineno²⁶⁶ y el limoneno²⁶⁷ son reconocidos entre los más activos. Debido a las características apolares de estos compuestos, los mismos podrían formar parte de los compuestos minoritarios no detectados en el extracto, e influir en la actividad medida.

La fracción de n-butanol es abundante en flavonoides y otras sustancias polifenólicas. Estos compuestos, así como otros estructuralmente relacionados, han sido extensamente referidos como antioxidantes frente al NO^{268,269,270}. Particularmente, el ácido cafeico (principal elemento diferenciante entre las fracciones de acetato de etilo y n-butanol), ha sido documentado por su actividad inhibidora del NO^{271,272}. Así, la actividad detectada en esta fracción puede estar asociada a la presencia de este tipo de compuesto.

Sin embargo, en la fracción de acetato de etilo también se extraen cantidades apreciables de estos compuestos, pero su comportamiento es totalmente diferente al del resto de las fracciones (Figura 13). Este comportamiento particular de la fracción de acetato de etilo puede ser explicado por la presencia en el extracto de sustancias que ejerzan una acción antagónica. A bajas concentraciones la actividad no se modifica; sin embargo, a concentraciones superiores existe una tendencia a aumentar la producción de NO que luego es nuevamente contrarrestada hasta lograr niveles de inhibición. Un artículo de revisión consultado, intentó hallar una respuesta lógica a las actividades variables relacionadas con el NO en diferentes extractos sin una conclusión definitiva²⁷³.

En la figura 12 también se muestra la matriz de correlación estimada entre los flavonoides y fenoles totales *versus* la inhibición de la producción de óxido nítrico. Los resultados muestran una correlación no significativa entre ambas variables, influenciado probablemente por el comportamiento irregular de la fracción de acetato de etilo (elevada concentración de fenoles y flavonoides, tabla XIX) y la apreciable actividad de la fracción de n-hexano (baja concentración de fenoles y flavonoides). Considerando estos resultados, no existe evidencia de que la concentración de estos metabolitos afecte significativamente la inhibición de la producción de óxido nítrico.

III.4.5 *Determinación del porcentaje de inhibición de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en leucocitos humanos por Citometría de Flujo*

El diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (DCFH-DA) es un marcador de fluorescencia ampliamente utilizado para detectar la producción de ERO en neutrófilos y macrófagos. Este marcador, por sus propiedades lipófilas, difunde rápidamente hacia el interior de la célula donde las esterasas citoplasmáticas lo desacetilan a 2'7'-diclorofluorescina (DCFH), compuesto no fluorescente. La DCFH queda atrapada en el interior de la célula por su mayor polaridad, concentrándose en el citoplasma. Este compuesto reacciona cuantitativamente con las ERO y se oxida a 2'7'-diclorofluoresceína (DCF), altamente fluorescente (530 nm), en una acción mediada por la peroxidasa (Figura 14).

Cuando la célula es tratada con estimulantes de la producción de ERO, el incremento de éstos producirá una mayor oxidación. Se observará una mayor fluorescencia, proporcional a la producción de ERO, que será cuantificada por citometría de flujo, a través de los histogramas de intensidad de fluorescencia (Figura 15). Uno de los compuestos más frecuentemente empleados para estimular la generación de ERO es el 12-miristato,

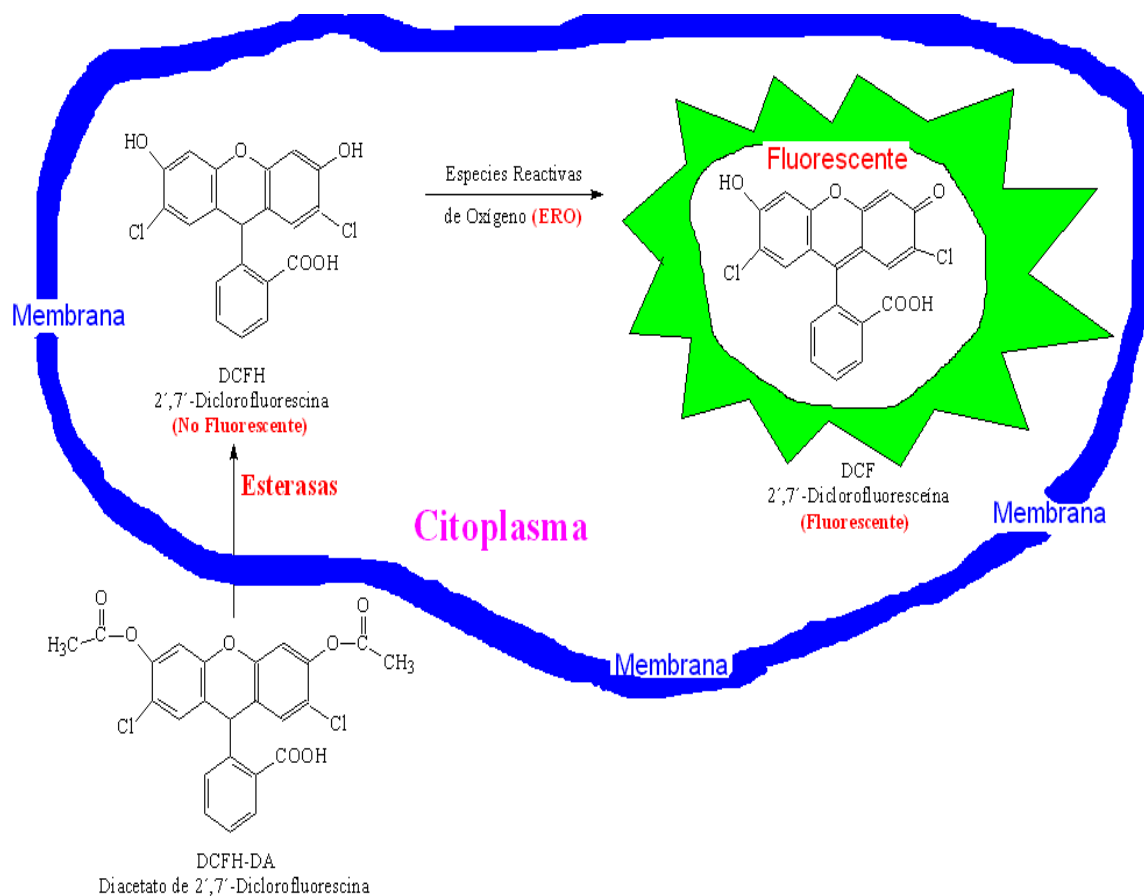


Figura 14. Mecanismo de activación de la fluorescencia por reacción con ERO en el citoplasma celular.

Adaptado de Risco, E. Estudio de la actividad farmacológica de Sangre de Drago (*Croton lechleri*) Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. 2004.

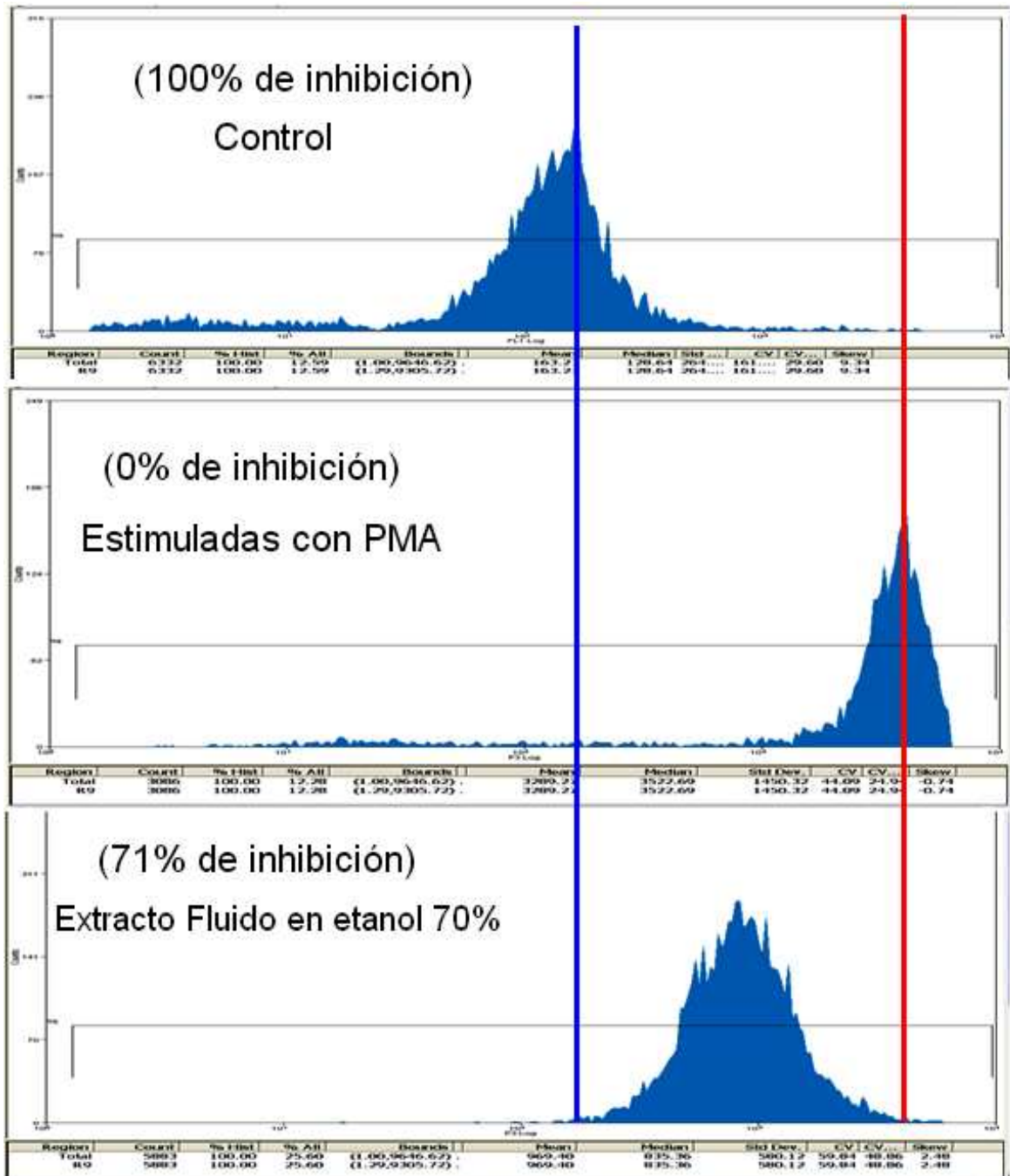


Figura 15. Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia (FITC LOG) para una población de polimorfonucleares marcados con diacetato de 2',7'-diclorofluorescina, estimulados con 12-miristato, 13-acetato de forbol y tratados con el extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L.

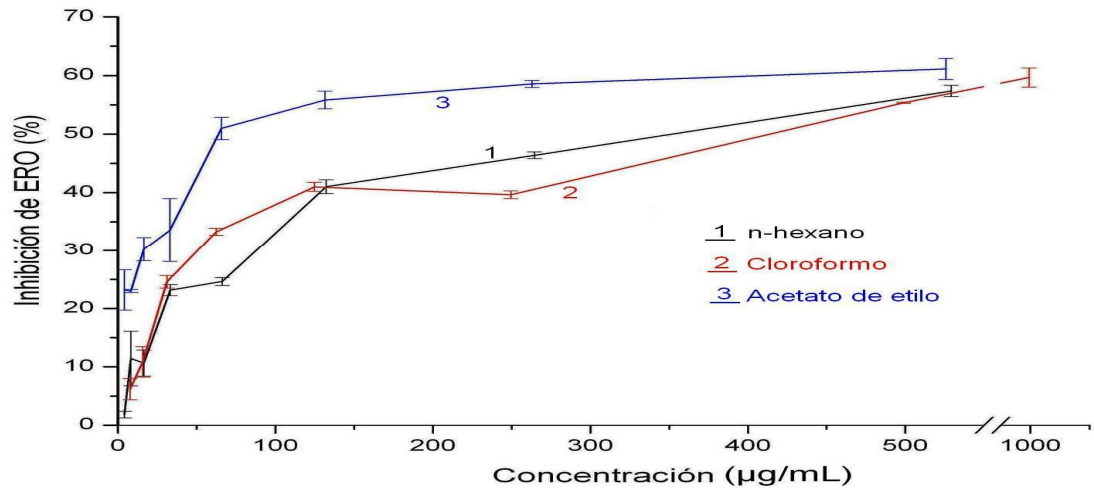
13- acetato de forbol (PMA), el cual actúa a través de la activación de la proteína cinasa C y provoca una marcada fosforilación de la proteína *p47phox*. Los neutrófilos estimulados con óptimas concentraciones de PMA, liberan cantidades de superóxido comparables a las observadas con agonistas fisiológicos. Debido a que todos estos procesos ocurren en el interior del leucocito humano, la técnica permite además estimar la capacidad de las sustancias evaluadas como antioxidantes de atravesar las membranas biológicas.

Debido a que solamente es apreciable la actividad de estimulación de ERO por la acción del PMA en células polimorfonucleares y monocitos/macrófagos, es que fueron escogidas las mismas para evaluar la acción antioxidante del extracto fluido en etanol al 70 % y de sus fracciones.

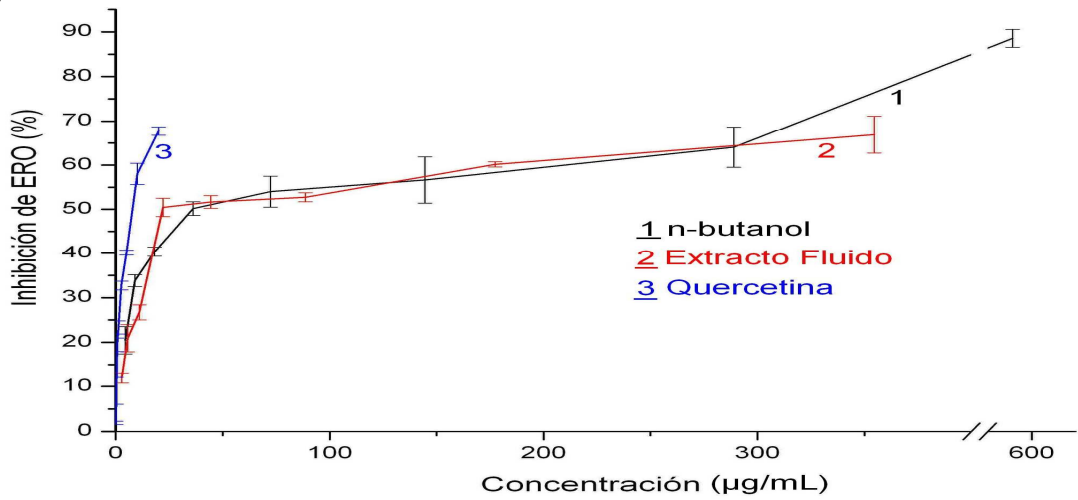
Los resultados relacionados con la inhibición de las ERO por acción de los extractos de las hojas de tamarindo evaluados en células polimorfonucleares y monocitos se presentan en las figuras 16 y 17.

Se evidenció nuevamente que las fracciones más activas son aquellas ricas en fenoles y flavonoides, probablemente por las mismas causas que han sido explicadas en los otros ensayos antioxidantes. Por otra parte, las concentraciones inhibitorias del 50% de las ERO en cada muestra evaluada resultaron menores en monocitos que en polimorfonucleares, comportamiento que se relaciona con los niveles de ERO producidos en cada tipo celular. La población de células polimorfonucleares produce mayor fluorescencia (oxidación de la DCFH por las ERO) que la población de monocitos, al ser estimuladas por PMA. En consecuencia, para neutralizar el 50% de las ERO producidas por los monocitos, se precisa una menor concentración de sustancias antioxidantes.

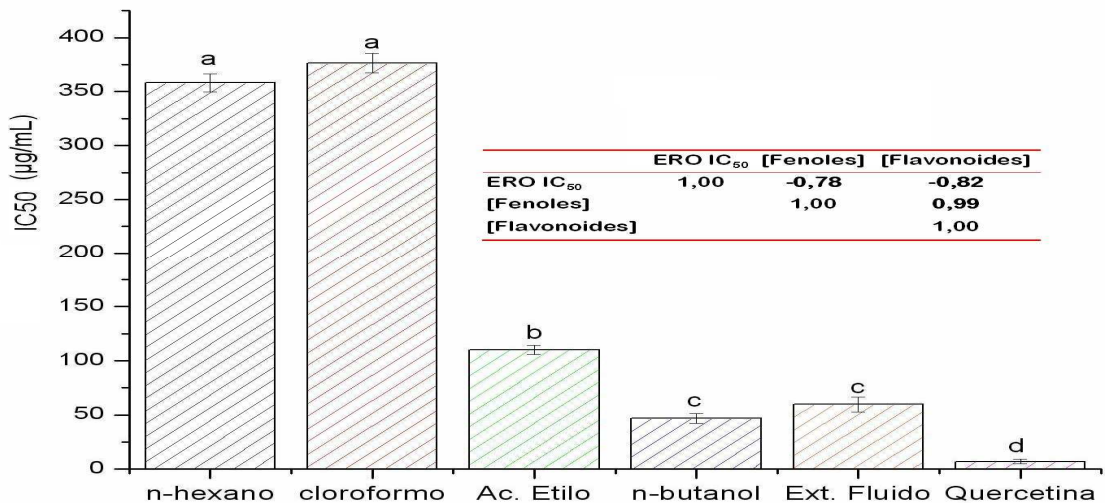
En los dos tipos celulares se encontró un comportamiento diferente para la fracción de n-hexano y el extracto fluido al 70%. Mientras que las IC_{50} del resto de las fracciones decrecen ligeramente, cuando se comparan monocitos y polimorfonucleares, en las fracciones de n-hexano y del extracto fluido, las IC_{50} decrecen de manera pronunciada en los ensayos con monocitos. Este comportamiento puede deberse a diferencias en cuanto a la permeabilidad de la membrana celular a determinados tipos de constituyentes del tamarindo, en monocitos y polimorfonucleares. La actividad medida en este experimento, depende del paso al citoplasma celular de la sustancia antioxidante, por lo que en el caso de los monocitos, la membrana celular podría resultar más permeable a alguno(s) de los componentes de la fracción de n-hexano, permitiéndole ejercer su actividad antioxidante en el citoplasma.



(A)



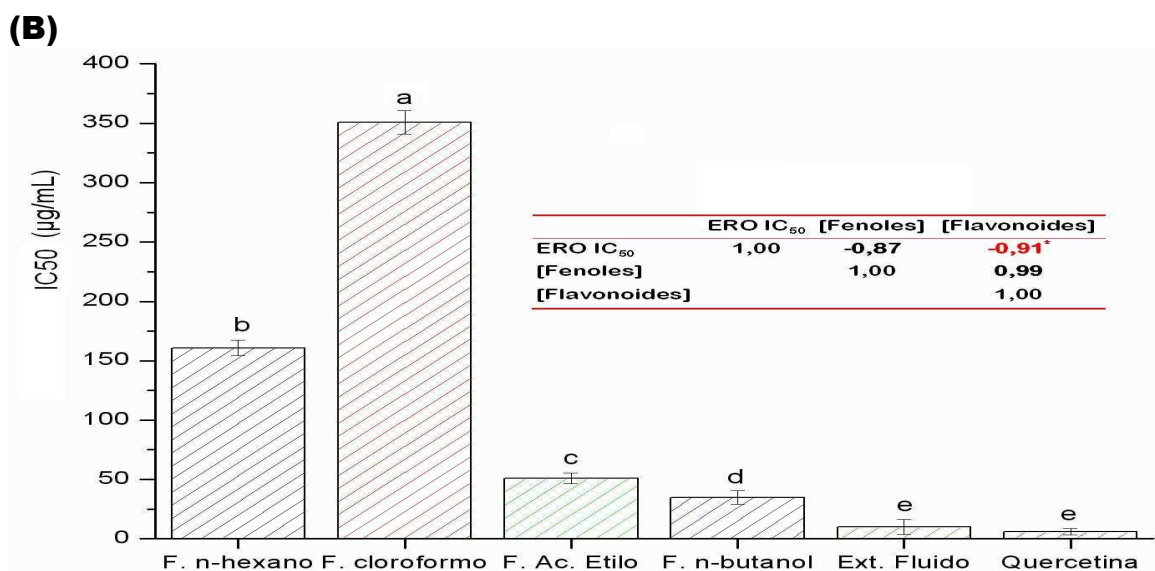
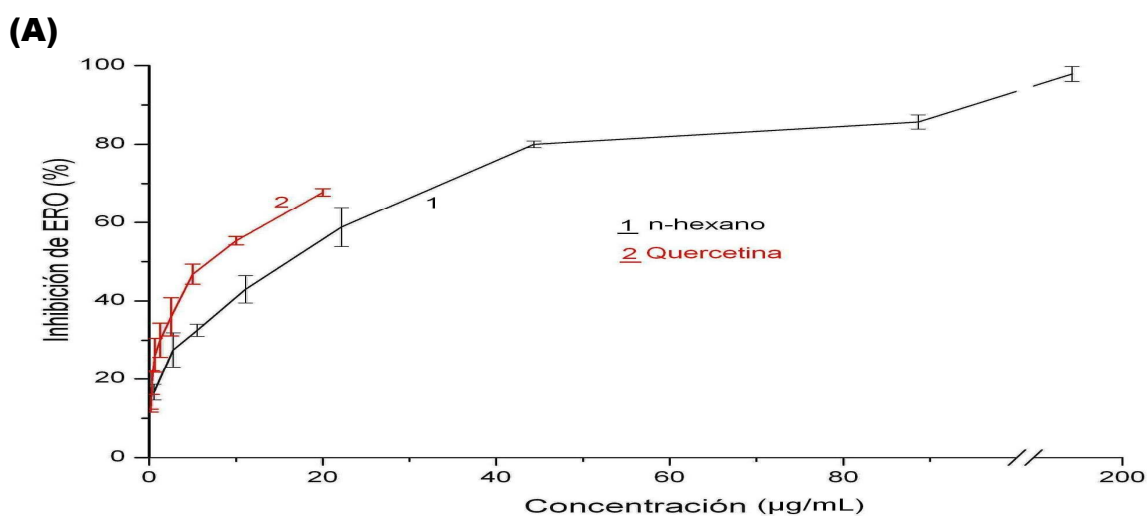
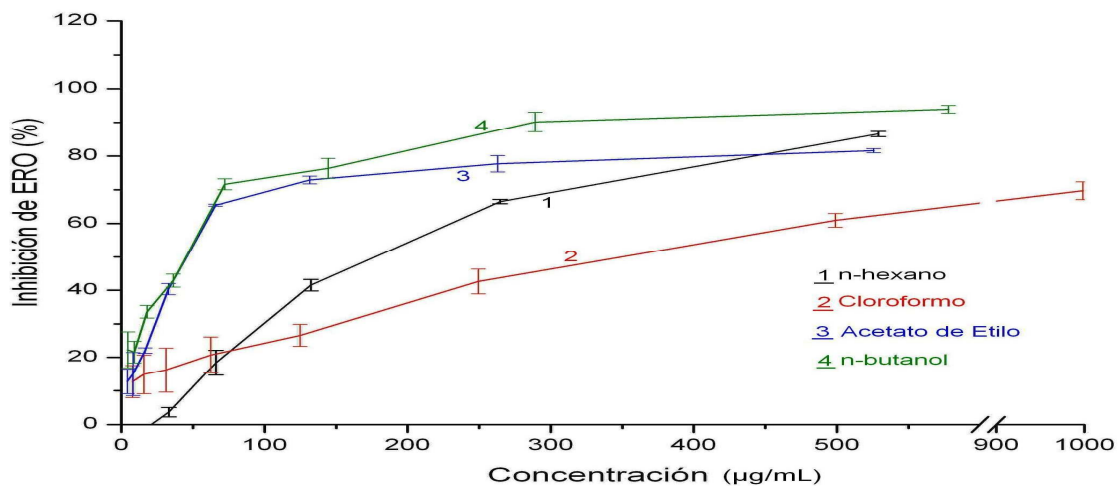
(B)



(C)

Figura 16. Inhibición de la producción de ERO por el extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L., sus fracciones y la quercetina en polimorfonucleares estimuladas con PMA (A y B). Valores estimados de las IC₅₀, y matriz de correlación entre las variables químicas y farmacológicas (C).

