



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Evaluación de las interacciones  
vasculares de los principales  
metabolitos activos presentes en *Croton  
schiedeanus* (“Almizclillo”).**

**Alejandra Paola Ortiz Sánchez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá D. C., Colombia  
Mayo, 2018



# **Evaluación de las interacciones vasculares de los principales metabolitos activos presentes en *Croton schiedeanus* (“Almizclillo”).**

**Alejandra Paola Ortiz Sánchez**

Tesis presentada como requisito para optar al título de:  
**Magíster en Ciencias - Farmacología**

Director (a):

PhD. Mario Francisco Guerrero Pabón

Línea de Investigación:

Farmacología Experimental Cardiovascular y del Sistema Nervioso

Grupo de Investigaciones en Farmacología Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá D. C., Colombia

Mayo, 2018



*A mis padres, por su infinito amor, esfuerzo y apoyo incondicional en cada una de  
mis decisiones y proyectos.*

*A mi hermanito, mi mejor amigo y confidente.*

*A Dios, dueño y arquitecto de mi vida.*

# Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias y al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia. Al profesor Luis Fernando Ospina y al Bioterio del mismo Departamento, sin ellos no hubiese sido posible el desarrollo de este trabajo.

De manera muy especial, al profesor Mario Francisco Guerrero, por todo el tiempo invertido en pro de esta investigación, por su nobleza, sencillez, voluntad y amistad en todo momento.

A Lizeth Bareño, por su amistad, compañerismo y brindarme siempre su ayuda cada vez que lo necesité.

## Resumen

La terapia combinada es una estrategia terapéutica eficaz en clínica cuando los agentes a utilizar mejoran la respuesta farmacológica, y a la vez, permiten reducir las dosis y el riesgo de potenciales efectos adversos (Wagner, 2011). Con este enfoque terapéutico se buscan, nuevas alternativas terapéuticas que ayuden a reducir el aún notable impacto de la hipertensión arterial en salud pública. Fuentes terapéuticas de origen natural podrían proporcionar metabolitos activos que, interactuando de modo sinérgico, ofrezcan nuevas opciones farmacológicas de terapia combinada.

De *Croton schiedeanus*, (N.V. “almizclillo”), especie utilizada tradicionalmente en Colombia con fines antihipertensivos, se han aislado e identificado como metabolitos principales los flavonoides 3,7-Di-O-metilquercetina (DMQ) y 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina), agentes a los que se les ha determinado su perfil vasodilatador, ligado al menos en parte a la ruta metabólica de óxido nítrico (NO) y guanilato ciclasa, no se les había estudiado hasta la fecha su posible interacción sinérgica. Con ese fin, en este trabajo se examinó el efecto vasodilatador obtenido con ayanina ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$  –  $6 \times 10^{-5} \text{M}$ ) en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de DMQ ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$  –  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ), frente a anillos aislados de aorta de rata previamente contraídos con fenilefrina ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ). Igualmente, se comparó el efecto concentración - respuesta de esos flavonoides frente al extracto total ( $1 \times 10^{-7} \text{mg/mL}$  –  $3 \times 10^{-4} \text{mg/mL}$ ), así como su comportamiento en presencia del inhibidor de óxido nítrico L-NAME ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ) o del inhibidor de guanilato ciclasa azul de metileno ( $1 \times 10^{-4} \text{M}$ ).

Los resultados mostraron que DMQ ejerce un efecto dual sobre ayanina; de tipo antagónico a bajas concentraciones ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$  –  $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ), y sinérgico a mayores concentraciones ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$  –  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ), efecto que es atenuado, pero no revertido por L-NAME y azul de metileno. Adicionalmente, el uso combinado de ayanina y DMQ supera en potencia y eficacia el efecto vasodilatador encontrado en el extracto total ( $CE_{50}$  de  $1,2 \times 10^{-7} \text{M}$ ;  $pD_2$  de 6,9 y  $E_{m\acute{a}x}$  de  $170,1 \pm 2,0$  versus  $CE_{50}$  de  $7,6 \times 10^{-5} \text{M}$ ;  $pD_2$  4,1 y  $E_{m\acute{a}x}$  de  $101,6 \pm 3,1$  respectivamente).