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$).



(C) Figura 17. Inhibición de la producción de ERO por el extracto fluido en etanol 70% de hojas de *Tamarindus indica* L., sus fracciones y la quercetina en monocitos estimulados con PMA (A y B). Valores estimados de las IC₅₀, y matriz de correlación entre las variables químicas y farmacológicas (C). Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey (HSD), p < 0,05). * Correlación significativa α = 0,05

Al ser la fracción de n-hexano, parte integrante del EF 70%, este incremento de actividad tiene su repercusión directa sobre el extracto fluido, reflejándose en la disminución marcada de las IC₅₀ estimadas. En monocitos, el extracto fluido representó la muestra con mayor actividad antioxidante, a niveles incluso similares a los obtenidos para la sustancia de referencia (quercetina). Los resultados evidenciaron que la acción antioxidante de una sustancia está influenciada por las condiciones en las que se evalúa la actividad, en particular cuando las determinaciones se realizan en células vivas, donde los procesos de transporte constituyen un elemento de extrema importancia, al actuar las membranas como una barrera selectiva. Además, se corrobora experimentalmente el hecho de que los extractos totales, donde se incluye la diversidad química producida por las plantas (el fitocomplejo), ofrecen una mayor perspectiva de aplicación clínica que aquellos extractos o fracciones que incluyen un limitado número de sustancias con actividad acentuada.

Las figuras 16 y 17 también muestran las matrices de correlación estimadas entre la concentración de flavonoides y fenoles totales, *versus* la inhibición de ERO en células polimorfonucleares y monocitos. Los resultados reflejan la existencia de correlación entre estas variables y la actividad medida; resultando significativa sólo para la variable concentración de flavonoides y la IC₅₀ determinada en monocitos.

En los diferentes ensayos antioxidantes ninguna fracción en particular resultó superior al resto. La distribución de la actividad entre las diferentes fracciones, la evidencia de que el extracto fluido fuese en varios de los ensayos el más activo, y la baja significación estadística en las matrices de correlación estimadas, señalan que la actividad antioxidante de las hojas del tamarindo, es resultado de una acción sinérgica de varios de los componentes del fitocomplejo, y no un efecto mediado exclusivamente por fenoles y flavonoides, como ha sido sugerido con anterioridad.

III.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de las hojas de *Tamarindus indica* L., y del extracto fluido al 70 % y sus fracciones

Tradicionalmente, la actividad antimicrobiana del tamarindo ha sido atribuida a los fenoles y flavonoides producidos por la especie^{10,14,64}; sin embargo, a la luz de los resultados fitoquímicos obtenidos en el presente trabajo, resulta difícil aceptar que esta actividad esté asociada exclusivamente a estos metabolitos. Para dar respuesta a dicha interrogante se prepararon un total de nueve extractos, cinco extractos primarios o totales y cuatro secundarios. Se definieron como extractos primarios o totales a aquellos obtenidos a partir

de la extracción directa de las hojas del tamarindo (**M₁-M₅**), y como secundarios o fraccionados (**M₆-M₉**) los que fueron obtenidos por fraccionamiento de un extracto primario. Los extractos **M₁** y **M₂** provienen de decocciones de las hojas frescas y secas, respectivamente; mientras que **M₃** y **M₄** corresponden a extractos fluidos en etanol al 30 y al 70%. Por último, el **M₅** es un extracto de compuestos volátiles extraídos por hidrodestilación. Por su parte, los extractos secundarios (**M₆-M₉**) son aquellas fracciones de n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol producto del fraccionamiento químico del extracto **M₄**.

III.5.1 Pruebas de susceptibilidad microbiana. Acción antimicrobiana directa

III.5.1.1 Ensayo de difusión en disco

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos del tamarindo empleando el método de difusión en disco se presentan en la tabla XXII. En general, se encontró que los extractos provenientes de las hojas del tamarindo son más efectivos frente a las bacterias Gram positivas que ante las bacterias Gram negativas, siendo *B. subtilis* y *E. coli* las de mayor susceptibilidad ante los extractos evaluados. El extracto más activo fue el de aceites volátiles (**M₅**), mostrándose efectivo frente a los mismos microorganismos susceptibles a la sustancia natural de referencia (aceite esencial de *Thymus vulgaris*). Los extractos en cuya preparación se empleó agua como solvente, presentaron actividad sobre un número limitado de microorganismos. El extracto de menor actividad fue la decocción de las hojas frescas (**M₁**).

La bacteria *S. typhimurium* sólo resultó sensible a los extractos (**M₂** y **M₅**), mientras que el microorganismo más resistente fue *Candida albicans*.

Algunas de estas observaciones anteriores han sido descritas en investigaciones precedentes. Los ensayos realizados en hojas y corteza de la planta, revelan una pobre actividad de los extractos acuosos para ambos órganos. Otra evidencia coincidente, es la ineffectividad de los extractos de las hojas del tamarindo frente a *Candida albicans*⁶⁴.

Resultó llamativa la pobre actividad de los extractos procedentes de las hojas frescas (**M₁**) si la comparamos con la actividad del extracto de igual preparación, pero a partir de hojas secas (**M₂**). Estos resultados experimentales fundamentan las ventajas que ofrece el secado de la droga para la facilitación de los procesos extractivos, y la decisión de preparar los extractos experimentales a partir de un material vegetal seco. Además, este hecho podría servir como evidencia experimental de las razones por las cuales en Cuba, en contraste

Tabla XXII. Prueba de susceptibilidad microbiana frente a los diferentes extractos de hojas de *Tamarindus indica* L.

Cepas	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	TyO	Gt	Kt	Sol
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>E. coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. typhimurium</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-

La prueba se realizó por el ensayo de difusión en disco (Kirby-Bauer).

M₁→ Decocción de hojas frescas M₂→ Decocción de hojas secas M₃→ Extracto Fluido Etanol 30%

M₄→ Extracto Fluido Etanol 70% M₅→ Extracto aceites esenciales M₆→ Fracción de n-hexano

M₇→ Fracción de cloroformo M₈→ Fracción de acetato de etilo M₈→ Fracción de n-butanol

TyO→ Aceite esencial de *Thymus vulgaris* Gt→ Gentamicina Kt→ Ketoconazol

Sol. → Control negativo (Solvente)

con otras partes del hemisferio y del mundo, el tamarindo es poco utilizado para combatir enfermedades infecciosas por parte de la población, pues en nuestro país la droga fresca es la que comúnmente se emplea.

Por otro lado, al analizar los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles y flavonoides totales (Tabla IV) se coincide con lo planteado por otros autores en cuanto a la relación de la actividad antimicrobiana con la producción y concentración de estos compuestos, pues los extractos con mayor concentración de dichos metabolitos fueron los más activos^{14,64}. Sin embargo, la actividad antimicrobiana del extracto de aceites volátiles del tamarindo, reveló una vez más que este tipo de compuesto es activo contra numerosas cepas microbianas, y que su presencia en las hojas aporta significativamente a la actividad evaluada.

El aceite volátil del tamarindo presenta dos compuestos mayoritarios bien definidos: el benzoato de bencilo y el limoneno (Tabla II). Estas dos sustancias no han sido informadas con frecuencia como antibacterianas; sin embargo, a otros compuestos como el α y el β -pineno, el linalool y el nerol se les atribuye una importante actividad. En particular, el linalool y el antranilato de linalool, que representan casi un 6% del aceite esencial del tamarindo, muestran un perfil antimicrobiano similar al del extracto **M₅** del presente estudio¹⁵⁶.

Independientemente de estos resultados que identifican al extracto **M₅** como el más activo, el cual no presenta fenoles ni flavonoides, el análisis de los extractos secundarios ofrece nuevos puntos de vista con respecto a los establecidos por otros autores. Estos extractos secundarios fueron obtenidos precisamente a partir del extracto primario con mayor concentración de fenoles y flavonoides (extracto fluido en etanol al 70%, **M₄**).

Mientras que para las bacterias Gram (+) existen fracciones activas y fracciones inactivas, en las bacterias Gram (-) sensibles no existe tal especificidad (Tabla XXII). En el caso particular de *Staphylococcus aureus*, la actividad se observó en las fracciones más apolares (**M₆** y **M₇**). En la fracción de n-hexano (**M₆**) la concentración de fenoles totales fue muy baja, y no se detectaron compuestos flavonólicos (Tabla XIX); sin embargo, se le determinaron cantidades importantes de ácidos grasos (Tabla XVII), al igual que a la fracción **M₇**.

La marcada susceptibilidad de esta bacteria ante los ácidos grasos ha sido documentada con anterioridad²⁰², y algunos autores, incluso, aseveran que los ácidos grasos constituyen el principal mecanismo de defensa con que cuenta la piel humana frente a *S. aureus*²⁰³.

Si consideramos de manera integral, la escasa o nula concentración de fenoles y flavonoides en estas fracciones, la elevada concentración de ácidos grasos, y lo referido respecto a la susceptibilidad de esta bacteria a estos compuestos, resulta lógico vincular los ácidos grasos con la actividad experimental demostrada frente a *S. aureus* por estas fracciones. Asimismo, es posible reconocer que esta bacteria no es sensible o es poco sensible a los fenoles y a los flavonoides, pues las fracciones con mayor concentración de estos metabolitos resultaron inactivas (**M₈** y **M₉**).

De manera contraria, *Bacillus subtilis* resultó sensible ante las fracciones que presentaron mayores concentraciones de fenoles y flavonoides totales, y sólo la fracción **M₆** resultó inactiva ante ella, señalando una posible incidencia de estos compuestos en la actividad antimicrobiana. Para el resto de las bacterias, no existe una clara influencia de los metabolitos determinados en las hojas del tamarindo con relación a la actividad antimicrobiana evaluada.

III.5.1.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

La determinación de las CMI y CMB a los extractos evaluados se llevó a cabo por el método de microdilución en caldo, y se exploraron ocho niveles de concentración. Los resultados de estos experimentos se presentan en la tabla XXIII para los extractos primarios y en la tabla XXIV para los secundarios.

Para las dos soluciones hidroalcohólicas, las CMI resultaron iguales frente a la bacteria *S. aureus*; sin embargo, las CMB difieren, favoreciendo al extracto preparado con etanol al 70 %. Anteriormente se refirió la posible influencia de los ácidos grasos sobre dicha bacteria, y este comportamiento aporta una evidencia experimental adicional, pues como se conoce, los ácidos grasos son solubles en sistemas apolares e insolubles en solventes polares. Dado que el etanol al 70 % presenta una menor polaridad con relación al etanol al 30%, puede extraer en mayor grado los ácidos grasos producidos por el tamarindo. Sin embargo, las fracciones que emplearon agua como solvente (**M₁** y **M₂**) también resultaron activas y en ellas no se extraen los ácidos grasos. Ello nos permite suponer que la actividad ante esta bacteria depende de dos tipos de metabolitos diferentes: uno de naturaleza apolar (los ácidos grasos) y el otro de naturaleza muy polar, que no se logra extraer en el extracto fluido en etanol al 70%.

Tabla XXIII. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) estimada para los extractos primarios de hojas de *Tamarindus indica* L.

Cepas	M ₁ (g/mL)		M ₂ (g/mL)		M ₃ (g/mL)		M ₄ (g/mL)		M ₅ (µL)	
	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI
<i>S. aureus</i>	-	>0,15	>0,15	0,075	1,5	0,094	0,75	0,094	20,0	2,50
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	>1,5	0,094	0,75	0,094	10,0	1,25
<i>B. subtilis</i>	0,15	0,019	>0,15	0,038	1,5	0,187	1,5	0,187	10,0	0,62
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	1,5	0,187	1,5	0,187	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	>0,15	0,075	1,5	0,187	1,5	0,187	10,0	1,25
<i>S. typhimurium</i>	-	-	>0,15	0,075	-	-	-	1,5	10,0	1,25
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	40,0	10,0

Las CMI y CMB se determinaron en los extractos que resultaron activos en el ensayo de difusión en disco.

Tabla XXIV. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) estimada para los extractos secundarios de hojas de *Tamarindus indica* L.

Cepas	M ₄ (g/mL)		M ₆ (g/mL)		M ₇ (g/mL).		M ₈ (g/mL)		M ₉ (g/mL)	
	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI
<i>S. aureus</i>	0,75	0,094	1,5	0,38	1,5	0,38	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	0,75	0,047	-	-	-	-	1,5	0,75	1,5	0,75
<i>B. subtilis</i>	0,75	0,094	-	-	>1,5	0,38	>1,5	0,38	0,75	0,19
<i>P. aeruginosa</i>	1,5	0,187	>1,5	0,75	>1,5	0,75	>1,5	0,38	>1,5	0,38
<i>E. coli</i>	1,5	0,187	1,5	0,75	>1,5	0,75	>1,5	0,75	1,5	0,75
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Las CMI y CMB se determinaron en los extractos que resultaron activos en el ensayo de difusión en disco.

Por su parte, la tabla XXIV muestra las CMI y CMB correspondientes a los extractos secundarios de hojas de tamarindo. Se destaca el hecho de que ninguna de las fracciones en las cepas evaluadas manifestó actividad a valores de concentración inferiores a las evidenciadas por el extracto fluido de partida. Desde el punto de vista químico, esto resulta lógico, pues ninguna fracción logra ser la única activa frente a los microorganismos evaluados. Ello significa que los metabolitos activos se distribuyeron entre las fracciones (ninguna es químicamente igual). En la actividad antimicrobiana, también es válido el hecho de que el empleo del extracto total (extracto fluido en etanol 70 %) resulta de mayor utilidad en comparación con fracciones activas por separado.

III.5.1.3 Correlación de la actividad con la composición de polifenoles y flavonoides

Si se parte del supuesto de que son los fenoles y/o flavonoides los metabolitos responsables de la actividad, entonces es de esperar que los diferentes extractos en análisis presenten valores similares de estos metabolitos en el nivel de dilución que se define como activo (CMI o CMB) y por ende, bajos valores del coeficiente de variación (CV). Los resultados estimados para estos coeficientes de variación se muestran en la tabla XXV.

Se encontraron bajos valores de CV para la concentración de fenoles en los ensayos de CMI y CMB frente a *Bacillus subtilis*, máxime cuando para su estimación se tuvieron en cuenta valores procedentes de al menos tres extractos. Esto implica la aceptación del hecho de que la actividad antimicrobiana sobre esta bacteria está relacionada con la concentración de fenoles totales que es capaz de extraer el solvente, lo cual se reflejó en las dos expresiones de la actividad evaluada (CMI y CMB). Otro factor a considerar es que en el análisis de los extractos fraccionados, la actividad frente a esta cepa la presentan los tres extractos que exhibieron mayor concentración de fenoles (**M₇**, **M₈** y **M₉**).

Por otra parte, en la tabla XXV se aprecian los altos coeficientes de variación obtenidos en todos los casos para la variable concentración de flavonoides totales, sugiriendo que la actividad antimicrobiana de las hojas del tamarindo no depende de su concentración, al menos en las cepas empleadas. Estas observaciones son válidas para la concentración total del metabolito evaluado, pues no se descarta la participación de algún flavonoide y/o fenol en particular, que aporte a la actividad frente a ciertos microorganismos.

Es bien conocida la actividad antimicrobiana que fenoles y flavonoides confieren a extractos vegetales. Probablemente, sea éste uno de los tópicos más referenciados en las publicaciones en el campo de las plantas medicinales, por lo que los resultados aquí

Tabla XXV. Coeficientes de variación estimados para la concentración de fenoles y flavonoides totales presentes en las CMI y CMB de los extractos activos

<i>Cepas</i>	CMB		CMI	
	CV [Fenoles]	CV [Flavonoides]	CV [Fenoles]	CV [Flavonoides]
<i>Staphylococcus aureus</i>	39,90	35,49	153,16**	95,81**
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	7,95	76,20
<i>Bacillus subtilis</i>	11,04*	116,01*	11,99*	137,37**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,99	76,24	7,99	76,15
<i>Escherichia coli</i>	-	-	50,81*	107,32*
<i>Salmonellas typhimurium</i>	-	-	82,30	139,24

* obtenido a partir de valores de tres extractos

** obtenido a partir de valores de los cuatro extractos

CV→ Coeficiente de variación

presentados podrían introducir nuevos enfoques. La posición taxonómica de *Tamarindus indica* L., brinda algunos elementos que justifican los resultados experimentales obtenidos. En el reino *Plantae*, existen bien definidas dos estrategias defensivas. Las plantas pertenecientes a los niveles evolutivos bajos (Subclases *Magnolidae*, *Hamamelidae*, *Cariophyllidae* y *Dilleniidae*), basan su sistema defensivo contra patógenos en la síntesis y acumulación de sustancias antimicrobianas (polifenoles como lignanos, neolignanos, taninos, proantocianidinas y algunos tipos de alcaloides), las cuales estarán listas para ser empleadas cuando ocurra el ataque²⁷⁴. Este sistema defensivo se conoce como “defensa cuantitativa o defensa estática” de la planta, pues estos productos se concentran en cada uno de los órganos a defender. Para lograr esta bioacumulación, las especies pertenecientes a estos niveles taxonómicos, necesitan dedicar cantidades importantes de energía y precursores que le permitan mantener éstos altos niveles de antimicrobianos en la planta. Por otra parte, las especies pertenecientes al nivel evolutivo más desarrollado (Subclase *Asteraceae*) mantienen solamente en sus órganos un nivel basal de sustancias antimicrobianas, las cuales por lo general cumplen, además, otras funciones²⁷⁵. En caso de que ocurra el ataque de un patógeno, la planta sintetizará y movilizará rápidamente sustancias de actividad antimicrobiana intrínseca muy elevada (Poliacetilenos, lactonas sesquiterpénicas, aceites esenciales, y algunos tipos de saponinas) que les permiten contrarrestar el ataque^{276,277}. Este tipo de defensa se conoce como “defensa móvil o defensa cualitativa”, pues se basa en la rápida síntesis y movilización de sustancias muy activas. De esta manera, racionalizan la energía y los recursos, destinándolos a otras funciones importantes en el desarrollo de la planta²⁷⁸.

El *Tamarindus indica* L., se encuentra ubicado en la parte media-alta del árbol filogenético (Subclase *Rosidae*)²¹. En ella confluyen remanentes de la defensa cuantitativa, y aparecen los niveles iniciales de la defensa cualitativa. El análisis químico del extracto fluido en etanol al 70 % reveló lo anteriormente expuesto. En los estudios de caracterización química, se identificaron poliacetilenos (defensa móvil), aceites esenciales, ácidos grasos, flavonoides (compuestos con actividad antimicrobiana que cumplen otras funciones en la planta, característicos de la defensa móvil), pero también polifenoles que a elevadas concentraciones actúan como antimicrobianos (defensa estática, como ocurre frente a *B. subtilis*).

De tal forma, el papel protagónico asignado por la bibliografía precedente a la elevada producción de fenoles y flavonoides en la actividad antimicrobiana de las hojas del

tamarindo es cuestionable ante la coincidencia de los resultados experimentales presentados en este trabajo (composición química y actividad antimicrobiana evaluada) con los aspectos taxonómicos de la planta. En sentido general, se puede aseverar que: bajo las evidencias experimentales presentadas, la actividad antimicrobiana de las hojas del tamarindo no depende exclusivamente de la concentración de los fenoles totales, menos aún de los flavonoides totales, sino de un conjunto de metabolitos como los aceites esenciales y los ácidos grasos, que también contribuyen a esta actividad. La hipótesis de que la utilización de un extracto total de la planta ofrece mayores perspectivas farmacológicas que el empleo de fracciones por separado, que contengan sustancias élites, prevalece nuevamente.

III.5.2 Actividad in vitro sobre el sistema del complemento. Acción antimicrobiana indirecta

La actividad antimicrobiana de un extracto no sólo puede deberse a la acción directa de sus componentes sobre el microorganismo, sino también por activación del sistema inmunológico humano, el cual eliminará finalmente el patógeno. Este es un mecanismo indirecto de acción antimicrobiana, pero en muchas ocasiones más efectivo y menos tóxico que la acción directa.

El sistema del complemento juega un papel central en el sistema inmune innato, participando en la defensa ante el ataque de patógenos invasores y en la eliminación de células apoptóticas y complejos inmunes de la sangre y otros tejidos^{279,280}. Está compuesto por más de 30 proteínas y glicoproteínas plasmáticas solubles o unidas a receptores de membrana que tienen una función inflamatoria e inmunoreguladora²⁸¹. La activación del complemento ocurre a través de tres vías fundamentales: la vía clásica (mediada por el complejo C₁ que se une directamente al patógeno o por unión a los complejos antígeno-anticuerpo), la vía de la lectina (se une a los carbohidratos de la superficie del patógeno) y la vía alternativa (con un mecanismo independiente de anticuerpos). Estas tres vías convergen en un punto central: la proteína C₃²⁸². Independientemente de cuál sea la vía activada, este mecanismo de defensa ante el ataque de patógenos, resulta de la activación en el huésped de toda una cascada enzimática y celular, resultando por ende, una vía indirecta de actividad antimicrobiana.

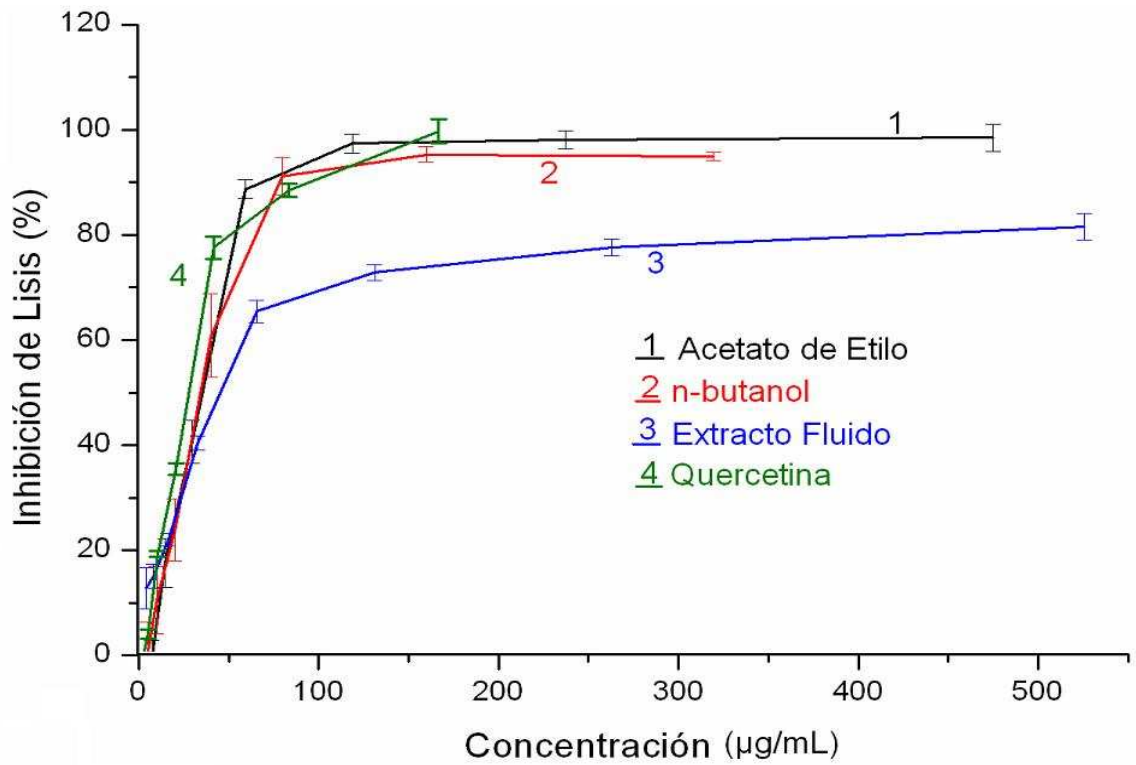
El ensayo de inhibición de la activación del sistema del complemento (vía clásica) se realizó al extracto fluido en etanol al 70% y a sus fracciones. Tanto el extracto fluido como

las fracciones de acetato de etilo y n-butanol inhibieron la lisis de los eritrocitos de manera dosis dependiente. Sin embargo, las fracciones de n-hexano y cloroformo resultaron inactivas. Las IC_{50} estimadas fueron 31,05 $\mu\text{g/mL}$, 33,65 $\mu\text{g/mL}$ y 55,8 $\mu\text{g/mL}$ para las fracciones de n-butanol, acetato de etilo y el extracto fluido, respectivamente; mientras que para la quercetina (sustancia de referencia) fue de 27,15 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 18).

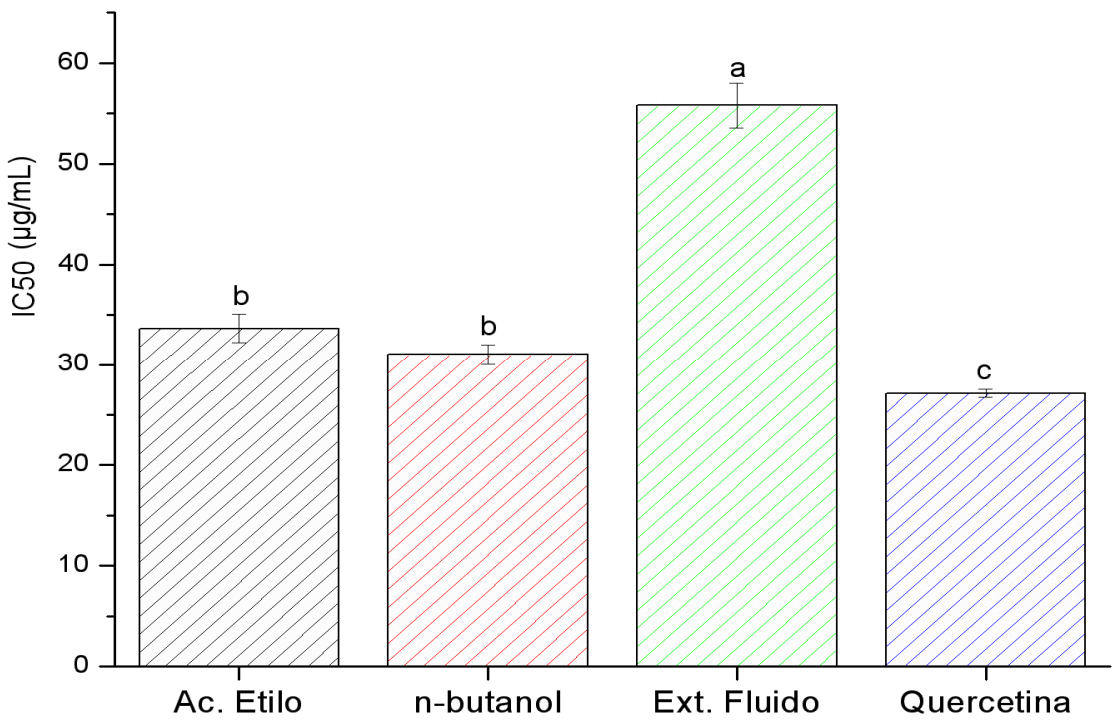
Estos resultados revelan que el extracto fluido y sus fracciones, en vez de ejercer un efecto estimulador sobre el sistema del complemento (vía clásica), inhiben su activación. Esta inhibición resulta para el caso de la fracción de n-butanol casi tan potente como la obtenida para la quercetina. Desde un punto de vista químico, la fracción de n-butanol es la que mayor concentración de polifenoles y flavonoides presenta, seguido por la de acetato de etilo. Estos compuestos se detectaron en muy bajos niveles en las otras dos fracciones que permanecieron inactivas (n-hexano y cloroformo) (Tabla XIX), por lo que el papel de estos compuestos parece determinante en la actividad anticomplementaria evaluada. Este comportamiento de compuestos polifenólicos y flavonólicos ha sido referido para otros extractos de plantas^{283,284}. Se ha informado que los grupos hidroxilo de los fenoles y flavonoides pueden actuar como aceptores para las enzimas C3b y C4b. Esta acción ha sido descrita además, en polímeros hidroxilados, como la celulosa y el dextrano no modificado²⁸⁵, así como en el zymozano²⁸⁶, que interaccionan con el sitio lábil del C3b naciente, actuando así como inhibidores de la formación de la convertasa²⁸⁷.

Por otro lado, en el ensayo de la activación del sistema del complemento (vía alternativa), el extracto fluido y sus fracciones no lograron modificar los niveles de hemólisis a las concentraciones evaluadas (las mismas que las empleadas para la vía clásica), resultando inactivas (datos no mostrados).

La actividad del tamarindo sobre el sistema de complemento ha sido poco estudiada. En la literatura consultada sólo se encontró un informe relativo a un extracto hidroalcohólico del fruto, en el cual se describió un comportamiento divergente entre los resultados, mostrando efectos opuestos cuando fueron consideradas las vías clásica y alternativa (acción estimulante para la vía clásica e inhibitoria para la vía alternativa). Se informó también, una acción dependiente de la concentración sobre la actividad lítica *in vitro*, no observada en los experimentos *in vivo*. Esta contradicción ha sido explicada en función de la complejidad química de los extractos, en los que las acciones de las diferentes sustancias en diversos sitios de la cascada de activación del complemento pudieran resultar antagónicas²⁸⁸.



(A)



(B)

Figura 18. Inhibición del sistema del complemento (vía clásica) por el extracto fluido en etanol 70% de hojas de *Tamarindus indica* L., sus fracciones de acetato de etilo y n-butanol, y la quercetina (A). Valores estimados de las IC₅₀ (B).

Medias con letras iguales no difieren (ANOVA, Tukey (HSD), $p < 0.05$).

Aunque en órganos diferentes, estas evidencias experimentales permiten suponer que, la diversidad y complejidad del fitocomplejo del tamarindo actúa de manera simultánea y opuesta en diversos puntos de la cascada de activación del sistema del complemento.

A la luz de estos resultados, se puede afirmar que el extracto fluido de hojas de tamarindo y sus fracciones, no aportan a la actividad antimicrobiana por activación del sistema del complemento (vía indirecta). Por ello, la acción antimicrobiana de las hojas del tamarindo debe ser valorada como resultado de la acción citotóxica directa del conjunto de metabolitos que producen, cuyas influencias fueron explicadas en el acápite anterior.

No obstante, a pesar de no tener influencia sobre la actividad antimicrobiana, la acción anticomplementaria (vía clásica) mostrada por los extractos del tamarindo, unida a las evidencias de inactivación del óxido nítrico, permiten considerarlos como posibles agentes antiinflamatorios, potencialmente efectivos contra diversas patologías, entre ellas, las autoinmunes. La potencial acción farmacológica sería el resultado de una mezcla de diferentes sustancias que ejercen su efecto mediante una compleja red de mecanismos de acción. A estas evidencias experimentales se le adiciona además, el hecho de que las hojas del tamarindo son altas productoras de flavonoides, compuestos reconocidos como agentes antiinflamatorios^{289,290} al ser potentes inhibidores de la ciclo-oxigenasa 2 (Cox-2)²⁹¹. En consecuencia, el estudio de la modulación de la relación balance oxidativo-respuesta inflamatoria por formulaciones de las hojas de *Tamarindus indica* L., introduciría nuevas perspectivas con relación a las potencialidades terapéuticas de la planta.

El empleo de las hojas de *Tamarindus indica* L. por parte de la población cubana permanece aún en un nivel empírico. El presente trabajo constituye una contribución al estudio de su composición fitoquímica y de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Se demuestra que ambas actividades están sustentadas por la acción de varios tipos de metabolitos y no exclusivamente por los fenoles y flavonoides como se había sugerido con anterioridad. La diversidad química de los metabolitos presentes, y su variabilidad estacional requiere continuar profundizando en el papel, a nivel molecular, que éstos aportan a las actividades etnobotánicas atribuidas a la planta, lo que permitirá además de fundamentar el uso etnomedicinal que tradicionalmente ha recibido, establecer las premisas científicas para su introducción como alternativa terapéutica en el sistema de salud cubano.

CONCLUSIONES

1. El estudio fitoquímico de las hojas de *Tamarindus indica* L., reveló la existencia de veintiún compuestos orgánicos estructuralmente diversos, y de elementos inorgánicos, que constituyen un primer informe para la especie y/o órgano en estudio. Su presencia y la de otros compuestos químicos identificados, como flavonoides y ácidos grasos, permite relacionar el fitocomplejo en cuestión con la potencial actividad antioxidante y antimicrobiana referida por la población en el empleo etnobotánico de la especie.
2. La evaluación de la influencia de las variables concentración de etanol y tiempo de humectación en el proceso de extracción de los metabolitos activos de las hojas de *Tamarindus indica* L., permitió diseñar un método sencillo, económico y eficiente, que combina la utilización de etanol al 70 % como solvente y un tiempo de humectación de 90 minutos, para la obtención de una forma farmacéutica con elevadas concentraciones de fenoles y flavonoides totales, sólidos totales, y una fracción significativa de minerales.
3. La caracterización del extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L. y sus fracciones, permitió comprobar la existencia de una amplia diversidad fitoquímica, en la que se destaca la presencia de compuestos mayoritarios como ácidos grasos, sustancias flavonólicas y minerales, cuyas concentraciones varían en las distintas fases del ciclo vegetativo-floración-fructificación. La mayor acumulación de metabolitos se observó en la etapa de fructificación.
4. El extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L. mostró una buena actividad antioxidante en los modelos *in vitro* ensayados, en varios de ellos a concentraciones inferiores a sus fracciones. La evaluación de la inhibición de la producción de óxido nítrico evidenció un comportamiento diferente al resto de los ensayos, confirmando que la capacidad antioxidante, no depende exclusivamente de la concentración de fenoles y flavonoides totales.
5. La actividad antimicrobiana de las hojas de *Tamarindus indica* L. se asocia a la acción directa de los componentes presentes en los extractos y no a la estimulación del sistema del complemento. La fracción más activa resultó ser la de aceites volátiles, mientras que los extractos de menor efectividad correspondieron a aquellos que emplean la droga fresca y métodos domésticos para su elaboración.

RECOMENDACIONES

1. Extender los estudios de la actividad antioxidante de hojas de *Tamarindus indica* L. a modelos *in vivo*, en los que se demuestre además, la actividad hepatoprotectora de los extractos, así como investigar los mecanismos moleculares mediante los cuales ejerce su acción.
2. Evaluar el posible efecto antiinflamatorio de hojas de *Tamarindus indica* L. sugerido de la combinación de los efectos inhibitorios sobre el óxido nítrico y de la acción inhibitoria del sistema de complemento.
3. Introducir el extracto de hojas de *Tamarindus indica* L. como terapia alternativa al tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo en la atención primaria de salud.
4. Diseñar formulaciones farmacéuticas sólidas que permitan la eliminación del solvente alcohólico y la acidez del extracto, aumentando así las posibilidades de introducción en el mercado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Bueso C.E. Tropical and Subtropical Fruits., Editorial AVI Publishing, Westport, Conn. USA ; 1980: 375.
- 2 Mishra A, Malhotra AV. Tamarind xyloglucan: a polysaccharide with versatile application potential. *J. Mater. Chem.* 2009; 19(45): 8528-8536.
- 3 "Tamarind xyloglucan." USPTO. Revisado 14 de mayo 2005. Disponible en URL: <http://www.uspto.gov/main/patents.htm>
- 4 El-Siddig K, Gunasena HPM, Prasad BA, Pushpakumara DK, Ramana KVR, Vijayanand P, et al. Tamarind, *Tamarindus indica*. Southampton Centre for Underutilised Crops, Southampton, United Kingdom 2006: 1.
- 5 Fuentes, R. V.; Granda, M.M. Plantas Medicinales, Medicina tradicional en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia.* 1989; 23(1-2): 99-155.
- 6 Roig, J.T. Plantas Medicinales, Aromáticas y Venenosas de Cuba. Ed. científico-técnica. La Habana. 1974: 346-347
- 7 Barreras N, Achong M, Cuesta E, Cruz MA. Uso de plantas medicinales en dos municipios habaneros. *Revista Cubana de Farmacia.* 1989; 23(3): 292-300.
- 8 "Tamarindus indica." Mothernature. Revisado martes 15 de febrero 2011. Disponible en URL: <http://www.mothernature.com/Library/Bookshelf/Books/41/80.cfm>
- 9 Shankar EM, Subhadra N. and Usha AR. The effect of methanolic extract of *Tamarindus indica* Linn. on the growth of clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Indian J. Med. Res.* 2005; 122: 525-528.
- 10 Meléndez PA, Carriles VA. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine.* 2006; 13: 272-276.
- 11 Lans C. Comparison of plants used for skin and stomach problems in Trinidad and Tobago with Asian ethnomedicine. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2007; 3: 102-109.
- 12 Boizán ML. Efecto hepatoprotector de una decocción de hojas de *Tamarindus indica* L. Tesis en opción al Grado de Especialista en Farmacología. Instituto Superior de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba, Cuba. 1995: 47-58.
- 13 Dehesa MA, Escalona-Arranz JC, Padilla S. Evaluación Preclínica de Extractos Flavonólicos de las Hojas de *Tamarindus indica* L. *Etnomedicina;* 1995; 1: 157-168.
- 14 Dehesa MA. Estudio Farmacognóstico y preclínico del extracto fluido en etanol al 80% de las hojas de la especie *Tamarindus indica* L. Tesis en Opción al Título de Doctor en Ciencias Farmacéuticas. Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Ciudad de la Habana 2005: 53-82.
- 15 MINSAP. Guías Metodológicas para la investigación en Plantas Medicinales. 1997: 20-25.
- 16 World Health Organization (WHO). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine (Document WHO/EDM/TRM/2000.1). WHO. Génova, Italia. 2000: 184.
- 17 World Health Organization (WHO). Chemistry-Manufacturing-Control (CMC) considerations for herbal products. Information needed to support Clinical Trials of herbal products. WHO. Génova, Italia. 2005a: 16.

-
- 18 World Health Organization (WHO). National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines. Report of a WHO global survey. WHO. Génova, Italia. 2005b: 156.
 - 19 World Health Organization (WHO). WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Génova, Italia. 2007: 118.
 - 20 Cecchini T. Enciclopedia de las Hierbas y Plantas Medicinales. Ed. De Vecchi, Italia: 1983: 441-442.
 - 21 Angiosperm Phylogeny Group (APG). An update of Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Bot. J. Linnean Soc. 2003; 141: 399-436.
 - 22 Shankaracharya NB. Tamarind - Chemistry, technology and uses - A critical appraisal. *J. Food Sci. Tech.* 1998; 35(3): 193-208.
 - 23 Leakey R. Potential for Novel Food Products from Agroforestry Trees: A Review. *Food Chem.* 1999; 66: 1-14.
 - 24 Hulse J. Flavours, spices and edible gums: opportunities for integrated agroforestry systems, Leakey RRB, Temu AB, Melnyk M, Vantomme P.(eds), FAO, Rome, Italy; 1996: 86-96.
 - 25 Gueye M, Diouf M. Traditional leafy vegetables in senegal: diversity and medicinal uses. *Afr. J. Trad. Complem. Altern. Med.* 2007; 4(4): 469-75.
 - 26 Atawodi SE, Spiegelhalder B. Indigenous knowledge system for treatment of trypanosomiasis in Kaduna state of Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 79(2): 279-282.
 - 27 Adama L, Fulbert LL, Pierre GI, Jean-Baptiste N. Traditional medicine in kidney diseases in Burkina Faso. *Nephrologie & thérapeutique.* 2010; 6(1): 35-39.
 - 28 Havinga RM, Hartl A, Putscher J, Prehler S, Buchmann C, Vogl CR. *Tamarindus indica* L. (Fabaceae): patterns of use in traditional African medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2010; 127(3): 573-88.
 - 29 De Caluwe E, Halamova K, Van Damme P. Tamarind (*Tamarindus indica* L.): a review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Afr. Nat. Plant Prod.* 2009: 85-110.
 - 30 Martindale W. Martindale: The extrapharmacopeia, 30 Edición. Editorial Pharm Press. London, United Kingdom; 1993: 909-910.
 - 31 Petersen F, Amstutz R. (Eds). Natural Compounds as Drugs Volume I: in Progress in Drug Research, Vol. 65. Birkhäuser Verlag, Basilea, Suiza; 2008: 119-132.
 - 32 Kaufmann B, Christen P. Recent extraction techniques for natural products. Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem. Analysis.* 2002; 13: 105-113.
 - 33 Miranda Martínez M, Cuéllar Cuéllar A. Farmacognosia y Productos Naturales. Editorial Félix Varela. Ciudad de la Habana, Cuba, 2001: 147-170.
 - 34 Sarker SD, Latif Z, Gray A. (Eds). Natural Products Isolation. Second Edition. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA, 2006: 7-19.
 - 35 Zhang L, Demain AL. (Eds). Natural products: drug discovery and therapeutic medicine. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA; 2005: 3-17.
 - 36 Lewis J. Synthesis of tartaric acid in the Tamarind leaves. *Curr. Sci. India.* 1959; 28: 152-153.
 - 37 Balasubramanian R, Gopalswamy A. Preparation of tartaric acid from tamarind leaves. *Madras Agr. J.* 1973; 6(8): 1011-1012.