Estos resultados sugieren que la administración combinada de ayanina y DMQ en proporciones adecuadas, ejercerían un efecto sinérgico vasodilatador que no depende exclusivamente de la ruta metabólica NO/guanilato ciclasa; dando soporte al posible uso como fuente terapéutica con acción vasodilatadora.

**Palabras clave:** ayanina, flavonoide, óxido nítrico, guanilato ciclasa, sinergia, antagonismo.



# Contenido

<b>Introducción</b> .....	<b>14</b>
<b>1. Capítulo 1</b> .....	<b>18</b>
1.1 Marco teórico.....	18
1.1.1 La sinergia en el estudio del efecto farmacológico.....	18
1.1.2 Flavonoides.....	19
1.1.3 <i>Croton schiedeanus</i> o “Almizclillo”.....	22
1.1.4 Baño de órgano aislado.....	23
1.2 Estado del arte.....	24
<b>2. Capítulo 2</b> .....	<b>27</b>
2.1 Justificación.....	27
2.2 Planteamiento del problema.....	29
2.3 Hipótesis.....	30
<b>3. Capítulo 3</b> .....	<b>31</b>
3.1 Objetivo general.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	32
<b>4. Capítulo 4</b> .....	<b>33</b>
4.1 Materiales y Reactivos.....	33
4.2 Metodología.....	34
4.2.1 Recolección del material vegetal.....	34
4.2.2 Obtención del extracto.....	34
4.2.3 Aislamiento e identificación de los principales metabolitos de <i>Croton schiedeanus</i> 34	
4.2.4 Descripción de la técnica de Baño de Órgano Aislado.....	35
4.2.5 Protocolos de trabajo.....	36
Protocolo 1.....	36
Protocolo 2.....	36
Protocolo 3.....	37
Protocolo 4.....	37
4.3 Análisis estadístico.....	39
<b>5. Capítulo 5</b> .....	<b>40</b>
5.1 Resultados.....	40
5.2 Discusión de resultados.....	50
<b>6. Capítulo 6</b> .....	<b>55</b>
6.1 Conclusiones.....	55
6.2 Recomendaciones.....	56
<b>Aspectos éticos, legales y ambientales</b> .....	<b>57</b>
Aspectos éticos y legales.....	57
Impacto ambiental.....	57
<b>Grupo de investigación que soportó la investigación</b> .....	<b>58</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>59</b>

## Contenido de tablas

<b>Tabla 1.</b> Estructura química básica de los principales grupos de flavonoides .....	21
<b>Tabla 2.</b> Valores de CE <sub>50</sub> y de pD <sub>2</sub> , de Ayanina, DMQ y extracto etanólico de <i>Croton schiedeanus</i> .....	41
<b>Tabla 3.</b> Valores de CE <sub>50</sub> y de pD <sub>2</sub> , de Ayanina y DMQ. ....	42
<b>Tabla 4.</b> Concentración efectiva cincuenta de ayanina en presencia y ausencia de DMQ (1x10-8M, 3x10-8M, 1x10-7M y 3x10-7M), en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina. ....	44
<b>Tabla 5.</b> Concentración efectiva cincuenta de ayanina en presencia y ausencia de DMQ (1x10-6M, 3x10-6M, 1x10-5M y 3x10-5M), en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina. ....	45
<b>Tabla 6.</b> Concentración efectiva cincuenta de ayanina en presencia de DMQ 3x10-5M; y en extracto de <i>Croton schiedeanus</i> en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina. ....	46

## Contenido de gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Curva de concentración – respuesta del extracto de <i>Croton schiedeanus</i> , ayanina, DMQ y control (DMSO) en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .....	41
<b>Gráfica 2.</b> Curva de concentración – respuesta de ayanina, DMQ y control (DMSO) en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .....	42
<b>Gráfica 3.</b> Curva de concentración – respuesta de ayanina en ausencia y presencia de las concentraciones más bajas evaluadas de DMQ en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .....	43
<b>Gráfica 4.</b> Curva de concentración – respuesta de ayanina en ausencia y presencia de las concentraciones más altas evaluadas de DMQ, en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .....	44
<b>Gráfica 5.</b> Curva de concentración – respuesta de ayanina en presencia de DMQ $3 \times 10^{-5} \text{M}$ , en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .....	46
<b>Gráfica 6.</b> Curva de concentración – respuesta de ayanina en presencia de DMQ $3 \times 10^{-5} \text{M}$ y L-NAME, versus ayanina más DMQ $3 \times 10^{-5} \text{M}$ sin L-NAME, en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .....	47
<b>Gráfica 7.</b> Curva de concentración – respuesta de ayanina en presencia de DMQ $3 \times 10^{-5} \text{M}$ y azul de metileno, versus ayanina más DMQ $3 \times 10^{-5} \text{M}$ sin azul de metileno, en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .....	47