-
- 38 Robineau L, Weniger B. Seminario TRAMIL 7 Antioquia, Colombia. 1995: 619-620.
- 39 Bathia UK, Gupta SR, Shishadi TR. C-glycosides from *Tamarindus indica* L leaves. *Phytochemistry*. 1966; 5(1): 177-181.
- 40 Chitra A. Post Infectional Changes in Flavonoids and Phenolic Acids by Fungal Pathogens in *Tamarindus indica* L. *Res. J. Chem. Envirom*. 1999; 3(4): 34-46.
- 41 Dehesa M, Jauregui O, Cañigüeral S. Estudio por HPLC-MS/MS de compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Tamarindus indica* L. *Fitoterapia*. 2006; 6: 59-72.
- 42 Lewis YS, Neelakantan S. The chemistry, biochemistry and technology of tamarind. *J. Sci. Ind. Res*. 1964; 23: 204.
- 43 Anon E. *Tamarindus indica* L. In The Wealth of India (Raw Materials Series) Vol. X: 144-122. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, 1976.
- 44 Kaitho RJ, Nsahlai IV, Williams BA, Umunna NN, Tamminga S, van Bruchem J. Relationships between preference, rumen degradability, gas production and chemical properties of browses. *Agrofor. Syst*. 1988; 39: 129-144.
- 45 Bhattacharya S, Bal S, Mukherjee RK. Functional and nutritional properties of (*Tamarindus indica*) kernal protein. *Food Chem*. 1994; 49: 1-9.
- 46 Siddhuraju P, Vijayakumari K, Janardhanan K. Nutritional and antinutritional properties of the underexploited legumes *Cassia laevigata* Willd and *Tamarindus indica* L. *J. Food Compos. Anal*. 1995. 8: 351-362.
- 47 Sridhar R, Lakshminarayana G. Lipid Classes, Fatty Acids, and Tocopherols of Leaves of Six Edible Plant Species. *J. Agric. Food Chem*. 1993; 41: 61-63.
- 48 Khanzada SK, Shaikh W, Shahzadi S, Kazi TG, Usmanhani K, Kabir A, Sheerazi TH. Chemical constituents of *Tamarindus indica* L. medicinal plant in Sindh. *Pak. J. Bot*. 2008, 40(6): 2553-2559.
- 49 Imam S, Azhar I, Hasan MM, Ali MS, Ahmed SW. Two triterpenes lupanone and lupeol isolated and identified from *Tamarindus indica* Linn. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2007; 20(2): 125-127.
- 50 Ferrara L. Antioxidant activity of *Tamarindus indica* L. *Ingredienti Alimentari*. 2005; 4(23): 13-15.
- 51 Tsuda, T.; Mozuno, R.; Oshima, R. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidative components from *Tamarindus indica* L. seed coat. *J. Agric. Food Chem*. 1995; 43(11): 2803-2806.
- 52 Sudjaroen Y, Haubner R, Wurtele G, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, et al. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food Chem. Toxicol*. 2005; 43: 1673-1682.
- 53 Jain R, Jain S, Sharma A, Ito H, Hatano T. Isolation of (+)-pinitol and other constituents from the root bark of *Tamarindus indica* Linn. *J. Nat. Med*. 2007; 61: 355-356.
- 54 Lee P, Swords G. Volatile constituents of *Tamarindus indica* L. *J. Agric. Food Chem*. 1975; 23(6): 1195-1199.
- 55 Wong KC, Tan CP, Chow CH, Chee SG. Volatile constituents of the fruit of *Tamarindus indica* L. *J. Essent. Oil Res*. 1998; 10(2): 219-221.
- 56 Pino JA, Marbot R, Vazquez C. Volatile Components of Tamarind (*Tamarindus indica* L.) Grown in Cuba. *J. Essent. Oil Res*. 2004; 16(4): 223-224.

-
- 57 Pitke PM, Singh PP. Fatty acid composition of tamarind kernel oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1978; 54 (12): 1952-1954.
- 58 Yadava RN, Yadav S. A new cardenolide uzarigenen-3-O-beta-D-xylopyranosyl (1-->2)-alpha-L-rhamnopyranoside. *J Asian Nat Prod Res.* 1999; 1(4): 245-249.
- 59 Yadava RN, Yadav S, Vardhan, D A new bufadienolide from seeds of *Tamarinds indica* L. *Res. J. of Chem. and Envirom.* 1999; 32(1): 45-58.
- 60 Picout DR, Ross-Murphy SB, Errington N, Harding SE. Pressure cell assisted solubilization of xyloglucans: tamarind seed polysaccharide and detarium gum. *Biomacromolecules.* 2003; 4(3): 799-807.
- 61 Patil DN, Datta M, Chaudhary A, Tomar S, Sharma AK, Pravindra K. Isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic studies of chitinase from tamarind (*Tamarindus indica*) seeds. *Acta Crystallogr. F.* 2009; 65(4): 343-345.
- 62 Joyeux M, Mortimer F. Screening of antiradical, antilipoperoxidant and hepatoprotective effects of nine plants extracts used in Caribbean folk medicine. *Phytother. Res.* 1995; 9(3): 228-230.
- 63 Alian A, El-Ashwah E. Antimicrobial properties of some Egyptian non alcoholic beverages with special references to tamarind. *Egypt. J. Food Sci.* 1983; 11 (1-2): 109-114.
- 64 Doughari, JH. Antimicrobial Activity of *Tamarindus indica* Linn. *Trop. J. Pharm. Res.* 2006; 5 (2): 597-603.
- 65 Satish S, Raghavendra MP, Ravesha KA. Antifungal potentiality of some plant extracts against *Fusarium* sp. *Arch. Phytopathol. Plant Protect.* 2009; 42(7): 618-625
- 66 Ajith T, Gangadharan R, Amma V. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaves of *Tamarindus indica*. *Ancient Sci. Life.* 1998; 18 (2): 120-126.
- 67 Raimundi L. The polysaccharide from *Tamarindus indica* (TS-polysaccharide) protects cultured corneal-derived cells (SIRC cells) from ultraviolet rays. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55(3): 333-338.
- 68 Tsuda T. Antioxidative components isolated from edible pulses and their utilization. *Foods & Food Ingrid. J. Jpn.* 1995; 163: 30-38.
- 69 Komutarin T, Azadi S, Butterworth L, Keil D, Chitsomboon B, Suttajit M, et al. Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem. Toxicol.* 2004; 42(4): 649-58.
- 70 Suksomtip M, Pongsamart S. Protective effect against oxidation of human low-density lipoprotein and plasmid DNA strand scission of Tamarind seed coat extract *in vitro*. *LWT--Food Sci. Tech.* 2008; 41(10): 2002-2007.
- 71 Lourith N, Kanlayavattanakul M, Chanpirom S. Free radical scavenging efficacy of Tamarind seed coat and its cosmetics application. *J. Health Res.* 2009; 23(4): 159-162.
- 72 Lamien-Meda A, Lamien CE, Compaore MM, Meda RN, Kiendrebeogo T, Martin Z, et al. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules.* 2008; 13(3): 581-594.
- 73 Al-Fatimi M, Wurster M, Schroder G, Lindequist U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 111(3): 657-666.
- 74 Limiyati DA, Juniar BL. Jamu Gendong, a kind of traditional medicine in Indonesia: the microbial contamination of its raw materials and end product. *J Ethnopharmacol.* 1998; 63(3): 201-208.

-
- 75 Abukakar MG, Ukwuani AN, Shehu RA. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Tamarindus indica* pulp extract. *Asian J. Biochem.* 2008; 3(2): 134-138.
- 76 Aengwanich W, Suttajit M, Chaleerin P, Thangklang P, Kapan S, Srikhun T, et al. Antibiotic effect of polyphenolic compound extracted from tamarind (*Tamarindus indica* L.) seed coat on productive performance of broilers. *Int. J. Appl. Res. Vet. Med.* 2009; 7(3): 112-115.
- 77 Sreelekha TT, Vijayakumar T, Ankanthil R, Vijayan KK, Nair MK. Immunomodulatory effects of a polysaccharide from *Tamarindus indica* L. *Anticancer Drugs.* 1993; 4(2): 209-212.
- 78 López C. Estudio del efecto inmunopotenciador del polisacárido de tamarindo (*Tamarindus indica* L.) en ratones Balb./C infectados con *Actinomadura madurae* (Book). *Rev. Mex. Dermatol.* 2003; 47 (1): 4.
- 79 Izquierdo T, Garcia-Tamayo F, Soto C, Castrillon LE. A *Tamarindus indica* Linn pulp polysaccharide inhibits fever in vivo and IL-1 β release by murine peritoneal exudate cells. *Pharm. Biol.* 2007; 45(1): 22-30.
- 80 Paula FS, Kabeya LM, Kanashiro A, Figueiredo ASG, Azzolini AE, Uyemura SA, et al. Modulation of human neutrophil oxidative metabolism and degranulation by extract of *Tamarindus indica* L. fruit pulp. *Food Chem. Toxicol.* 2009; 47(1): 163-170.
- 81 Pandey HN, Sur BK. Future of tamarind and tartrate in preventing recurrence of renal calculi. Urolithiasis: Clinical Basic Research (Proc. Int. Symp.) 4th, 1980: 333-336.
- 82 Croft K, Adair JH. An evaluation of tamarind and tartaric acid as inhibitor of calcium oxalate crystallization in urine. *Urinary Stone, Proc. Int. Urinary Stone. Conf. 2nd, 1985:* 189-197.
- 83 Khandare AL, Rao GS, Lakshmaiah N. Effect of tamarind ingestion on fluoride excretion in humans. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56(1): 82-85.
- 84 Khandare AL, Kumar PU, Shanker RG, Venkaiah K, Lakshmaiah N. Additional beneficial effect of tamarind ingestion over defluoridated water supply to adolescent boys in a fluorotic area. *Nutrition.* 2004; 20(5): 433-436
- 85 Ranjan R, Swarup D, Patra RC, Chandra V. *Tamarindus indica* L. and *Moringa oleifera* M. extract administration ameliorates fluoride toxicity in rabbits. *Indian J. Exp. Biol.* 2009; 47(11): 900-905.
- 86 Mustapha A, Yakasai IA, Aguye IA. Effect of *Tamarindus indica* L. on the bioavailability of aspirin in healthy human volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1996; 21(3): 223-226.
- 87 Garba M, Yakasai IA, Bakare MT, Munir HY. Effect of *Tamarindus indica* L. on the bioavailability of ibuprofen in healthy human volunteers. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2003; 28(3): 179-184.
- 88 Popuri SR, Jammala A, Reddy KS, Abburi K. Biosorption of hexavalent chromium using tamarind (*Tamarindus indica*) fruit shell-a comparative study. *Electron. J. Biotech.* 2007; 10(3): 358-367.
- 89 Tuntipopipat S, Zeder C, Siriprapa P, Charoenkiatkul S. Inhibitory effects of spices and herbs on iron availability. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2009; 60(Suppl. 1): 43-55.
- 90 Ghelardi E, Tavanti A, Celandroni F, Lupetti A, Blandizzi C, Boldrini E, et al. A mucoadhesive polymer extracted from tamarind seed improves the intraocular penetration and efficacy of rifloxacin in topical treatment of experimental bacterial keratitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(9): 3396-4001.
- 91 Bhavin P; Piyush P, Ashok B, Shrawaree H, Swati M, Ganesh CH. Evaluation of tamarind seed polysaccharide (TSP) as a mucoadhesive and sustained release component of nifedipine buccoadhesive tablet & comparison with HPMC and NaCMC. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2009; 1(3): 404-410.

-
- 92 Deveswaran R, Abraham S, Bharath S, Basavaraj BV, Furtado S, Madhavan V. Design and characterization of Diclofenac Sodium tablets containing tamarind seed polysaccharide as release retardant. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2009; 1(2): 191-195.
- 93 Kumar CS, Bhattacharya S. Tamarind Seed: Properties, Processing and Utilization. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2008; 48(1): 1-20.
- 94 Sánchez-Lamar A, Fonseca-López G, Capiro-Trujillo N, Fernández-Fuentes D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Rev. Cubana Farm.* 2000; 34(1): 33-44.
- 95 Ramos A, Visozo A, Piloto J, Garcia A, Rodriguez CA, Rivero R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2003; 87(2-3): 241-246.
- 96 Silva FMV, Leite MF, Spadaro ACC, Uyemura SA, Maistro EL. Assessment of the potential genotoxic risk of medicinal *Tamarindus indica* fruit pulp extract using in vivo assays. *GMR, Genet. Mol. Res.* 2009; 8(3): 1085-1092.
- 97 Piloto-Ferrer J, Montero AR, Vega-Hurtado Y, Rodríguez-Ferrada C, Carballo C. *Tamarindus indica* L. (tamarindo): Evaluación del Potencial Mutagénico y Antioxidante. *Lat. Am. J. Pharm.* 2008; 27 (3): 375-379.
- 98 Shivshankar P. Screening of stimulatory effects of dietary risk factors on mouse intestinal cell kinetics. *World J. Gastroenterol.* 2005; 11(2): 242-248.
- 99 Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. Review Article. *Free Radical Bio. Med.* 2010; 48: 1121–1132
- 100 Araki E, Nishikawa T. Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *J. Diabetes Invest.* 2010; 1(3): 90-96.
- 101 Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. (A review). *Atherosclerosis.* 2009; 202: 321–329.
- 102 Migliore L, Coppedè F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat. Res.* 2009; 674: 73–84.
- 103 Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicol. Pathol.* 2010; 38: 96-109.
- 104 Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history (a review). *Dyn. Med.* 2009; 8(1): 1-25.
- 105 Mena S, Ortega A, Estrela JM. Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis (Mini review). *Mutat. Res.* 2009; 674: 36–44.
- 106 Manton KG, Volovik S, Kulminski A. ROS effects on neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders: on environmental stresses of ionizing radiation. *Curr. Alzheimer Res.* 2004; 1(4): 277–293.
- 107 Muguruma M, Unami A, Kanki M, Kuroiwa Y, Nishimura J, Dewa Y, et al. Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats. *Toxicology.* 2007; 236: 61–75.
- 108 Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2008; 5(6): 338-349.

-
- 109 Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Bio. Med.* 2002; 32(9): 822–832.
- 110 Vallet M, Faus J, García-España E, Moratal J (Edt). *Introducción a la Química Bioinorgánica*. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España. 2003: 19-39.
- 111 Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. Minireview. *Life Sci.* 2009; 84: 705–712.
- 112 Qureshi GA, Parvez SH. (Eds.), *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. Elsevier press, Amsterdam, Holanda. 2007: 451–466.
- 113 Romieu I, Castro-Giner F, Kunzli N, Sunyer J. Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur Respir J.* 2008; 31: 179–196.
- 114 Cederbaum AI, Yongke L, Defeng W. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. Review article. *Arch. Toxicol.* 2009; 83: 519–548.
- 115 Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Review and Update. *Dig Dis Sci.* 2010; 55:560–578.
- 116 Zhou Q, Mrowietz U, Rostami-Yazdi M. Oxidative stress in the pathogenesis of psoriasis. *Free Radical Biol. Med.* 2009; 47: 891–905.
- 117 Pérez VI, Bokov A, van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, et al. Is the oxidative stress theory of aging dead?. Review article. *Bioch. Bioph. Acta.* 2009; 1790: 1005–1014.
- 118 Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* 2009; 12: 75–92.
- 119 Gorelik S, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J. A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *FASEB J.* 2008; 22: 41–46.
- 120 Zamora-Ros R, Urpí-Sardà M, Lamuela-Raventós R, et al., The PREDIMED study. Resveratrol metabolites in urine as a biomarker of wine intake in free-living subjects. *Free Radic Bio Med.* 2009; 46: 1562–1566.
- 121 Covas MI, Gambert P, Fitó M, de la Torre R. Wine and oxidative stress: Up-to-date evidence of the effects of moderate wine consumption on oxidative damage in humans. A review. *Atherosclerosis.* 2010; 208: 297–304.
- 122 Arambewela L, Arawwawala M, Rajapaksa D. *Piper betel*: a potent natural antioxidant. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2006; 41(1): 10-14.
- 123 Bhattacharya S, Mula S, Gamre S, Kamat JP, Bandyopadhyay SK, Chattopadhyay S. Inhibitory property of *Piper betel* extract against photosensitization-induced damages to lipids and proteins. *Food Chem.* 2007; 100: 1474-1480.
- 124 Calucci L, Pinzono C, Zandomenighi M, Capocchi A. Effects of gamma-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 927–934.
- 125 Catchpole OJ, Grez JB, Perry NB, Burgess EJ, Redmond WA, Porter NG. Extraction of chilli, black pepper, and ginger with near-critical CO₂, propane, and di-methyl ether: analysis of the extracts by quantitative nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 4853–4860.
- 126 Jun WJ, Han BK, Yu KW. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. *Food Chem.* 2001; 75: 439–444.

-
- 127 Srinivasan K. Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Res. Int.* 2005; 38: 77–86.
- 128 Núñez-Sellés A, Vélez-Castro H, Agüero-Agüero J, González-González J, Naddeo F, De Simone F, et al. Isolation and quantitative analysis of phenolic antioxidants, free sugars, fatty acids and polyols from mango (*Mangifera indica* L.) stem bark aqueous decoction used in Cuba as nutritional supplement. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 762–766.
- 129 Pardo-Andreu GL, Delgado R, Núñez-Sellés AJ, Vercesi AE. *Mangifera indica* L. extract (Vimang) inhibits 2-deoxyribose damage induced by Fe (III) plus ascorbate. *Phytother. Res.* 2006; 20: 120–124.
- 130 Pardo-Andreu GL, Forrellat-Barrios I, Curti C, Hernández I, Merino N, Lemusa Y, et al. Protective effects of *Mangifera indica* L extract (Vimang), and its major component mangiferin, on iron-induced oxidative damage to rat serum and liver. *Pharmacol. Res.* 2008; 57: 79–86.
- 131 Dehesa MA, **Escalona-Arranz JC**, Santiesteban R, Lores D. Evaluación Químico Farmacéutica de las hojas del *Tamarindus indica* L. *Etnomedicina.* 1995; Vol 1: 147-156
- 132 Senatore F, Landolfi S, Celik S, Bruno M. Volatile components of *Centaurea calcitrapa* L. and *Centaurea sphaerocephala* L. ssp. *sphaerocephala*, two *Asteraceae* growing wild in Sicily, *Flavour Fragr. J.* 2006; 21: 282-285.
- 133 Adams RP. Identification of essential oil by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Carol Stream, Allured publisher Corp. Illinois, USA; 1995.
- 134 Pino JA, Marbot R. Volatile flavor constituents of acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit, *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 5880-5882.
- 135 Pino JA, Mesa J, Muñoz Y, Martí MP, Marbot R. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars, *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 2213-2223.
- 136 MINSAP. Medicamentos de origen vegetal: Droga cruda. Métodos de ensayo. Norma Ramal de Salud Pública 311 (NRSP 311). La Habana; 1991
- 137 British Pharmacopeia Commission. British Pharmacopeia CD ROM. May 2007.
- 138 Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticul.* 1977; 28: 49-55.
- 139 Quettier-Deleu C, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyck M, et al. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 72: 34-42.
- 140 MINSAP. Medicamentos de origen vegetal. Extractos y Tinturas .Métodos de ensayo. Norma Ramal de Salud Pública 312 (NRSP 312). La Habana; 1991
- 141 MINSAP. Medicamentos de origen vegetal: Droga cruda. Métodos de ensayo. Norma Ramal de Salud Pública 309 (NRSP 309). La Habana; 1991
- 142 Guil-Guerrero JL, Martínez-Guirado C, Reboloso-Fuentes MM, Carrique-Pérez A. Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *Eur. Food Res. Technol.* 2006; 224: 1–9
- 143 Harbone JB, Cody V, Middlenton E, Beretz A. Plants flavonoids in Biology and Medicinal II. Biological and medicinal properties. New York, USA; 1988: 17-29.

-
- 144 Sadhu SK, Okuyama E, Fujimoto H, Ishibashi M. Separation of *Leucas aspera*, a medicinal plant of Bangladesh, guided by prostaglandin inhibitory and antioxidant activities. *Chem. Pharm. Bull.* 2003; 51: 595–598.
- 145 Yen GC, Chen HY. Antioxidant activity of various tea extract in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* 1995; 43: 27-32.
- 146 Andjelkovic´ M, Van Camp J, De Meulenaer B, Depaemelaere G, Socaciu C, Verloo M, et al. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *Food Chem.* 2006; 98: 23–31.
- 147 Chang HH. Mushroom immunomodulatory proteins possess potential thermal/freezing resistance, acid/alkali tolerance and dehydration stability. *Food Chem.* 2007; 105: 597–605.
- 148 Swarbrick J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology”. Volumen XIV. 2001: 253-265.
- 149 Prat S. Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana por Difusión en Agar. National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). 2002; No. 1, Vol 22.
- 150 Kuete V. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (*Guttiferae*). *J. Ethnopharmacol.* 2007; 109: 372-374.
- 151 García JA, Cantón R, García JE, Gómez-Lus ML, Martínez L, Rodríguez-Avial C, et al. Métodos Especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2002: 142-167.
- 152 Ameh SJ, Obodozie OO, Inyang US, Abubakar MS, Garba M. Current phytotherapy - A perspective on the science and regulation of herbal medicine. *J. Med. Plants Res.* 2010; 4(2): 072-081.
- 153 Palic R, Stojanovic G, Alagic S, Nikolic M, Lepojevic Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO₂ extracts of the oriental tobacco, Prilep. *Flavour Fragr. J.* 2002; 17: 323-326.
- 154 Maridass M. Analysis of Essential Oils and Antifungal Activity of *Cymbopogon travancorensis* Bor. *Pharmacologyonline.* 2008; 3: 210-219.
- 155 Li J, Liu X, Dong F, Xu J, Zheng Y, Shan W. Determination of the Volatile Composition in Essential Oil of *Descurainia sophia* (L.) by Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS). *Molecules.* 2010; 15: 233-240.
- 156 Martin KW, Edzard E. Antiviral agents from plants and herbs: a systematic review. *Antivir. Ther.* 2003; 8: 77-90.
- 157 Vila R, Santana AI, Pérez-Rosés R, Valderrama A, Castelli MV, Mendonca S, et al. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of a-bisabolol. *Bioresource Technol.* 2010; 101: 2510–2514.
- 158 Cheng SS, Huang CG, Chen YJ, Yu JJ, Chen WJ, Chang ST. Chemical compositions and larvicidal activities of essential oils from two eucalyptus species. *Bioresour. Technol.* 2009; 100: 452–456.
- 159 Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 88: 308–316.
- 160 Randrianarivelo R, Sarter S, Odoux E, Brat P, Lebrun M, Romestand B, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chem.* 2009; 114(2): 680-684.

-
- 161 Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2003; 47: 3357–3360.
- 162 Milan S. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J. Food Compos. Anal.* 2006; 19: 531–537.
- 163 Sari M, Biondi DM, Kaâbeche M, Mandalari G, D'Arrigo M, Bisignano G, et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour Frag. J.* 2006; 21: 890–898.
- 164 Misharina TA, Polshkov AN. Antioxidant properties of essential oils: autoxidation of essential oils from Laurel, Fennel and their mixtures with essential oil from Coriander. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005; 41(6): 610-618.
- 165 Naderi GA, Asgary S, Ani M, Sarraf-Zadegan N, Safari MR. Effect of some volatile oils on the affinity of intact and oxidized low-density lipoproteins for adrenal cell surface receptors. *Mol. Cell. Biochem.* 2004; 267: 59–66.
- 166 Andriamanantena RW, Artuad J, Gaydofn EM, Iatrides MC, Chavalier JL. Fatty acid and sterol composition of malagasy tamarind kernels. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1983, 60(7): 1318-1321.
- 167 Krishnaiah D, Sarbatly R, Bono A. Phytochemical antioxidants for health and medicine – A move towards nature. *Biotech. Mol. Biol. Rev.* 2007, 1(4): 97-104.
- 168 Qurtam AA, Alkahtani S, Tarboush FMA, Alarifi SA, Al-Qahtani A, Al-Eissa M. Effect of the antioxidant butylated hydroxytoluene on the genotoxicity and cytotoxicity induced in mice by sodium arsenite. *J. Biol. Sci.* 2009; 9: 413-422.
- 169 Shahidi F, Zhong Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 2010; 112 (9): 930–940.
- 170 Pino JA, Mesa J, Muñoz Y, Martí MP, Marbot R. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 2213-2223.
- 171 Van Acker SA, van den Berg DJ, Tromp MN, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJ, et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 1996; 20: 331–342.
- 172 Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Sixth Edition. Electronic release. AND Publishing technology B.V. SL, USA. 2002.
- 173 Lawson L, Thacher TD, Yassin MA, Onuoha NA, Usman A, Emenyonu NE, et al. Randomized controlled trial of zinc and vitamin A as co-adjuvants for the treatment of pulmonary tuberculosis. *Trop. Med. Int. Health.* 2010;15(12):1481-1490.
- 174 de Mendonça JD, Adachi O, Rosado LA, Ducati RG, Santos DS, Basso LA. Kinetic mechanism determination and analysis of metal requirement of dehydroquinase synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: an essential step in the function-based rational design of anti-TB drugs. *Mol Biosyst.* 2011; 7(1):119-128.
- 175 Pardo-Andreu GL, Philip SJ, Riaño S, Sánchez C, Viada C, Núñez-Sellés A, Delgado R. *Mangifera indica* L. (Vimang) Protection against Serum Oxidative Stress in Elderly Humans. *Arch. Med. Res.* 2006; 37:158–164.
- 176 Arthur JR. Functional indicators of iodine and selenium status. *Proced. Nut. Soc.* 1999; 58 (2): 507–512.
- 177 Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. National Academy Press, Washington. 2000.

-
- 178 Blot WJ, Li JY, Taylor PR, Guo W, Dawsey S, Wang GQ. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.* 1993; 85(18): 1483–1492.
- 179 Clark LC, Combs JR, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *J. Am. Med. Assoc.* 1996; 276(24): 1957–1963.
- 180 Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M, Pritsos CA. Oxidative stress induced by environmental tobacco smoke in the workplace is mitigated by antioxidant supplementation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1998; 7 (11): 981–988.
- 181 Loguercio C, Federico A. Selenium also represents a protective agent against lipid peroxidation, liver injury. Oxidative stress in Viral and Alcoholic Hepatitis. *Free Radical Bio. Med.* 2003; 34(1): 1–10.
- 182 Ahmad I, Aqil F, Owais M. (Edts) Modern Phytomedicine Turning Medicinal Plants into Drugs. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006: 233-245.
- 183 Danilewicz JC. Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Viticult.* 2003; 54: 73–85.
- 184 Chaoui A, El Ferjani E. Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Comptes Rendus Biol.* 2005; 328: 23–31.
- 185 Richling E, Hohn C, Weckerle B, Heckel F, Schreier P. Authentication analysis of caffeine-containing foods via elemental analysis combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry. *Eur. Food Res. Tech.* 2003; 216: 544-548.
- 186 International Copper Research Association (INCRA). *A Critical Review of Copper in Medicine, Report No. 234.* INCRA: Inc. Goteborg – New York. 1975.
- 187 Kinazaki A, Sakanashi Y, Oyama TM, Shibagaki H, Yamashita K, Hashimoto E, et al. Micromolar Zn(2+) potentiates the cytotoxic action of submicromolar econazole in rat thymocytes: possible disturbance of intracellular Ca(2+) and Zn(2+) homeostasis. *Toxicol. in Vitro.* 2009; 23(4):610-616.
- 188 Holt KB, Bard AJ. Interaction of silver(I) and zinc(II) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag. *Biochem.* 2005; 44: 13214-13223.
- 189 Patel M, Chhasatia M, Parmar P. Antibacterial and DNA interaction studies of zinc(II) complexes with quinolone family member, ciprofloxacin. *Eur J Med Chem.* 2010; 45(2): 439-446.
- 190 Amin M, Iqbal MS, Hughes RW, Khan SA, Reynolds PA, Enne VI, et al. Mechanochemical synthesis and in vitro anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of novel zinc(II)-famotidine complex. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2010; 25(3):383-390.
- 191 Fox S, Wilkinson TS, Wheatley PS, Xiao B, Morris RE, Sutherland A, et al. NO-loaded Zn(2+)-exchanged zeolite materials: a potential bifunctional anti-bacterial strategy. *Acta Biomater.* 2010;6(4):1515-1521.
- 192 Sorensen JM. Herb-drug, Food-drug, Nutrient-drug, and Drug-drug interactions mechanisms. *J Altern. Complement. Med.* 2002; 8: 293–308.
- 193 Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999, 10: 564–582.

-
- 194 Ashafa AOT, Grierson DS, Afolayan AJ. Composition and antibacterial activity of essential oil from *Felicia muricata* Thunb. leaves. *J. Biol. Sci.* 2008; 8(4): 784-788.
- 195 Miguel MG. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. *Molecules.* 2010; 15: 9252-9287.
- 196 Patnaik KK. Seasonal pattern of tartaric acid metabolism underlying the physic development in *Tamarindus indica*. *Biol. Plant*; 1974; 16: 1-12.
- 197 Liolios CC, Sotiroudou GT, Chinou I. Fatty Acids, Sterols, Phenols and Antioxidant Activity of *Phoenix theophrasti* Fruits Growing in Crete, Greece. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2009; 64: 52–61.
- 198 Maznah I, Mariod A, Bagalkotkar G, Lingb HS. Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of Cantaloupe extracted by supercritical fluid extraction. *Grasas y Aceites.* 2010; 61(1): 37-44.
- 199 Ramadan MF. Chromatographic Analysis for Fatty Acids and Lipid-Soluble Bioactives of *Derris indica* Crude Seed Oil. *Chromatographia.* 2009; 70 (1/2): 103-108.
- 200 Sahari MA, Ataii D, Hamedi M. Characteristics of Tea Seed Oil in Comparison with Sunflower and Olive Oils and Its Effect as a Natural Antioxidant. *J. Am. Oil Chem Soc.* 2004; 81(6): 585-588.
- 201 Chen ZY, Chan PT, Kwan KY, Zhang A. Reassessment of the Antioxidant Activity of Conjugated Linoleic Acids. *J. Am. Oil Chem Soc.* 1997; 74 (6): 113-118.
- 202 Cerón MC, García-Malea MC, Rivas J, Acien FC, Fernandez JM, Del Río E, et al. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Appl. Microbiol. Biotech.* 2007; 74: 1112–1119.
- 203 Gotoh N. Highly Unsaturated Fatty Acid might Act as an Antioxidant in Emulsion System Oxidized by Azo Compound. *J. Oleo Sci.* 2010. 59 (12): 631-639.
- 204 Benkendorff K, Davis AR, Rogers CN, Bremner JB. Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic mollusks, and their associated antimicrobial properties. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2005; 316: 29–44.
- 205 Alamsjah MA, Hirao S, Ishibashi F, Oda T, Fujita Y. Algicidal activity of polyunsaturated fatty acids derived from *Ulva fasciata* and *U. pertusa* (*Ulvaceae*, Chlorophyta) on phytoplankton. *J. Appl. Phycol.* 2008; 20: 713–720.
- 206 Hilmarsson H, Larusson LV, Thormar H. Virucidal effect of lipids on visna virus, a lentivirus related to HIV. *Arch. Virol.* 2006 151:1217–1224.
- 207 Hunzicker GM. A novel regulatory system in plants involving medium-chain fatty acids. *Planta.* 2009; 231: 143–153.
- 208 Clarke SR, Mohamed R, Bian L, Routh AF, Kokai-Kun JF, Mond JJ, et al. The *Staphylococcus aureus* surface protein ISDA mediates resistance to innate defenses of human skin. *Cell Host Microbiol.* 2007; 1: 1–14.
- 209 Won SR, Hong MJ, Kim YM, Li CY, Kim JW, Rhee HI. Oleic acid: an efficient inhibitor of glucosyltransferase. *FEBS Lett.* 2007; 581: 4999–5002.
- 210 Stenz L, François P, Fischer A, Huyghe A, Tangomo M, Hernandez D, et al. Impact of oleic acid (cis-9-octadecenoic acid) on bacterial viability and biofilm production in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Microbiol. Lett.* 2008; 287: 149–155.

-
- 211 Davies DG, Marques CNH. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 2009; 191: 1393–1403.
- 212 Thormar H, Hilmarsson H. The role of microbicidal lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chem. Phys. Lipids.* 2007; 150: 1–11.
- 213 Wille JJ, Kydonieus A. Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against Gram-positive bacteria. *Skin Pharmacol. Appl. & Skin Physiol.* 2003; 16: 176–187.
- 214 Drake DR, Brogden KA, Dawson DV, Wertz PW. Antimicrobial lipids at the skin surface. *J. Lipids Res.* 2008; 49: 4–11.
- 215 Takigawa H, Nakagawa H, Kuzukawa M, Mori H, Imokawa G. Deficient production of hexadecenoic acid in the skin is associated in part with the vulnerability of atopic dermatitis patients to colonisation by *Staphylococcus aureus*. *Dermatology.* 2005; 211: 240–248.
- 216 Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG, Cho HY, Kim YH, Kim WG. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 2005; 579: 5157–5162.
- 217 Wu JT, Chiang YR, Huang WY, Jane WN. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. *Aquat. Toxicol.* 2006; 80: 338–345.
- 218 Shin SY, Bajpai VK, Kim HR, Kang SC. Antibacterial activity of eicosapentaenoic acid (EPA) against foodborne and food spoilage microorganisms. *LWT.* 2007; 40: 1515–1519.
- 219 Peters JS, Chin CK. Inhibition of photosynthetic electron transport by palmitoleic acid is partially correlated to loss of thylakoid membrane proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 2003; 41: 117–124.
- 220 Beck V, Jabürek M, Demina T, Rupprecht A, Porter RK, Ježek P, et al. Polyunsaturated fatty acids activate human uncoupling proteins 1 and 2 in planar lipid bilayers. *FASEB J.* 2007; 21: 1137–1144.
- 221 Hamel FG. Preliminary report: inhibition of cellular proteasome activity by free fatty acids. *Metabolism.* 2009; 58: 1047–1049.
- 222 Sado-Kamdem SL, Vannini L, Guerzoni ME. Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 2009; 129: 288–294.
- 223 Andersen and Markham (Edt.) Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and applications. CRC Press, Boca Raton, FL, 2006: 13-24.
- 224 Pastor-Martínez R. Dotación flavonoidea en el *Citrus limonum* variedad eureka. Tesis en Opción al Título de Doctor en Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España 1975: 100-133.
- 225 Mruthunjaya K, Hukkeri V. In vitro Antioxidant and free radical scavenging potential of *Parkinsonia aculeata* L. *Phcog Mag.* 2008; 4(13): 42-51.
- 226 Hansch C, Gao H. Comparative SAR: Radical Reactions of Benzene Derivatives in Chemistry and Biology. *Chem. Rev.* 1997; 97: 2995-3059.
- 227 Kulkarni A, Suzuki S, Etoh H. Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. *J. Wood Sci.* 2008; 54: 153-157.
- 228 Meechaona R, Sengpracha W, Banditpuritat J, Kawaree R, Phutdhawong W. Fatty acid content and antioxidant activity of Thai bananas. *Mj. Int. J. Sci. Tech.* 2007; 1(2): 222-228.
- 229 García-Pérez ME, Diouf PN, Stevanovic T. Comparative study of antioxidant capacity of yellow birch twigs extracts at ambient and high temperatures. *Food Chem.* 2008; 107: 344–351.

-
- 230 Chen JC, Fang D, Zhou B, Yang L, Liu ZL. Antioxidant activity of hydroxycinnamic acid derivatives in human low density lipoprotein: mechanism and structure–activity relationship. *Food Chem.* 2007; 104: 132–139.
- 231 Kim DO, Lee CY. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2004; 44(4): 253–273.
- 232 Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agr. Food Chem.* 2004; 52: 4026–4037.
- 233 Lantto TA, Dorman HJD, Shikov AN. Chemical composition, antioxidative activity and cell viability effects of a Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) extract. *Food Chem.* 2009; 112: 936–43.
- 234 Diouf PN, Stevanovic T, Cloutier A. Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts. *Wood Sci. Tech.* 2009; 43: 457–70.
- 235 Gandin V, Nystrom C, Rundlof AK. Effects of the antioxidant Pycnogenol (R) on cellular redox systems in U1285 human lung carcinoma cells. *FEBS J.* 2009; 276: 532–40.
- 236 Sonboli A, Mojarad M, Ebrahimi SN, Enayat SH. Free Radical Scavenging Activity and Total Phenolic Content of Methanolic Extracts from Male Inflorescence of *Salix aegyptiaca* Grown in Iran. *Iran. J. Pharm. Res.* 2010; 9(3): 293–296.
- 237 Han RM, Tian YX, Liu Y. Comparison of flavonoids and isoflavonoids as antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 3780–3785.
- 238 Katalinic V, Milos M, Jukic M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem.* 2006; 94: 550–557.
- 239 Rathee JS, Birija S, Patro SM, Sunita G, Chattopadhyay S. Antioxidant Activity of *Piper betel* Leaf Extract and its Constituents. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 9046–9054.
- 240 Latif A, Hussain J, Hamayun M, Gilani SA, Ahmad S, Rehman G, et al. Secondary Metabolites from *Inula britannica* L. and Their Biological Activities (review). *Molecules.* 2010; 15: 1562–1577.
- 241 Ali EM, Fazel NS, Mohammad NS. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of *Eryngium Caucasicum* Trautv at flowering stage. *Phcog Mag.* 2009; 1(6): 435–439.
- 242 Ani V, Varadaraj MC, Akhilender N. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cuminum nigrum* L.) *Eur. Food Res. Technol.* 2006; 224: 109–115.
- 243 Bai N, Zhou Z, Zhu N, Zhang L, Quan Z, He K, et al. Antioxidant flavonoids from the flower of *Inula britannica*. *J. Food Lip.* 2005; 12: 141–149.
- 244 Park EJ, Kim Y, Kim J. Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica*. *J. Nat. Prod.* 2000; 63: 34–36.
- 245 Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.* 2006; 97: 654–660.
- 246 Spigno G, Tramelli L, de Faveri DM. Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* 2007; 81: 200–208.
- 247 Souza JNS, Silva EM, Loir A, Rees JF, Rogez H, Larondelle Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. *Food Chem.* 2008; 106: 331–339.

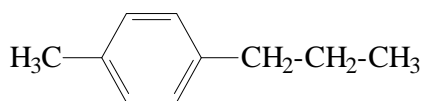
-
- 248 Czapecka E, Mareczek A, Leja M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chem.* 2005; 93: 223–226.
- 249 Diouf PN, Stevanovica T, Boutin Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. *Ind. Crop Prod.* 2009; 30: 297–303.
- 250 Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, et al. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: the role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chem.* 2009; 112: 587–594.
- 251 Martinello F, Soares SM, Franco JJ, Santos AC, Sugohara A, Garcia SB, et al. Hypolipemic and antioxidant activities from *Tamarindus indica* L. pulp fruit extract in hypercholesterolemic hamsters. *Food Chem. Tox.* 2006; 44: 810–818.
- 252 Siddhuraju P. Antioxidant activity of polyphenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT.* 2007; 40: 982–990.
- 253 Maisuthisakula P, Pasukb S, Ritthiruangdej P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J. Food Compos. Anal.* 2008; 21: 229–240.
- 254 Moon JW, Shibamoto T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agr. Food Chem.* 2009; 57 (5): 1655–1666.
- 255 Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agr. Food Chem.* 2000; 48 (1): 3396–3402.
- 256 Wong CC, Li HB, Cheng KW, Chen F. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem.* 2006; 97: 705–711.
- 257 Mira L, Fernandez MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Res.* 2002; 36: 1199–1208.
- 258 Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chem. Tox.* 2003; 41: 753–758.
- 259 Pardo-Andreu GL, Delgado R, Núñez-Sellés A, Vercesi AE. Dual mechanism of mangiferin protection against iron-induced damage to 2-deoxyribose and ascorbate oxidation. *Pharmacol. Res.* 2006; 53: 253–260.
- 260 Calderón A. Labnews. Los Agentes Quelantes y la Secuestración. Oct. Serie.D. 1998; (6). Disponible en URL: <http://www.drealderonlabs.com/index.html>
- 261 Yu-Tang T, Pei-Ling Y, Chun-Ya L, Shang-Tzen C. Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. *Pharm. Biol.* 2010; 48(10): 1130–1136.
- 262 Yoshikawa M, Nishida N, Ninomiya K, Ohgushi T, Kubo M, Morikawa T, et al. Inhibitory effects of coumarin and acetylene constituents from the roots of *Angelica furcijuga* on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice and on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages. *Bioorg. Med. Chem.* 2006; 14: 456–463.
- 263 Awale S, Tezuka Y, Kobayashi M, Ueda JJ, Kadota S. Neoorthosiphonone A; a nitric oxide (NO) inhibitory diterpene with new carbon skeleton from *Orthosiphon stamineus*. *Tetrahedron Lett.* 2004; 45: 1359–1362.