## Contenido de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química de 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina). .....	16
<b>Figura 2.</b> Estructura química de 3,7-Di-O-metilquercetina (DMQ).....	16
<b>Figura 3.</b> Estructura básica de los Flavonoides. ....	20
<b>Figura 4.</b> Baño de Órgano Aislado. ....	36
<b>Figura 5.</b> Matriz generada por <i>Combeneft</i> empleando el modelo de Loewe. Representa las interacciones de sinergismo y antagonismo entre ayanina y DMQ.....	48
<b>Figura 6.</b> Mapa de superficie generado por <i>Combeneft</i> empleando el modelo de Loewe. ....	49

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
DMQ	3,7-Di-O-metilquercetina
DMSO	Dimetilsulfóxido
GMPc	Guanosin Monofosfato cíclico
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetasa
PA	Presión arterial
NF-kB	Factor nuclear kappa B
L-NAME	N( $\omega$ )-nitro-L-arginina metil éster
CE <sub>50</sub>	Concentración Efectiva cincuenta
E <sub>máx</sub>	Efecto máximo

## Introducción

La hipertensión es uno de los factores más importantes causantes de enfermedades y eventos cardiovasculares, como la enfermedad coronaria, arritmias cardíacas, accidente cerebrovascular y falla renal, entre otras (Kjeldsen, 2017). Se define según la American Heart Association como una elevación crónica de la presión arterial por como valores de presión arterial sistólica  $\geq 140$  mmHg y/o valores de presión arterial diastólica  $\geq 90$  mmHg (Whelton, PK. Carey, RM. Aronow, 2017) (Kjeldsen, 2017). Adicionalmente, según los últimos informes de la OMS, actualmente, entre el 20% y 35% de la población adulta de América Latina y el Caribe tiene hipertensión (Ordunez P., Martinez R., Niebylski M., 2017), y según el Ministerio de Salud y Protección Social, la prevalencia de hipertensión arterial en personas de 18 a 69 años afiliados al Sistema General de Seguridad Social en Salud en Colombia, en los últimos años, ha incrementado a nivel nacional (Ministerio de Salud y Protección Social, 2017), constituyéndose en un factor importante para que la enfermedad cardiovascular sea una de las primeras causas de muerte en nuestro país, siendo predominante en la población masculina de edades mayores o iguales a los 75 años (Observatorio Nacional de Salud, 2013).

Teniendo en cuenta la relevancia de la hipertensión a nivel mundial y nacional, se considera importante y necesario continuar investigando más ampliamente nuevas fuentes de fármacos o alternativas de tratamiento, que pudiesen tener menos efectos adversos y mejorar la eficacia con propósitos antihipertensivos, tales como las plantas medicinales (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & San Román, 2002). Actualmente se cuenta con varias alternativas de tratamiento para la hipertensión arterial, sin embargo, existen bajas tasas de tratamiento y control de la enfermedad en pacientes diagnosticados en Colombia (Ministerio de Salud y Protección Social, 2017). Dichos tratamientos existentes, requieren un uso prolongado de medicamentos, usualmente varios

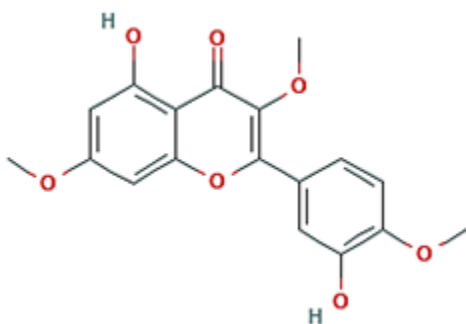
al mismo tiempo en terapia combinada, y generalmente con diversas reacciones adversas como sedación, trastornos de la concentración mental, hipotensión, insuficiencia renal aguda, hipercalcemia, tos seca acompañada algunas veces de sibilancia, angioedema, entre otras (Hardman, J., & Goodman, 2012), que pueden llegar a afectar la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes.