-
- 264 Kaurinovic B, Vlaisavljevic S, Popovic M, Vastag D, Djurendic-Brenesel M. Antioxidant Properties of *Marrubium peregrinum* L.(Lamiaceae) Essential Oil. *Molecules*. 2010; 15: 5943-5955.
- 265 Ballabeni V, Tognolini M, Giorgio C, Bertoni S, Bruni R, Barocelli E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: *In vitro* and *in vivo* investigation on its anti-inflammatory properties. *Fitoterapia*. 2010; 81: 289–295.
- 266 Neves A, Rosa S, Gonçalves J, Rufino A, Judas F, Salgueiro L, et al. Screening of five essential oils for identification of potential inhibitors of IL-1-induced Nf-κB activation and NO production in human chondrocytes: Characterization of the inhibitory activity of α-Pinene. *Planta Med*. 2010; 76: 303–308.
- 267 Weon-Jong Y, Nam Ho L, Chang-Gu H. Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *J. Oleo Sci*. 2010; 59(8): 415-421.
- 268 Taechowisan T, Tuntiwachwuttikul P, Lu C, Shen Y, Lumyong S, Taylor WC. Anti-inflammatory activity of 4-Arylcoumarins from Endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 in Murine Macrophage RAW 264.7 Cells. *Immunol. Invest*. 2007; 36: 203–211.
- 269 Jeong Ho J, Ju Sun K, Sam Sik K, Kun Ho S, Hyun Wook C, Hyun Pyo K. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. *J. Ethnopharm*. 2010; 127(3): 589-595.
- 270 Tsung-Kuei K, Yen-Chuan O, Shue-Ling R, Ching-Yi L, Su-Lan L, Chun-Jung C. Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. *Life Sci*. 2010; 86(9-10): 315-321.
- 271 Zhai Z, Haney D, Wu L, Solco A, Murphy PA, Wurtele ES, et al. Alcohol extracts of Echinacea inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by macrophages in vitro. *Food Agr. Immunol*. 2007; 18(3-4): 221–236.
- 272 Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikawa K, Matsushige K, Kadota S. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Analogues: Potent Nitric Oxide Inhibitors from the Netherlands Propolis. *Biol. Pharm. Bull*. 2003; 26(4): 487—491.
- 273 Zidek Z, Mašek K. Erratic behavior of nitric oxide within the immune system: illustrative review of conflicting data and their immunopharmacological aspects. *Int. J. Immunopharm*. 1998; 20: 319-343.
- 274 Binbuga N, Ruhs C, Hasty JK, Henry WP, Schultz TP. Developing environmentally benign and effective organic wood preservatives by understanding the biocidal and non-biocidal properties of extractives in naturally durable heartwood. *Holzforschung*. 2008; 62: 264–269.
- 275 Treutter D. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol*. 2005; 7: 581-591.
- 276 Maffei ME, Mitho A, Boland W. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*. 2007; 68: 2946–2959.
- 277 Royer M, Herbette G, Eparvier V, Beauchêne J, Thibaut B, Stien D. Secondary metabolites of *Bagassa guianensis* Aubl. wood: A study of the chemotaxonomy of the *Moraceae* family. *Phytochemistry*. 2010; 71: 1708–1713.
- 278 Gottlieb OR, Kaplan MAC, Kubitzki K. A suggested role of galloyl esters in the evolution of dicotyledons. *Taxon*. 1993; 42: 539-550.
- 279 Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J. Immunol*. 2006; 176: 1305–1310.

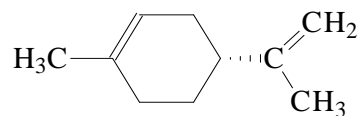
-
- 280 Datta PK, Rappaport J. HIV and complement: hijacking an immune defense. *Biomed. Pharmacother.* 2006; 60: 561–568.
- 281 Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. A review. *Mol. Immunol.* 2004; 41: 1089–1098.
- 282 Nauta AJ, Roos A, Daha MR. A regulatory role for complement in innate immunity and autoimmunity. A review. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2004; 134: 310–323.
- 283 Risco E, Ghia F, Vila R, Iglesias J, Alvarez E, Cañigueral S. Immunomodulatory activity and chemical characterization of Sangre de Drago (Dragon's Blood) from *Croton lechleri*. *Planta Med.* 2003; 69: 785-794.
- 284 Lee SY, Min BS, Kim JH, Lee J, Kim TJ, Kim CS, et al. Flavonoids from the leaves of *Litsea japonica* and their anti-complement activity. *Biol. Pharm. Bull.* 2003; 26 (7): 1042-1047.
- 285 Crepon B, Maillet F, Kazatchkine MD, Jozefonvicz J. Molecular weight dependence of the acquired anti-complementary activity of specifically substituted dextrans. *Biomaterials.* 1987; 8: 248-253.
- 286 Kazatchkine MD, Fearon DT, Silbert JE, Austen KF. Surface-associated heparin inhibits zymosan-induced activation of the human alternative complement pathway by augmenting the regulatory action of the control proteins on particle-bound C3b. *J. Exp. Med.* 1979; 150: 1202-1215.
- 287 Wiesmann C, Katschke KJ, Yin YP, Helmy KY, Steffek M, Fairbrother WJ, et al. Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation. *Nature.* 2006; 444(9): 217-220.
- 288 Landi AP, Chrysóstomo TN, Azzolini AE, Vargas CG, Akira S, Assis-Pandochi AI. Effect of the extract of the tamarind (*Tamarindus indica*) fruit on the complement system: studies in vitro and in hamsters submitted to a cholesterol-enriched diet. *Food Chem. Tox.* 2007; 45: 1487-1495.
- 289 Orhan I, Kupeli E, Terzioglu S, Yesilada E. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O-B-d-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 114: 32–37.
- 290 Park H. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *Int. Immunopharmacol.* 2009; 3: 261–267.
- 291 Nijveldt RJ, Nood EV, Hoorn DEC, Boelens PG, Norren Kv, Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 74: 418–425.

ANEXO I

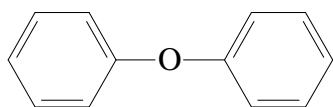
I.a Estructuras químicas de los metabolitos identificados en las hojas de *Tamarindus indica* L.



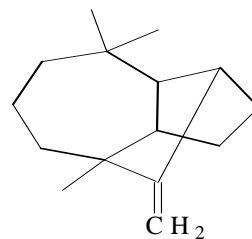
1-Metil-4-propilbenceno (**p-cimeno**)



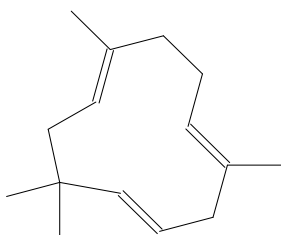
1-Metil-4-(1-metiletenil) ciclohexeno (**Limoneno**)



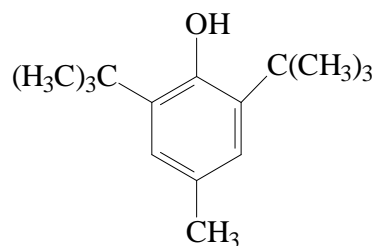
Difenil-éter



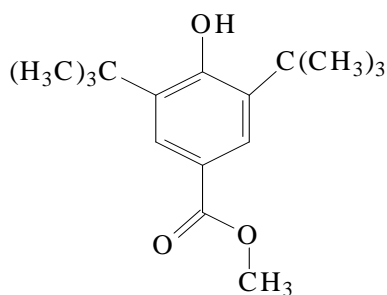
3,3,7-trimetil-8-metilen triclo-undecano (**Longifoleno**)



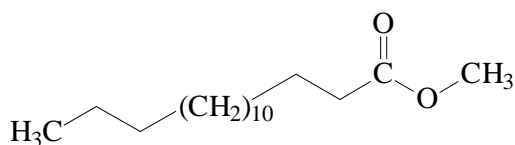
2,6,6,9-Tetrametil-1,4,8-cicoundecatrieno
(**α-Cariofileno**)



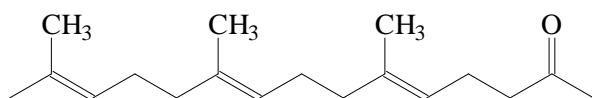
2,6-di-ter-butil-4-metil fenol
(**BHT**)



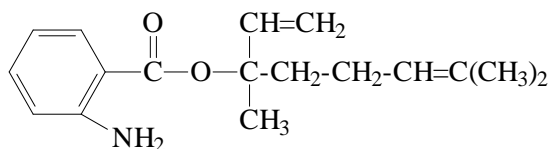
Metil 3,5-di-ter-butil-4-hidroxibenzoato



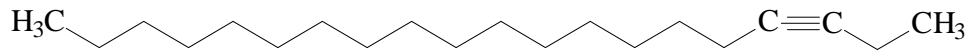
Éster metílico del ácido Hexadecanoico (C_{16:0})



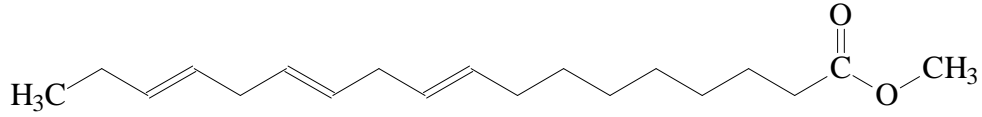
6,10,14-Trimethyl-5,9,13-pentadecatrien-2-ona
(**Farnesilcetona**)



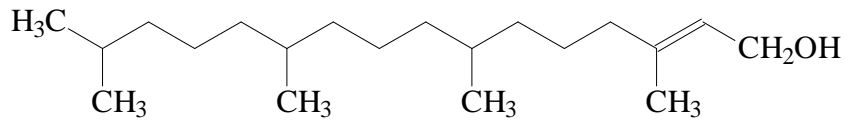
2,6-Dimetilocta-2,7-dien-6-antranilato
(**Linalol antranilato**)



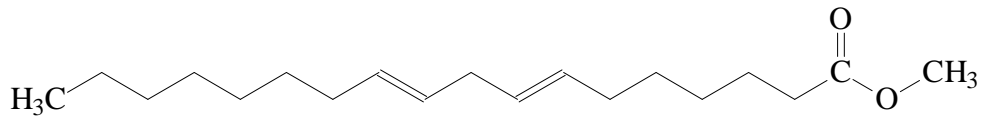
3-Eicosino



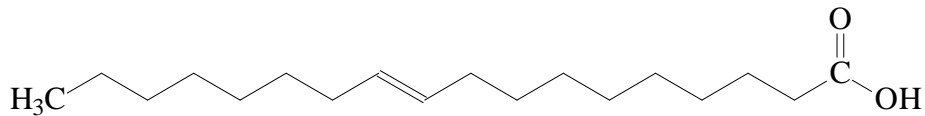
Éster metílico del ácido 9,12, 15-octadecatrienoico (C_{18:3}) (**Acido linolénico**)



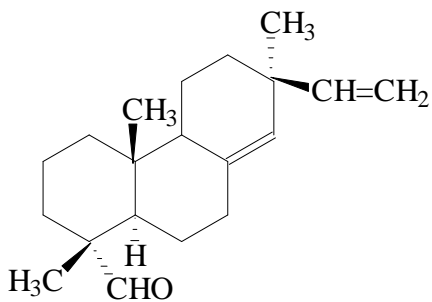
(2E)-3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecen-1-ol (**Fitol**)



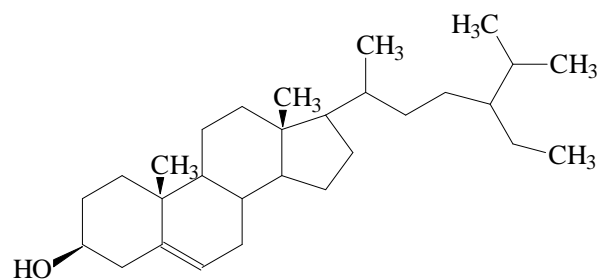
Éster metílico del ácido 7,10- octadecadienoico (C_{18:2}) (**Acido linoleico**)



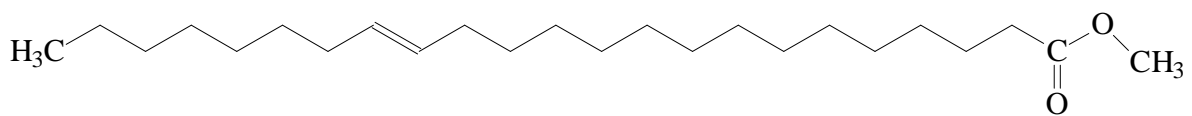
Ácido 10-octadecenoico (C_{18:1}) (**Acido Oleico**)



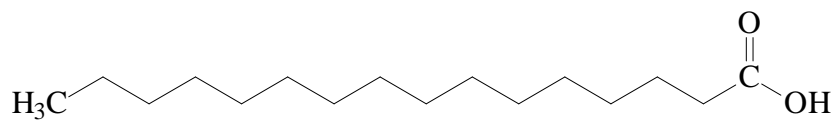
7-etenil-1,4a,7-trimetil-1-carboxaldehido dodecadehidrofenantreno (**Criptopinona**)



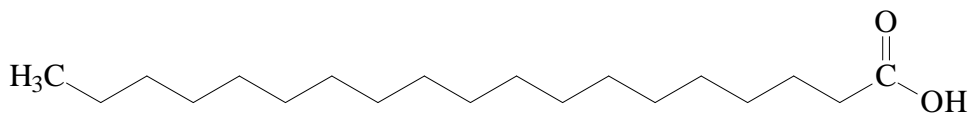
5-en-3β-ol estigmastano (**β-Sitosterol**)



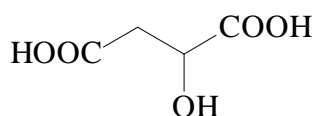
Éster metílico del ácido 15-tricosenoico (C_{23:1})



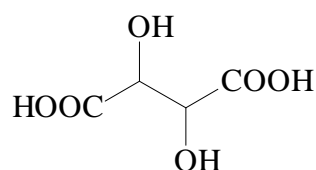
Ácido Hexadecanoico (C_{16:0}) (**Ácido palmítico**)



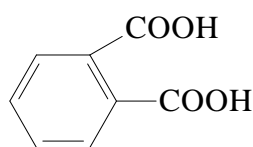
Ácido n-nonadecanoico (C_{19:0})



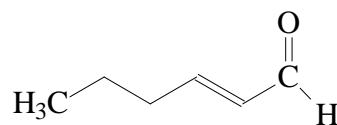
Ácido 2-Hidroxy-2-metilpropanodioico
(**Ácido málico**)



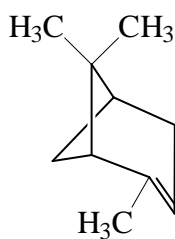
Ácido (2R, 3R)-dihidroxy butanodioico
(**Ácido tartárico**)



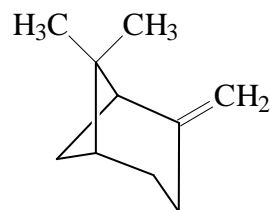
Ácido 1,2 dicarboxil-benceno (**Ácido ftálico**)



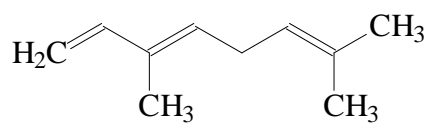
2-hexenal



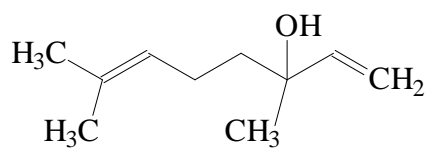
2,6,6-Trimetilbiciclo(3.1.1)-2-hepteno
(**α-Pineno**)



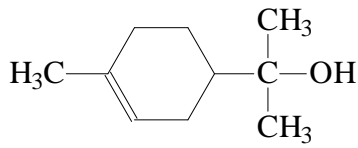
6,6-Dimetil-2-metileno-biciclo[3.1.1]heptano
(**β-Pineno**)



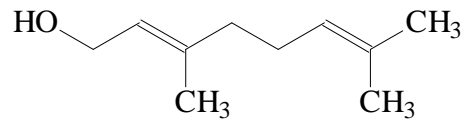
(E)- 3,7-dimetil-1,3,6-Octatrieno
(**trans-β-Ocimeno**)



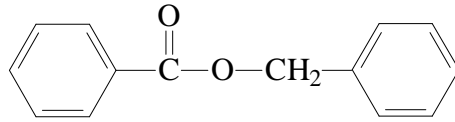
2,6-Dimetilocta-2,7-dien-6-ol
(**Linalol**)



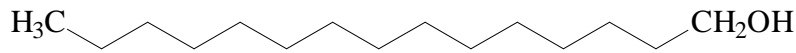
1-methanol, $\alpha,\alpha,4$ -trimetil-3-Ciclohexeno
(α -Terpineol)



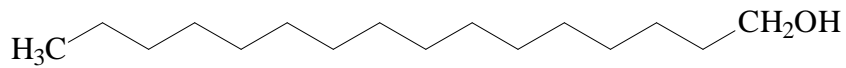
(Z)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol
(Nerol)



Benzoato de bencilo

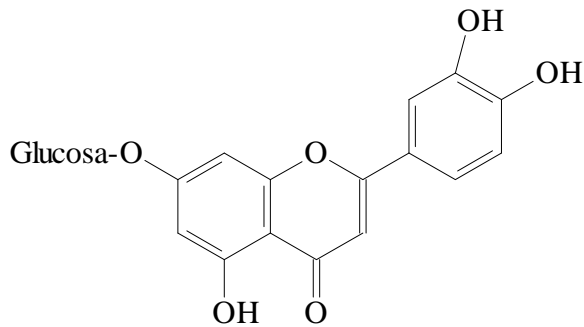


Pentadecanol

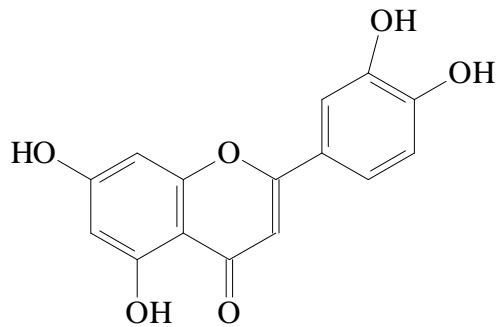


Hexadecanol

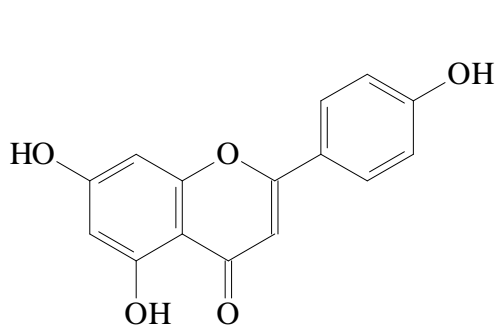
I.b Estructuras químicas de los polifenoles y flavonoides informados en las hojas de *Tamarindus indica* L.



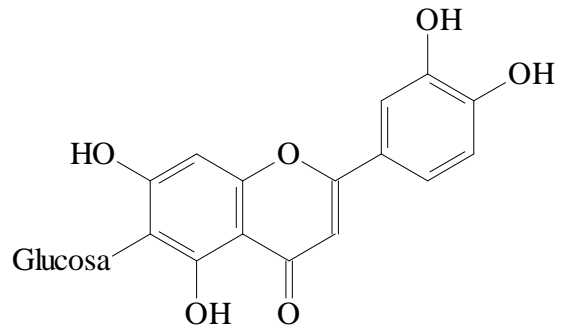
Luteolina 7-o-glucósido



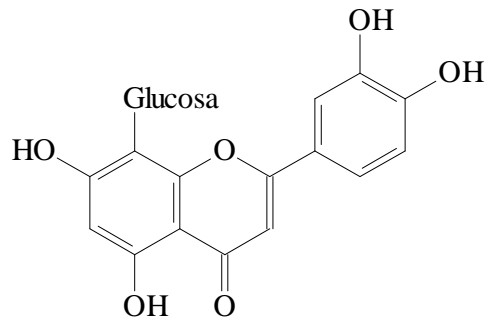
Luteolina



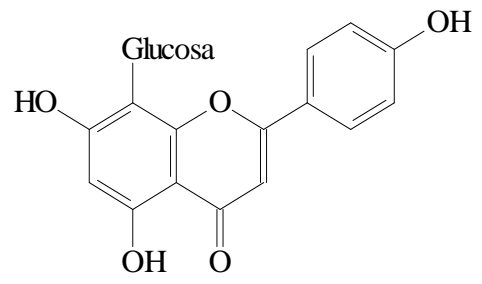
Apigenina



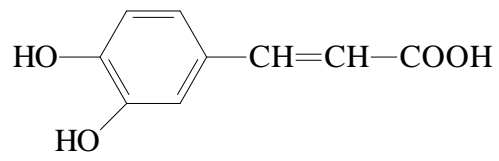
Isorientina



Orientina



Vitexina



Ácido cafeico

ANEXO II

Evaluación de la toxicidad aguda oral del extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE SANTIAGO DE CUBA



INFORME FINAL DE ESTUDIO TOXICOLÓGICO PRECLÍNICO

Evaluación de la Toxicidad Aguda Oral por el Método de las Clases de Toxicidad (CTA) del extracto fluido de las hojas de *Tamarindus indica* L. (tamarindo) en ratas Sprague Dawley.

Año 2009

Título del estudio: Evaluación de la Toxicidad Aguda Oral por el Método de las Clases de Toxicidad (CTA) del extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L.* (Tamarindo) en ratas Sprague Dawley.

Código: 090605

Objetivo: Evaluar la toxicidad de la sustancia de ensayo al administrarla por vía oral en la rata Sprague Dawley.

Solicitante

Nombre y Apellidos: Lic. Jesús Rodríguez Amado.
Profesor Departamento Farmacia. Universidad de Oriente.
Dirección:

Promotor

Nombre de la Institución: Universidad de Oriente
Dirección: Patricio Lumumba s/n

Centro ejecutor

Nombre de la institución: Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED)
Dirección: Autopista Nacional km 1½. AP 4033. Santiago de Cuba. Cuba.
Teléfonos: 0(226) 644095 (Recepción), 643796 (Comercial, Subdirección de Investigaciones), 643993. Fax: 0 (226) 643864.

Información del Director de Estudio

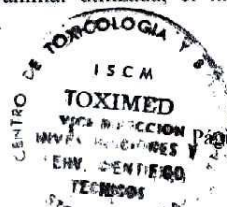
Nombre y Apellidos: MSc. Dr. Alfredo Alfonso Castillo
Dirección: San Carlos No. 430 e/ Calvario y Carnicería. CP. 90 100. Santiago de Cuba. Cuba

Fechas

Fecha de inicio del estudio: 16-6-09
Fecha de terminación del estudio: 30-6-09

Resumen de los resultados

Se evaluó la toxicidad aguda oral del extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L.* (Tamarindo) en ratas Sprague Dawley por el método de las Clases de Toxicidad (CTA). El procedimiento se llevó a cabo según la norma específica de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD 423: 2001). Durante el estudio no se registraron signos clínicos que evidenciaron toxicidad ni se produjo muerte. Igualmente, al examen macroscópico de los órganos no se observaron alteraciones aparentes, exceptuando algunas en el hígado de una de las tres primeras ratas. Por este motivo se realizó el estudio histopatológico del mismo, detectándose pequeños focos de necrosis. No obstante, la sustancia en estudio es considerada como **NO CLASIFICA** teniendo en cuenta la especie animal utilizada, el nivel de dosis seleccionado y las condicionales experimentales observadas.



Otros datos recogidos en el protocolo

Norma de referencia:

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. 423: 2001.

Propósito del Estudio:

El método de las Clases de Toxicidad (CTA) es un método alternativo al ensayo clásico de toxicidad aguda oral que proporciona información acerca del peligro potencial de una exposición única a sustancias químicas. El mismo posibilita la clasificación de esta sustancia atendiendo al grado y tipo de lesión que desencadena.

En la evaluación de las características tóxicas de las sustancias químicas, la determinación de la toxicidad aguda oral constituye un paso inicial imprescindible para el establecimiento posterior de los regímenes de dosis a emplear con diferentes fines, permitiendo, al mismo tiempo, el establecer varias características de la sustancia en estudio.

De igual manera, los datos generados en este tipo de estudio, sirven como base para la clasificación de las sustancias según su grado de peligrosidad.

Justificación del método y sistema de ensayo empleados:

Se empleó este método porque es un método alternativo donde se usa un menor número de animales, cumpliendo así con la REDUCCIÓN, uno de los principios de las 3R. (Reducción, reemplazo y refinamiento)

Identificación de la sustancia de ensayo:

Los datos de la sustancia de ensayo fueron aportados por el cliente y recogidos en la planilla No.1 que se anexa al final de este informe.

Caracterización del sistema de estudio:

La rata Sprague Dawley es una de las líneas establecida por las normas a nivel nacional e internacional con estos fines, por la similitud de su metabolismo con el del ser humano, por la docilidad y estabilidad que muestra en su comportamiento y por su condición de animal no consanguíneo representativo de la heterogénea población humana.

Especie: Rata (rata Norvegicus)
Línea o raza: Sprague Dawley
Número de Animales: 6 ratas hembras. Tres por paso.
Peso promedio: 150 – 200 g
Período de cuarentena: siete días.



Luego de su recepción, se alojaron en el Vivario de TOXIMED con las siguientes condiciones.

- 3 animales por caja de Makrolon modelo 1000.

Condiciones ambientales:

Temperatura: 23 ± 2 °C

Humedad relativa: 30-70 %

Período luz/ oscuridad: 12:12 horas

El lecho fue de viruta de madera no oleosa, cernida y esterilizada.

Alimentación: pienso convencional (ratinina) procedente de CENPALAB y agua potable. Ambos *ad-libitum*.

Método y justificación de la vía de administración:

Se escogió la vía de administración oral porque es la que indica la metodología internacional para los ensayos de este tipo.

Niveles de dosis, concentración, frecuencia y duración de la administración:

En el ensayo se utilizan tres niveles de dosis (2000, 300, 50 y 5 mg/kg de peso corporal). Se comenzó por la más alta (2000 mg/kg de peso corporal) porque es la de mayor probabilidad de ocasionar muerte en los biomodelos. El extracto fluido de las hojas de tamarindo se administró en dosis única y se observó durante 14 días, según especifica la guía.

Recursos empleados:

- Recursos humanos
6 Médicos veterinarios
1 Técnico Medio

- Reactivos
Agua destilada
Formol
Alcohol absoluto
Alcohol etílico al 70%
Xilol
Eosina
Hematoxilina
Bálsamo de Canadá

- Materiales
Tijeras punta roma
Beaker de 5 ml
Sonda gástrica # 10
Jeringuilla de 5 ml
Guantes quirúrgicos
Espátula
Bisturí
Pinza de disección
Porta y cubre objetos
Parafina

- Equipos
Balanza Digital
Micrótopo
Microscopio
Estufa
Baño de María



Procedimiento Experimental:

La recepción de los animales se realizó según las Normas de Control establecidas (PNT 422004) y se revisó el Certificado Higiénico – Sanitario acompañante. Posteriormente se trasladaron a cuarentena (PNT 422005) donde permanecieron durante 7 días.

Unas 24 horas antes de iniciarse el estudio los animales se identificaron por el método de perforación y muescas en las orejas (PNT 422008) y se distribuyeron al azar (según tabla de aleatorización) en cajas de Makrolón modelo 1000, a razón de 3 animales por caja.

Igualmente, 24 horas antes de la administración, se les retiró el alimento y el día señalado para la administración se pesaron según (PNT 422007). En este primer pesaje se determinó el volumen de la sustancia en estudio a administrar. Como nivel de dosis inicial se seleccionó el de 2000 mg/kg de peso corporal, máximo valor límite para este tipo de estudio. Al séptimo día y al decimocuarto los animales fueron pesados nuevamente, con el objetivo de detectar variaciones en el peso corporal durante los días de observación.

La administración se hizo por vía oral con la ayuda de una sonda gástrica # 10 (Vygón, Francia). Luego de 3 horas de concluida la administración se les restituyó a los animales el agua y el pienso.

El ensayo se realizó por pasos: primero tres hembras y luego las tres hembras restantes. Al no manifestarse signo alguno de toxicidad, ni muerte, en las tres primeras ratas al cabo de los 7 días se procedió a administrar a las tres restantes. Como tampoco hubo signos de toxicidad ni muerte, entonces se mantuvieron los 6 animales en estricta observación y valoración clínica durante 14 días que duró el estudio para las tres primeras y 7 días para las tres últimas. Cuando se cumplieron los días de observación, se enviaron a la morgue para practicar la eutanasia a través de la administración de una sobredosis del anestésico Ketamina por vía intraperitoneal (PNT 422022). Luego se procedió al estudio macroscópico de todos los órganos.

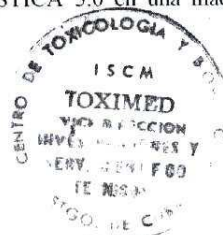
Cálculo y tratamiento estadístico:

El paquete estadístico que se utilizó fue el Statgraph versión 5.1. Para ello se realizó un análisis estadístico a través del contraste múltiple de rango por método de la menor diferencia estadística de Fisher (LSD) a un 95% de nivel de confianza. Este método establece comparación entre las medias de los grupos. Aunque se observó diferencias biológicas con respecto a la ganancia de peso entre los grupos, estadísticamente no la hubo.

Los cálculos se efectuaron con el auxilio del programa ESTATISTICA 5.0 en una máquina Pentium (Celeron).

Las variables procesadas fueron:

- Peso corporal a los 0, 7 y 14 días.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por el interés que merecen las plantas medicinales en nuestro país, el Sistema de Salud inicia, en 1991, el plan de investigaciones de la Medicina Natural y Tradicional, con el objetivo, en ese momento, de validar 60 especies de uso más frecuente en la población. Para la elaboración de productos farmacéuticos a partir de plantas medicinales es necesario seguir una serie de pasos que incluyen investigaciones científicas preclínicas que validen la eficacia terapéutica y su inocuidad. Para cumplimentar este objetivo se realizó este ensayo toxicológico preclínico.

Signos clínicos

Un indicador importante en la determinación de la toxicidad de cualquier sustancia lo constituye la determinación de manifestaciones clínicas, ya que es posible determinar daños asociados a lesiones en sistemas de órganos, que traen por resultado alteraciones en sus funciones. Además se plantea que toda sustancia tóxica produce alteraciones anatomofisiológicas que se manifiestan en modificaciones en el cuadro clínico general, y estas dependen de la severidad y extensión de la lesión, así como de los sistemas de órganos involucrados, duración de la exposición, cantidad total de la sustancia en sangre, edad y salud general del animal (Hayes, 1994). Los resultados muestran que no hubo manifestaciones clínicas indicativas de toxicidad durante todo el tiempo que duró el ensayo, por lo que se confirma de este modo la inocuidad de la sustancia. Estos resultados coinciden con los planteados por Hayes en 1994.

Comportamiento del peso corporal

Según Gad (1994), el peso corporal es frecuentemente el parámetro más sensible para indicar un efecto adverso. Otros autores, como Mosberg (1989), han planteado que los datos referentes al peso corporal poseen una gran sensibilidad para detectar alteraciones debidas a productos químicos de baja toxicidad, mientras que en Harvard Medical Asea (1999), consideran que entre los indicadores que mayor información ofrecen en los estudios toxicológicos se encuentra la pérdida acelerada del peso corporal (aproximadamente del 15 al 29 % de pérdida del peso corporal en un período de cinco a siete días).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede destacar que el incremento de peso corporal observado en los animales de ambos grupos demuestra que la sustancia evaluada no afectó la ganancia del mismo, lo cual confirma que esta sustancia de ensayo no ocasiona efectos adversos indicativos de toxicidad; o sea, se confirma la inocuidad de la sustancia, si tenemos en cuenta que la disminución del peso corporal es un indicador de alteraciones en la salud general del animal. Este comportamiento en el incremento del peso corporal se corresponde con lo planteado por las normas para el uso y cuidado de los animales de laboratorio, en relación con la especie utilizada (Canadian Council on Animal Care, 1993; Alemán, 1998 y 2000).



CONCLUSIONES

1. La sustancia evaluada no produjo signos clínicos que evidenciaran toxicidad ni ocurrieron muertes en el modelo animal utilizado.
2. La sustancia evaluada no afectó la ganancia del peso corporal de los animales.
3. En el estudio se encontraron lesiones macroscópicas en el hígado de una de las tres primeras ratas, al realizársele la histopatología del hígado afectado se halló una ligera alteración hepática.
4. El extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L* (Tamarindo) en dosis de 2000 mg/Kg. de peso corporal, administrada por vía oral, a dosis única, se enmarca como SIN CLASIFICAR en el modelo animal, nivel de dosis utilizado y bajo las condiciones experimentales observadas.

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio subcrónico de 28 días, ya que el producto podría ser utilizado por el hombre por un tiempo mayor.

ARCHIVO

Una porción de la sustancia de prueba, la documentación que se generó a causa del estudio y los datos experimentales primarios, se enviaron al archivo de la Unidad de Garantía de la Calidad del Centro de Toxicología y Biomedicina.



ANEXOS

Tabla 1. Variación del peso corporal (g) de las ratas en el ensayo de Toxicidad Aguda Oral por el Método de las Clases (CTA) del extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L.* (Tamarindo)

Primer paso

Grupo	Animal No.	Sexo	Tiempo (días)		
			0	7	14
Experimental	1	H	230.2	243.1	262.3
	2	H	211.8	229.7	243.7
	3	H	207.8	222.6	238.4

Segundo paso

Grupo	Animal No.	Sexo	Tiempo (días)		
			0	7	14
Experimental	1	H	239.4	247.3	252.3
	2	H	240.4	255.5	262.5
	3	H	240.3	253.6	261.2

H: hembra

Tabla 2. Clasificación de las sustancias. Según la guía 423 (OECD, 2001).

CTA : Rango de la DL_{50}	Clases tóxicas
CTA 0: $DL_{50} > 2000$ mg/kg	No clasificada
CTA 1: $300 < DL_{50} \leq 2000$ mg/kg	Peligrosa
CTA 2 : $50 < DL_{50} \leq 300$ mg/kg	Tóxica
CTA 3 : $DL_{50} \leq 50$	Muy Tóxica



**CONFORMIDAD CON LOS RESULTADOS Y
PROTECCIÓN DE LA INFORMACIÓN CIENTÍFICO - TÉCNICA**

Esta declaración es válida para la Evaluación de la Toxicidad Aguda Oral por el Método de las Clases de Toxicidad (CTA) del extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L* (Tamarindo) en ratas Sprague Dawley con código 090605.

A través del presente documento y conociendo a cabalidad lo orientado y reglamentado por la dirección del Centro de Toxicología y Biomedicina respecto a la protección de la información científico - técnica y del Secreto Estatal cuya violación es sancionable, declaro que:

- No brindaré información confidencial de manera verbal o escrita sobre el estudio a investigadores que no tengan que ver con el mismo, ni a personal distinto al directamente involucrado y comprometido con los resultados.

- No publicaré ni haré alusión a cualquier dato relacionado con el estudio sin expreso consentimiento del cliente y/o promotor.

Para que así conste, a solicitud del Departamento de Unidad de Garantía de la Calidad de Toximed, con el objetivo de adjuntarse en el Informe Final, se firma esta acta en Santiago de Cuba a los ___ días del mes de _____ de _____.

Investigadores:

MSc. Dr. Alfredo Alfonso Casillo

Firma: 

MSc. Dr. Juan Betancourt Hernández

Firma: 

Dr. Edgar Puente Zapata

Firma: 

Dr. Pedro Suárez Arias

Firma: 

Dr. Dany Larramendi Griñan

Firma: 

Dr. Aronl Reiners Miravet

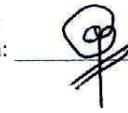
Firma: 

Téc. Hilario Salas Martínez

Firma: 

Director del Estudio:

MSc. Dr. Alfredo Alfonso Castillo

Firma: 



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Canadian Council on Animal Care. Guideline for selecting appropriate end points in specific areas of biomedical research and testing. Guide to the care and use of Experimental Animal. 2da Ed. Chapter VI. Canada, 1993; 1: 22-24.
2. Gad SC, Weil CS. Statistics for toxicologists: En: Principles and methods of toxicologys. 3th ed. New York. Raven Press, 1994; 435-483.
3. Harvard Medical Asea, Guideline. Guidelines for Animal Studies involving death as an end point; 1999.
4. Hayes W. Principles and methods of toxicology. 2nd ed. New York; Raven Press 1994; 54-58, 188-201, 251-307, 407-433.
5. ICNMCC. (Instituto Cubano de Normalización, Metrología y Control de la Calidad. Control de la Calidad. Selección de muestras aleatorias. Tabla. NC-92-09. La Habana: ICNMCC, 1975; 1-14.
6. Mosberg AT, Hayes WA. Subchronic toxicity testing En: Principles and methods of toxicology. 2da. Ed, editado por A Wallace Hayes. Raven Press, Ltd; New York; 1989.
7. OECD Guideline for the testing of chemicals. Acute oral toxicity class method. Revised draft guideline 423. OECD, París, 2000.
8. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Recepción de animales sometidos a estudios toxicológicos. Código, 422004. TOXIMED, 2007.
9. PNT. Prcedimiento Normalizado de Trabajo. Pesaje de animales de laboratorio sometidos a estudios toxicológicos. Código, 422007. TOXIMED, 2007.
10. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Cuarentena de animales de laboratorio sometidos a estudios toxicológicos. Código, 422005. TOXIMED, 2007.





**INFORME FINAL
DE ESTUDIO TOXICOLÓGICO PRECLÍNICO**

11. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Identificación individual y colectiva de animales de laboratorio sometidos a estudios toxicológicos. Código, 422008. TOXIMED, 2007.
12. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Observación clínica, palpación e inspección de los animales. Código, 422010. TOXIMED, 2007.
13. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Administración de sustancias por vía oral y parenteral. Código, 422022. TOXIMED, 2007.



Planilla No.1

IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

NOMBRE: Extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L.* (Tamarindo)

Naturaleza de la sustancia: Natural

Principio activo: Mezcla compleja de polifenoles, flavonoides, aceites esenciales, ácidos grasos, carbohidratos, saponinas triterpénicas.

Fuente de obtención del principio activo: Hojas adultas de la planta, secadas al sol.

Descripción: Solución hidroalcohólica, rica en polifenoles, flavonoides y carbohidratos, extraídos de las hojas de la planta.

Composición:

Sólidos totales: 15 - 20 %

Concentración de fenoles: 1.8 mg/mL

Concentración de flavonoides: 3.4 µg/mL

Concentración de carbohidratos: 32 mg/mL

CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS:

Presentación: líquido

Color: Carmelita claro

Concentración: 25 mg/L.

PH: 3.2 - 4.1

Estabilidad: Proteger de la luz, inestabilidad ante bases débiles

Tipo de Material: Biotecnológico, corrosivo

ASPECTOS FARMACOLÓGICOS.

Efecto terapéutico: hepatoprotector, antioxidante

Vía de administración: oral

Biomodelo empleado: Intoxicación con tetracloruro de carbono

Efectos secundarios: no conocidos

DATOS DE CONSERVACION

Temperatura de almacenamiento: Fresca

Fotosensible

Frasco ámbar, tapa, bakelita



ANEXO III

Evaluación de la irritabilidad de la mucosa oral producida por extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L.



INFORME FINAL
DE ESTUDIO TOXICOLÓGICO PRECLÍNICO

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
UNIVERSIDAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE SANTIAGO DE CUBA



INFORME FINAL DE ESTUDIO TOXICOLÓGICO PRECLÍNICO

Evaluación de la Irritabilidad de la mucosa oral del hámster sirio dorado producida por el extracto fluido de hojas de *Tamarindus Indica* L (Tamarindo).

Año 2009

INFORME FINAL
DE ESTUDIO TOXICOLÓGICO PRECLÍNICO

Título del estudio: Evaluación de la Irritabilidad de la mucosa oral del hámster sirio dorado producida por el extracto fluido de hojas de *Tamarindus Indica L* (Tamarindo).

Código: 091110

Objetivo: Determinar el potencial irritante de la mucosa oral del hámster sirio dorado producida por el extracto fluido de hojas de *Tamarindus Indica L* (Tamarindo).

Solicitante:

Nombre y Apellidos: Lic. Jesús Rodríguez Amado.
Profesor Departamento de Farmacia. Universidad de Oriente.

Dirección:

Promotor:

Nombre de la Institución: Universidad de Oriente
Dirección: Ave. Patricio Lumumba s/n

Centro ejecutor:

Nombre de la institución: Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED)
Dirección: Autopista Nacional Km 1 ½. Apartado: 4033. Santiago de Cuba. Código Postal: 90400, Cuba.
Teléfonos: (53) (22)-643926, 644095, 643796
Fax: (53) (22)-68-7188

Información del Director de Estudio:

Nombre y Apellidos: MSc. Dr. Alfredo Alfonso Castillo
Dirección: San Carlos No. 430 e/ Calvario y Carnicería. CP. 90 100. Santiago de Cuba. Cuba.

Fechas:

Fecha de inicio del estudio: 27-10-09
Fecha de terminación del estudio: 28-10-09

Resumen de los Resultados

Se evaluó el nivel de irritabilidad de la mucosa oral causada por el extracto fluido de hojas de *Tamarindus Indica L* (Tamarindo), usando el biomodelo hámster sirio dorado. El ensayo de irritación oral debe solamente considerarse para los materiales con contacto previsto con el tejido oral y si los datos de seguridad no pueden obtenerse por ningún otro medio. El principio del estudio es hacer una evaluación del potencial irritante del material objeto del ensayo para producir la irritación del tejido oral. Cualquier material que haya demostrado ser un irritante dérmico u ocular o aquel cuyo pH sea menor que 2 o mayor que 11,5 no debe someterse a ensayo y debe identificarse como un irritante potencial del tejido oral. Para realizar este ensayo se utilizaron 6 animales distribuidos en dos grupos: uno Experimental y otro Control. En tres animales cada uno. Durante el ensayo no hubo signos clínicos que evidenciaran toxicidad del producto, tampoco se produjo muerte de ningún animal. Se comprobó que el peso de los animales



estaba en el rango establecido para este tipo de estudio. Según el examen anatomopatológico, el grupo experimental mostró reacciones inflamatorias a nivel de la mucosa oral, con un promedio del índice de Irritación de 1,3 (MÍNIMO). Entonces la sustancia se **APRUEBA** para uso humano.

Otros datos recogidos en el Protocolo

Norma de referencia:

Norma ISO 10993-10. Epigrafe B-4. 2002. Evaluación biológica de productos sanitarios. Ensayos de irritación y de hipersensibilidad retardada. Ensayo de irritación de la mucosa oral.

Propósito del Estudio:

El ensayo de Irritabilidad de la mucosa oral se aplica a aquellas sustancias que puedan tener contacto con este epitelio. Puede emplearse además en el caso en que los datos de seguridad del producto no puedan ser obtenidos por otro medio.

Justificación del método y sistema de ensayo empleados:

La formulación es propuesta como producto hepatoprotector y antioxidante y será administrado por vía oral. Por tanto, se pondrá en contacto con la mucosa bucal; por lo que debe conocerse el daño potencial que a ésta pudiera ocasionar. Por otra parte, este método es el utilizado internacionalmente para evaluar este tipo de afectación y tanto la vía como la duración de la administración utilizadas son las planteadas por la norma de referencia.

Identificación de la sustancia de ensayo:

Los datos de la sustancia de ensayo fueron aportados por el cliente y recogidos en la planilla No. 1 que se anexa al final de este informe.

Caracterización del sistema de estudio:

Especie: hámster sirio dorado

Sexo: hembras

Peso: 50 - 60 g.

Número de Animales: 6

Procedencia: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), La Habana.

Estado sanitario: animales sanos, según muestran los respectivos certificados de salud y los estudios confirmatorios realizados en TOXIMED.

Distribución: Grupo Experimental y Grupo Control (2 grupos) con 3 animales cada uno.

Período de cuarentena: 7 días



Condiciones ambientales:

Temperatura: 22 ± 3 °C

Humedad relativa: $60 \pm 10\%$

Ciclo de luz / oscuridad: 12:12

Alimentación: pienso convencional (ratonina), procedente de CENPALAB y agua. Ambos *ad-libitum*.