Recientemente, se ha incrementado el interés en el potencial terapéutico de las plantas medicinales en general, cuyo uso se remonta desde el principio de la historia de la humanidad, y su investigación va de la mano de los avances de la medicina moderna. Según las estimaciones actuales, alrededor de un tercio de los medicamentos de uso clínico se basan en fuentes naturales, incluyendo compuestos aislados de dichas fuentes, sintetizados o semi-sintetizados por modificación estructural de compuestos naturales (Ulrich-Merzenich, 2014). El uso, la investigación y el desarrollo de agentes terapéuticos a partir de fuentes naturales, tiene una importante relación con la presencia de compuestos fenólicos en ellas, especialmente de flavonoides (Kumar & Pandey, 2013). Estos compuestos cobran importancia debido a que existe abundante información acerca de ellos, que da cuenta del beneficio en cuanto a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Casati, 2012), la disminución de la mortalidad por dichas enfermedades (Macready et al., 2014)(Macready et al., 2014).

Dentro de las plantas medicinales con importancia antihipertensiva, se encuentra *Croton schiedeanus*. *Croton* es un género de la familia *Euphorbiaceae*, que comprende alrededor de 1.300 especies, en su gran mayoría son utilizadas tradicionalmente como plantas medicinales en África, Asia y América (Maciel, MAM. Cortez, 2006) (Salatino, Salatino, & Negri, 2007). Además, *Croton schiedeanus*, es una especie que ha sido encontrada en Colombia (Puebla, P., López, J. L., Guerrero, M., Martí, M. L., San Román, L., & San Feliciano, 2003), su nombre común es “almizclillo”, y su uso en la medicina tradicional colombiana es como antihipertensivo (A. Salatino, F. Salatino, 2007), utilizando sus hojas en infusión (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012).

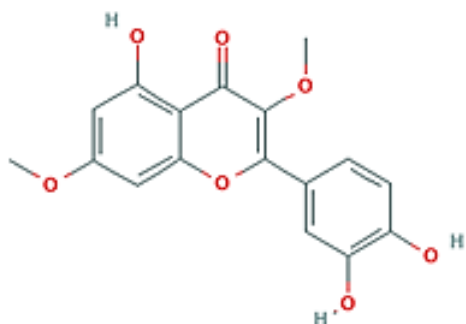
Mediante fraccionamiento fitoquímico bioguiado, se han aislado a partir de *Croton schiedeanus* los compuestos: *cis*-deshidrocrotonina, *trans*-deshidrocrotonina, 5-hydroxy-*cis*-dehydrocrotonina y (12R)-12-hydroxycascarillona; dos flavonoides: 3,7-Di-O-metilquercetina (DMQ) y 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina); y un triterpeno, cicloartanol (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R.,

Martin, M. L., & San Román, 2004). Ensayos previamente realizados en ratas hipertensas, han permitido conocer que el extracto etanólico de esta planta ejerce actividad antihipertensiva, disminuyendo significativamente la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Páez et al., 2013); además de producir relajación del tono vascular (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martin, M. L., Arteaga, L., & San Román, 2002). Dentro del extracto etanólico de la planta, se han aislado como principales metabolitos activos los flavonoides 3,7-Di-O-metilquercetina, el agente más potente y ayanina, el compuesto mayoritario (Vargas et al., 2001) (Hernández, S. X. C., Ibáñez, P. P., de la Calle, R. C., Calvo, M. L. M., del Barrio, L. S. R., & Pabón, 2008). No obstante, las interacciones que estos agentes ejercen entre sí no han sido dilucidadas hasta la fecha.



**Figura 1.** Estructura química de 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina).

Tomada de PubChem.



**Figura 2.** Estructura química de 3,7-Di-O-metilquercetina (DMQ).

Tomada de PubChem.