Recursos empleados:

- Recursos humanos
- 6 Médicos veterinarios
- 1 Técnico Medio

- Reactivos
- Agua destilada
- Formol
- Alcohol absoluto
- Alcohol etílico al 70%
- Xilol
- Eosina
- Hematoxilina
- Bálsamo de Canadá

- Materiales
- Tijeras punta roma
- Gasa de uso quirúrgico
- Beaker de 5 ml
- Guantes quirúrgicos
- Espátula
- Bisturí
- Pinza de disección
- Porta y cubre objetos
- Parafina
- Tubo de ensayo plástico
- Collar de goma

- Equipos
- Balanza Digital
- Micrótomo
- Microscopio
- Estufa
- Baño de María

Procedimiento experimental:

El ensayo de irritación de la mucosa oral se realizó según lo planteado en la norma de referencia utilizada y aceptada internacionalmente.

A los animales del grupo experimental se les colocó un pellet de algodón embebido en la solución de ensayo en la bolsa malar derecha 5 minutos cada hora durante 4 horas. Pasados estos 5 minutos de exposición del pellet se lavó la bolsa con solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 % y se observó macroscópicamente, las cuatro veces, cualquier anomalía que pudiera aparecer en la mucosa. Se describió la apariencia de la mucosa de las bolsas de cada animal y el grado de reacción de las superficies para eritemas de acuerdo con la tabla de Draize. Los resultados fueron registrados. Luego se tomaron muestras de tejidos de las áreas representativas de las bolsas, las cuales fueron enviadas al Laboratorio de Anatomía Patológica.

Para realizar el análisis anatómo-histopatológico se utilizaron los manuales y Procedimientos Normalizados de Trabajo del Laboratorio de Anatomía Patológica de TOXIMED según como se especifica en el Protocolo correspondiente.



INFORME FINAL
DE ESTUDIO TOXICOLÓGICO PRECLÍNICO

CONCLUSIONES

Los animales fueron sometidos a la administración aguda del extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L.* (Tamarindo), un producto de origen natural. El resultado medio del índice de Irritación es de 1,3 (**MINIMO**). Por tanto, la sustancia se **APRUEBA**.

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio a dosis repetidas durante 7 días o más.

ARCHIVO

Una porción de la sustancia de ensayo, el Protocolo, los datos primarios y otra documentación generada durante el estudio permanecerán en el archivo de la Unidad de Garantía de la Calidad del Centro de Toxicología y Biomedicina por 10 años.



Durante el período de observación se evaluó el comportamiento, la conducta, el estado general, la postura, los reflejos, la actitud hacia los alimentos y el agua y los hábitos de higiene de los biomodelos experimentales utilizados.

Cálculo y tratamiento estadístico:

Para determinar el nivel de irritabilidad provocado por el producto en cuestión se utilizan las tablas que aparecen en la norma de referencia para clasificar la reacción de tejidos y el índice de irritación. En esta última, la sustancia según un resultado medio, puede tener un índice de irritación: Ninguno, Mínimo, Medio, Moderado o Severo. El hecho de que un producto pertenezca a una de las dos últimas clasificaciones es criterio para que su uso en humanos sea rechazado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- ❖ **Signos clínicos**
El comportamiento en general de los animales fue el normal para la especie. Durante el ensayo no hubo signos clínicos que evidenciaran la toxicidad del producto, tampoco se produjo muerte de ningún biomodelo experimental.
- ❖ **Peso corporal**
Se comprobó que el peso de los animales estaba en el rango establecido para este tipo de estudio.
- ❖ **Evaluación macroscópica**
No se observaron alteraciones a la inspección macroscópica en los animales en experimentación.

Conclusión anatomopatológica:

En los animales del grupo experimental se observó infiltrado inflamatorio agudo moderado en músculo liso, con un resultado medio del índice de Irritación de 1,3, clasificándose como MINIMO, o sea, la sustancia se APRUEBA



**CONFORMIDAD CON LOS RESULTADOS Y
PROTECCIÓN DE LA INFORMACIÓN CIENTÍFICO – TÉCNICA**

Esta declaración es válida para el Estudio Toxicológico de Evaluación de la Irritabilidad de la mucosa oral del hámster sirio dorado por el extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L.* (Tamarindo) con código: 091110.


A través del presente documento y conociendo a cabalidad lo orientado y reglamentado por la dirección del Centro de Toxicología y Biomedicina respecto a la protección de la información científico - técnica y del Secreto Estatal cuya violación es sancionable, declaro que:

- No brindaré información confidencial de manera verbal o escrita sobre el estudio a investigadores que no tengan que ver con el mismo, ni a personal distinto al directamente involucrado y comprometido con los resultados.
- No publicaré ni haré alusión a cualquier dato relacionado con el estudio sin expreso consentimiento del cliente y/o promotor.

Para que así conste, a solicitud del Departamento de Unidad de Garantía de la Calidad de Toximed, con el objetivo de adjuntarse en el Informe Final, se firma esta acta en Santiago de Cuba a los ___ días del mes de _____ de _____.

Investigadores:

MSc. Dr. Alfredo Alfonso Casillo

Firma: 

MSc. Dr. Juan Betancourt Hernández

Firma: 

Dr. Edgar Puente Zapata

Firma: 

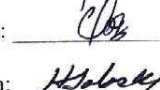
Dr. Pedro Suárez Arias

Firma: 

Dr. Dany Larramendi Griñan

Firma: 

Dr. Aronl Reiners Miravet

Firma: 

Téc. Hilario Salas Martínez

Firma: 

Director del Estudio:

MSc. Dr. Alfredo Alfonso Castillo

Firma: 



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol and Exp. Therap.* 1944:377.
2. Guillot J P, Gonnet JF, Clement C. Evaluation of the cutaneous irritation potencial of 56 compounds. *Gd. Chem.Toxic*; 1982.
3. Repetto MR. "Toxicología Experimental" 2da. Ed. Barcelona: Científico-Médica, 1988: 408.
4. García G. y col *Rev. Cub. Farm.* 22, 25, 1988.
5. ISO 10993- 10. Evaluación Biológica de Productos Sanitarios. Ensayo de irritación de la mucosa oral, 2002.
6. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Ensayo de Irritabilidad de la mucosa oral. Código, 422031. TOXIMED, 2007.
7. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Determinación de dosis. código, 352007. TOXIMED, 2007.
8. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Recepción de animales sometidos a estudios toxicológicos. Código, 422004. TOXIMED, 2007.
9. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Pesaje de animales de laboratorio sometidos a estudios toxicológicos. Código, 422007. TOXIMED, 2007.
10. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Cuarentena de animales de laboratorio sometidos a estudios toxicológicos. Código, 422005. TOXIMED, 2007.
11. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Identificación individual y colectiva de animales de laboratorio sometidos a estudios toxicológicos. Código, 422008. TOXIMED, 2007.
12. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Manipulación de animales de laboratorio. Código, 422006. TOXIMED, 2007.
13. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Control ambiental de las salas de animales. Código, 422019. TOXIMED, 2007.
14. PNT. Procedimiento Normalizado de Trabajo. Observación clínica, palpación e inspección de los animales. Código, 422010. TOXIMED, 2007.

Planilla No. 1

IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

NOMBRE: Extracto fluido de las hojas de *Tamarindus Indica L* (Tamarindo).

Naturaleza de la sustancia: Natural

Principio activo: Mezcla compleja de polifenoles, flavonoides, aceites esenciales, ácidos grasos, carbohidratos, saponinas triterpénicas.

Fuente de obtención del principio activo: Hojas adultas de la planta, secadas al sol.

Descripción: Solución hidroalcohólica, rica en polifenoles, flavonoides y carbohidratos, extraídos de las hojas de la planta.

Composición:

Sólidos totales: 15-20 %

Concentración de fenoles: 1.8 mg/mL

Concentración de flavonoides: 3.4 mg/mL

Concentración de carbohidratos: 32 mg/mL

CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS:

Presentación: líquido

Color: Carmelita claro

Concentración: 25 mg/L

pH: 3.2 – 4.1

Estabilidad: Proteger de la luz, inestabilidad ante bases débiles

Tipo de Material: Biotecnológico, corrosivo

ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

Efecto terapéutico: hepatoprotector, antioxidante

Vía de administración: oral

Biomodelo empleado: Intoxicación con tetracloruro de carbono

Efectos secundarios: no conocidos

DATOS DE CONSERVACION

Temperatura de almacenamiento: Fresca

Fotosensible

Frasco ámbar, tapa bakelita



ANEXO IV

Validación del método de determinación de fenoles totales por reacción con el reactivo de Folin Ciocalteau en el extracto fluido en etanol al 70% de hojas de *Tamarindus indica* L.

Registro de datos en el cálculo de la linealidad del sistema y del modelo.

Sistema (ácido Tánico)					Método (3mL Muestra + ácido tánico)				
Ca (µg)	Abs	Cr (µg)	CVFR	% Rec.	Ca (µg)	Abs	Cr (µg)	CVFR	% Rec.
4	0,228	3,99	0,06	99,75	15	0,018	14,79	0,26	98,60
6	0,333	6,01	0,05	100,17	30	0,052	29,90	0,29	99,67
8	0,446	8,187	0,06	102,34	45	0,090	45,47	0,35	101,04
10	0,555	10,28	0,05	102,80	60	0,120	60,59	0,21	100,98
12	0,637	11,863	0,05	98,86	75	0,154	76,16	0,11	101,55
14	0,739	13,827	0,05	98,76	90	0,180	90,36	0,19	100,40
-	-	-	-	-	105	0,216	105,02	0,18	100,02
Coeficiente de Correlación = 0,9991					Coeficiente de Correlación = 0,9999				
Coeficiente de Determinación= 0,9983					Coeficiente de Determinación= 0,9998				
Intervalo del intercepto= - 0,424/0,423					Intervalo del intercepto= - 1,0481/1,0452				
Intervalo de la pendiente= 0,953/1,0472					Intervalo de la pendiente= 0,9898/1,0210				
Análisis de Varianza $p_{valor}= 0,000$					Análisis de Varianza $p_{valor}= 0,000$				
Ca→ Cantidad Añadida Abs→ Absorbancia					Cr→ Cantidad Recuperada				
CVFR→ Coeficiente de Variación del Factor Respuesta					% Rec. Por ciento Recuperado				

Registro de datos en el cálculo de la selectividad.

Ca (µg)	0	15	30	45	60	75	90	105
Absorbancia	0,384	0,402	0,436	0,474	0,504	0,538	0,564	0,600
D. Estándar	0,0010	0,0012	0,0015	0,0010	0,0006	0,0010	0,0010	0,0006
CVFR	0,26	0,29	0,35	0,21	0,11	0,19	0,18	0,10
Coeficiente de Correlación = 0,9984								
Coeficiente de Determinación= 0,9968								
Intervalo de confianza del intercepto= 0, 3738/0,3848								
Prueba C de Cochran , $p_{valor}= 0,8024$								
Ca→ Cantidad añadida				CVFR→ Coeficiente de Variación del Factor Respuesta				

Registro de datos en el cálculo de la exactitud.

Cantidad Añadida (μg)	Absorbancia	Cantidad recuperada (μg)	Desviación Estándar	CVFR	% Recuperación
0	0,384	0,830	0,001	0,26	-
45	0,474	43,83	0,001	0,21	97,41
75	0,538	74,41	0,001	0,27	99,21
105	0,600	105,47	0,001	0,19	100,44

Coefficiente de Correlación = 0,9985

Coefficiente de Determinación = 0,9969

Intervalo de confianza del intercepto = - 4,1457/4,3209

Intervalo de confianza de la pendiente = 0, 9344/1,0583

CVFR \rightarrow Coeficiente de Variación del Factor Respuesta

Registro de datos en el cálculo de la precisión.

Cantidad Añadida (μg)	Réplicas/absorbancia									CVFR
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
15	0,401	0,403	0,403	0,406	0,407	0,407	0,407	0,406	0,406	0,54
60	0,503	0,504	0,504	0,504	0,505	0,505	0,507	0,507	0,505	0,27
105	0,600	0,600	0,601	0,603	0,603	0,603	0,605	0,605	0,604	0,32

Prueba C de Cochran $p_{\text{valor}} = 0,4987$

CVFR \rightarrow Coeficiente de Variación del Factor Respuesta

Registro de datos en el cálculo de la Robustez.

Experimento	Tiempo (días)	Analista		Experimento	Tiempo (días)	Analista	
		A ₁	A ₂			A ₁	A ₂
1	0	0,339	0,347	3	0	0,339	0,347
1	0	0,340	0,348	3	0	0,340	0,349
1	0	0,341	0,349	3	0	0,341	0,348
2	15	0,347	0,343	4	15	0,349	0,345
2	15	0,347	0,344	4	15	0,349	0,343
2	15	0,349	0,345	4	15	0,347	0,344

BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR

Publicaciones en el tema de tesis:

1. Escalona-Arranz JC, Peres-Rosés R, Urdaneta I, Camacho M, Rodríguez-Amado J, Licea-Jiménez I. Evaluation of the antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves. *Pharmacognosy Magazine*. 2010; 6(23): 242-247.
2. Escalona-Arranz JC; Pérez-Rosés R; Licea-Jiménez I; Rodríguez-Amado JR; Argota-Coello H, Cañizares-Lay J, Morris-Quevedo HJ, Sierra-González GV. Chemical constituents of *Tamarindus indica* L. leaves. *Revista Cubana de Química*. 2010; XII (3): 65-71.
3. Pino JA, Escalona-Arranz JC, Licea-Jiménez I, Pérez-Rosés R, Agüero-Agüero J. Leaf oil of *Tamarindus indica* L. *Journal of Essential Oil Research. JEOR*, 2002, 14(3): 187-188.
4. Escalona-Arranz JC, Villalón C, Rondón L, Escudero M. Pérez R. Dinámica de acumulación de flavonoides en las hojas de una población de *Tamarindus indica* L. *Revista Cubana de Química*. 2001, Vol. XIII, Nº 3: 3-8.
5. Dehesa MA, Escalona-Arranz JC, Padilla S. Evaluación Preclínica de Extractos Flavonólicos de las Hojas de *Tamarindus indica* L. *Etnomedicina*; 1995; 1: 157-168.
6. Dehesa MA, Escalona-Arranz JC, Santisteban R, Lores D. Evaluación Químico Farmacéutica de las hojas del *Tamarindus indica* L. *Etnomedicina*, 1995; 1: 147-156.

Artículos en el tema de tesis aceptados para publicación

1. Rodríguez-Amado JR, Lafourcade-Prada A, Escalona-Arranz JC. Formulación de comprimidos de tamarindo por el método de granulación húmeda. **Aceptado para publicación en** *Revista Cubana de Farmacia* 2011; Vol. 45, No. 3.
2. Rodríguez-Amado JR, Lafourcade-Prada A, Escalona-Arranz JC, Iraizoz-Colarte A. Preformulación de tabletas de *Tamarindus indica* L. **Aceptado para publicación en** *Revista Cubana de Farmacia* 2011; Vol. 45, No. 4.
3. Rodríguez-Amado JR, Escalona-Arranz JC, Rodríguez-Romero R, González Olivero Y. Validación del método de cuantificación de polifenoles en el extracto fluido de las hojas de la especie *Tamarindus indica* L. *Revista Cubana de Química* 2011; Vol. XXIII, No. 1.

Artículos en el tema de tesis enviados para publicación

1. Escalona-Arranz JC; Rodríguez-Amado JR; Pérez-Rosés R; Cañizares-Lay J; Sierra-González GV; Morris-Quevedo HJ; Licea-Jiménez I. Metabolites extraction optimization in

Tamarindus indica leaves using response surface methodology and their accumulation.
Enviado a: BLACPMA. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.

2. **Escalona-Arranza JC**, Pérez-Rosés R, Morris-Quevedo H, Urdaneta-Laffita I, Camacho-Pozo MI, Rodríguez-Amado J, Sierra-González GV, Licea-Jiménez I. A plausible explanation to the role of polyphenols in the antimicrobial activity of tamarind leaves fluid extract.

Enviado a: *Pharmacognosy Magazine*.

Participación en Eventos Científicos:

1. III Conferencia Científica Internacional Sobre Cultura Africana y Afroamericana. (1994). “Evaluación Preclínica de Extractos Flavonólicos de las Hojas de *Tamarindus indica* L”.
2. XIV Conferencia Internacional de Química de la Universidad de Oriente, (1994). “Evaluación Químico Farmacéutica de las hojas del *Tamarindus indica* L.”
3. IV Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, **Ecuador**. (1995). Dos trabajos. “Evaluación Preclínica de Extractos Flavonólicos de las Hojas de *Tamarindus indica* L.” y “Evaluación Químico Farmacéutica de las hojas del *Tamarindus indica* L.”
4. Primer Taller Nacional de Productos Naturales (1998). “Evaluación mensual de flavonoides en hojas de *Tamarindus indica* L.”
5. VII Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas. (1998). “Estudio por CG/EM de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L.”
6. III Conferencia de la Sociedad Cubana de Química, (1998). “Estudio por CG/EM y HPTLC/UV-visible de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L.”
7. XVII Conferencia Internacional de Química de la Universidad de Oriente. (2002). “Aceites esenciales de hojas de *Tamarindus indica* L”.
8. III Simposio Internacional de Química SIQ 2007, Universidad Central de las Villas Martha Abreu. (2007). “Evaluation of the antimicrobial and antifungal activity of essential oils from *Tamarindus indica* L”.
9. FAPRONATURA 2009. Second International Symposia on Pharmacology of Natural Products. (1 ponencia). (2009). Antimicrobial activity of extracts from *Tamarindus indica* L. leaves”.

10. ProMedNatur 2010. IV congreso Iberoamericano y del Caribe de Productos y Medicinas Naturales. (2010). "Obtención y caracterización de un granulado antioxidante a partir de extractos de la especie *Tamarindus indica* L".

Memorias Tesis de Maestría (Maestría en Medicina Natural y Bioenergética)

"Estudio Químico Farmacéutico de las hojas de *Tamarindus indica* L. Valoración teórica de la actividad de sus flavonoides." (Facultad de Ciencias Médicas I, Santiago de Cuba, Julio 2005).

Trabajos de Diploma dirigidos en la temática:

1. "Evaluación mensual de la acumulación de flavonoides en hojas de *Tamarindus indica* L." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Oriente 1997)
2. "Separación por HPTLC y estudio por Espectroscopia UV de los flavonoides del *Tamarindus indica* L. " (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Oriente 1998)
3. "Análisis cualitativo por CG/EM de fracciones de cloroformo y n-hexano de las hojas de *Tamarindus indica* L." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Oriente 1998)
4. "Establecimiento y validación de un método espectrofotométrico para la cuantificación de polifenoles totales en el extracto fluido de *Tamarindus indica* L." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2007)
5. "Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2007)
6. "Evaluación de la capacidad extractiva de diferentes soluciones hidroalcohólicas en las hojas de la especie *Tamarindus indica* L." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2007)
7. "Evaluación de la capacidad antioxidante de extractos de hojas del *Tamarindus indica* L. en diferentes estados fisiológicos de la planta." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2008)
8. "Evaluación del poder reductor de extractos de hojas del *Tamarindus indica* L. en diferentes estados fisiológicos de la especie." (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2008).
9. Evaluación de la capacidad de acomplejante de Fe^{2+} por extractos de hojas del *Tamarindus*

indica L. (Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente 2009)

Distinciones y Reconocimientos

1. Mención del Fórum Científico Estudiantil de la Universidad de Oriente. (1993). Estudio Químico-Farmacéutico de las hojas de *Tamarindus indica* L. (Autor)
2. Premio Relevante del Fórum Provincial de Sociedades Científicas de Santiago de Cuba. (1994). Evaluación Preclínica de Extractos Flavonólicos de las Hojas de *Tamarindus indica* L. Tribunal de Fitofármacos. (Autor).
3. Premio Relevante del Fórum Científico Nacional Estudiantil. (1995). Evaluación Preclínica de Extractos Flavonólicos de las Hojas de *Tamarindus indica* L. (Autor).
4. Logro científico de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad de Oriente (2007). “Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de extractos de *Tamarindus indica* L.”
5. Premio Relevante en el Fórum Nacional Estudiantil de Ciencia y Técnica. (2008). “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *Tamarindus indica* L.” (Coautor, Tutor)
6. Coautor del resultado al Logro científico ya aplicado de mayor aporte social de la Universidad de Oriente (2010). “Implementación de servicios farmacéuticos y Medicina Complementaria en función del desarrollo social local y la calidad de vida.”

Otras publicaciones relacionadas con la temática de fitoquímica y plantas medicinales.

1. Guerra-Betancourt K, Carrasco-Velar R, **Escalona Arranz JC**, Centeno-Garrido J. Estudio QSAR de flavonoides con actividad estrogénica. Revista Cubana de Química. 1999; Vol. XI, N° 1: 69-73
2. **Escalona Arranz JC**, Carrasco-Velar R, Guerra-Betancourt K, Centeno-Garrido J. Estudios de Relación Estructura Actividad de flavonoides con acción estrogénica. Revista CENIC de Ciencias Químicas 2000, No. 1: 27-33.
3. Paján-López M, Villalón-Revilla, **Escalona-Arranz JC**, Bordiés A, Valdés A. Determinación de los posibles tipos de flavonoides presentes en el limo medicinal, materia prima. Revista Cubana de Química, 2002, Vol. XIV, N° 3: 16-23.
4. Acevedo-Martínez J, Zenkevich IG, Aguilera I, **Escalona-Arranz JC**. Posibilidades del sistema de índices de Kovats en la Química Orgánica. ICIDCA No.2, 2004: 35-38.