*Croton schiedeanus* podría constituirse en una fuente natural con actividad vasodilatadora y antihipertensiva, no únicamente por el efecto independiente de cada metabolito activo por separado, sino por posibles interacciones, aditivas o sinérgicas de los principales constituyentes de esta especie. La naturaleza de tales interacciones y el efecto de estas sobre la potencia y eficacia de la respuesta farmacológica de *C. schiedeanus* no se ha determinado ni cuantificado hasta la fecha, y constituye el objetivo principal de la presente investigación.

# 1. Capítulo 1

## 1.1 Marco teórico

### 1.1.1 La sinergia en el estudio del efecto farmacológico

El término sinergia se deriva del griego *syn-ergos*, "trabajando juntos" (Breitinger, 2012). Cuando dos o más compuestos ejercen un mayor efecto cuando se administran en combinación en relación con sus efectos individuales, se dice que la combinación es sinérgica. Este tipo de interacción permite el uso de dosis más bajas de cada uno de los compuestos, que a su vez puede reflejarse en una reducción de reacciones adversas (Tallarida, 2011).

Por otro lado, la aditividad entre dos o más compuestos, se refiere a cuando el efecto global es igual a la suma de los efectos de cada uno de ellos por separado. La identificación y cuantificación del posible efecto aditivo o sinérgico de dos principios activos puede derivar en la obtención de un agente farmacológico de mayor interés. Además, la comprensión de los mecanismos subyacentes a tales interacciones permitirá dirigir con más precisión el lugar de un agente o combinación de agentes en terapéutica. En el campo de los productos naturales, la cuantificación del efecto farmacológico obtenido por la combinación de los principales metabolitos activos identificados en una especie podría ayudar a direccionar la investigación hacia un producto de mayor interés en farmacología.

Los fitoterapéuticos son en sí mismos mezclas multicomponente, pues el fraccionamiento guiado para la búsqueda de metabolitos activos incrementa la probabilidad de conducir a interacciones de tipo aditivo, sinérgico o antagónico entre sus componentes (Ulrich-Merzenich, 2014). La naturaleza multicomponente de las plantas medicinales las puede hacer particularmente adecuadas para el tratamiento de enfermedades complejas y ofrece un gran potencial para ejercer efectos sinérgicos, mediante diferentes mecanismos, entre ellos, la presencia de varios compuestos pueden regular el mismo o diferente objetivo en varias rutas, y cooperar de una

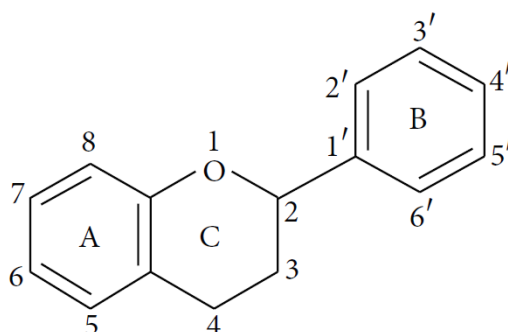
manera sinérgica; pueden regular las enzimas y los transportadores que participan en el metabolismo hepático e intestinal para mejorar la biodisponibilidad oral del fármaco; superar los mecanismos de resistencia a los medicamentos de microorganismos y células cancerosas, y eliminar los efectos adversos, al mismo tiempo mejorando la potencia farmacológica. La exploración de mecanismos sinérgicos de metabolitos activos podría permitir descubrir nuevas fórmulas fitofarmacéuticas y combinaciones de fármacos (Yang et al., 2014).

### **1.1.2 Flavonoides**

Los flavonoides son metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en plantas (Casati, 2012). Constituyen una amplia clase de compuestos químicos que tienen una estructura de benzo- $\gamma$ -pirona; se basa en un esqueleto de quince carbonos, que consiste en dos anillos de benceno (anillos A y B, figura 3), asociados a un anillo pirano (anillo C, figura 3) (Kumar & Pandey, 2013). se forman a partir de tres unidades de acetato y una unidad de fenilpropano (mediante la ruta del ácido del shikímico) (Mills, S., & Bone, 2012). Usualmente presentan grupos funcionales como: hidroxilo, metoxilo, etoxilo o prenilo, conjugados con monosacáridos, oligosacáridos, sulfatos o fosfatos, por lo que su estabilidad depende de su almacenamiento en la oscuridad y a bajas temperaturas. Es importante recalcar que se oxidan fácilmente y son eficaces eliminadores de radicales libres, lo que les atribuye muchas aplicaciones, tales como en supervivencia celular y respuesta al estrés (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & San Román, 2002) (Bjørklund, G., Dadar, M., Chirumbolo, S., & Lysiuk, 2017). Generalmente, entran en la célula a través de los receptores de hidrocarburo de arilo (ArHR) e inducen la formación de niveles bajos de ROS que ayuda a las mitocondrias a regular su actividad pro-apoptótica, pro-autofágica y pro-supervivencia, dependiendo del momento en el que la célula está bajo estrés, actividad que podría explicar su beneficio en la fisiología celular (Bjørklund, G., Dadar, M., Chirumbolo, S., & Lysiuk, 2017).

Los polifenoles en general se han visto involucrados en efectos sinérgicos, como por ejemplo, en antagonizar la resistencia a fármacos por parte de células tumorales, se ha observado que tienen importantes efectos inmunomoduladores y antiinflamatorios, al inhibir la activación del factor nuclear kappa-B (NF- $\kappa$ B), se interrumpe la activación de una amplia variedad de tumores sólidos, linfomas y leucemias. Inducen apoptosis *in vitro*, e inhiben la formación de nuevos vasos, en melanoma humano (Luqman & Pezzuto, 2010) (Wagner, 2011) (Sherbet, 2017). Recientemente se ha incrementado el interés en el potencial terapéutico de las plantas medicinales en general, lo que podría estar relacionado a la presencia de compuestos fenólicos, específicamente a los

flavonoides (Kumar & Pandey, 2013). Existe abundante información acerca de los flavonoides que da cuenta del beneficio en cuanto a la prevención de enfermedades cardiovasculares (Casati, 2012) (Macready et al., 2014) y disminución de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Macready et al., 2014). Por otro lado, las propiedades antihipertensivas de estos compuestos se relacionan con la biodisponibilidad regulada de NO a través de la inducción de la óxido nítrico sintetasa (NOS), además de la inhibición de la oxidación nítrica (Bjørklund, G., Dadar, M., Chirumbolo, S., & Lysiuk, 2017).



**Figura 3.** Estructura básica de los Flavonoides.

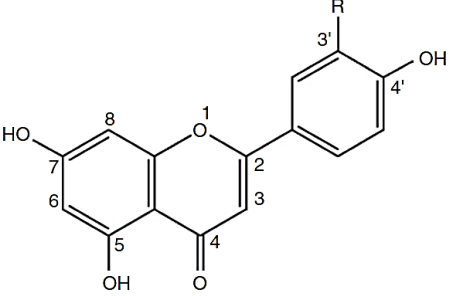
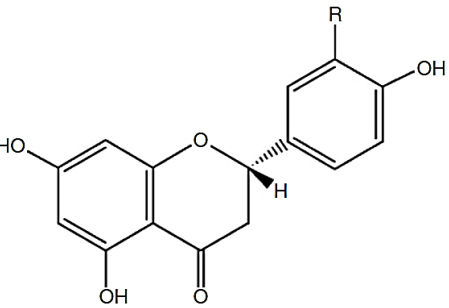
(Mills, S., & Bone, 2012)

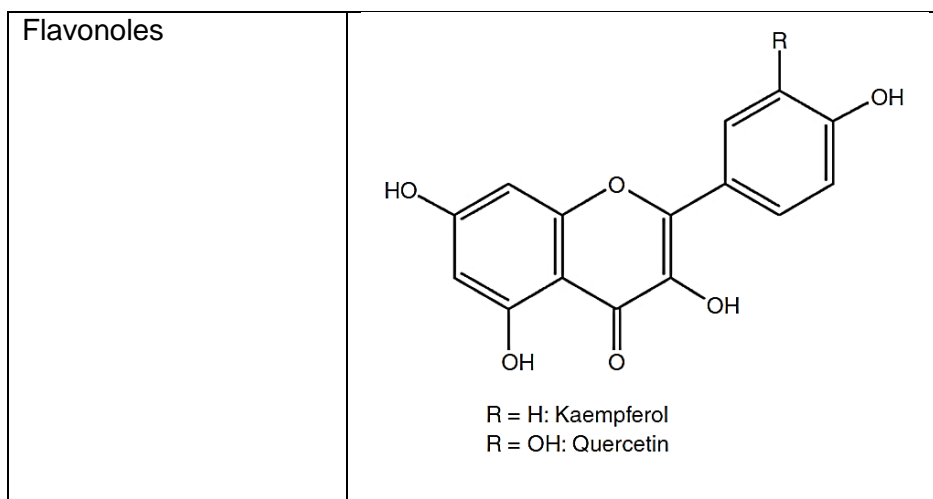
Existen estudios que involucran el consumo de flavonoides, y confirman la reducción de la presión arterial (Rees, Dodd, & Spencer, 2018). Además, dentro de las medidas no farmacológicas sugeridas por los clínicos en la enfermedad cardiovascular, se encuentra la ingesta de una dieta saludable, que incluya frutas y verduras, con lo cual se ha visto que puede contribuir a reducir la incidencia de dicha enfermedad. A partir de lo anterior, se han ampliado las investigaciones para determinar qué tipo de compuestos se encuentran involucrados en ello. Por mucho tiempo, este efecto fue atribuido a compuestos como vitaminas y carotenoides, debido a su capacidad antioxidante. Sin embargo, al persistir en estas investigaciones, se ha encontrado que existen otros mecanismos protectores relacionados con la contribución a la mejora y prevención de la enfermedad cardiovascular, correspondientes a los polifenoles. Dentro de este grupo, los flavonoides se han asociado a efectos cardioprotectores, ayudando a prevenir la hipertensión arterial y aportando en la mejoría de la función endotelial (Rees et al., 2018).

Se conocen más de 2000 flavonoides, algunos de ellos se encuentran como O- o C-glucósidos. Los flavonoides glucósidos son usualmente solubles en agua, y pueden clasificarse según el estado de oxidación en el carbono 3, en tres grupos: flavononas, flavonoles y flavonas, grupo al

cual pertenecen los flavonoides estudiados en el presente trabajo (ver en la tabla 1, las estructuras básicas de dichos grupos) (Mills, S., & Bone, 2012). Por otro lado, la mayoría de los estudios que dan cuenta de los efectos cardioprotectores de dichos compuestos, se han encaminado más específicamente a los flavonoles y a las flavonas (Arts & Hollman, 2005).

**Tabla 1.** Estructura química básica de los principales grupos de flavonoides (Mills, S., & Bone, 2012).

Grupo de flavonoides	Estructura química básica
Flavonas	 <p>R = H: Apigenin R = OH: Luteolin</p>
Flavononas	 <p>R = H: Naringenin R = OH: Eriodictyol</p>



En la presente investigación se contempla el estudio de los efectos antihipertensivos y las posibles interacciones entre dos de los flavonoides de mayor importancia derivados de la planta *Croton schiedeanus* (3,7-Di-O-metilquercetina y 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina o ayanina), los cuales inducen relajación en aorta aislada de ratas Wistar por producción de NO dependiente de endotelio, seguido de la activación de la guanilato ciclasa (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., & Román, 2002).

### 1.1.3 *Croton schiedeanus* o “Almizclillo”

*Croton* es un género de *Euphorbiaceae* que comprende alrededor de 1.300 especies, en su gran mayoría son utilizadas tradicionalmente como plantas medicinales en África, Asia (Maciel, MAM. Cortez, 2006) (A. Salatino, F. Salatino, 2007) y América del Sur; entre sus usos populares, se encuentran: tratamiento del cáncer, estreñimiento, diabetes, problemas digestivos, disentería, heridas externas, fiebre, hipercolesterolemia, hipertensión, inflamación, lombrices intestinales, malaria, dolor, úlceras y pérdida de peso (A. Salatino, F. Salatino, 2007).

Se ha demostrado que algunas plantas del género *Croton* inducen efectos antihipertensivos en animales (Guerrero, M. F., Carrón, R., Martín, M. L., San Román, L., & Reguero, 2001). Dentro de esta especie, se encuentra *Croton schiedeanus* Schlecht, planta encontrada en Colombia, específicamente en regiones amazónicas y de Cundinamarca (Puebla, P., López, J. L., Guerrero, M., Martí, M. L., San Román, L., & San Feliciano, 2003) (Barrera, C., Andrés, C., Constanza Gómez, D., & Castiblanco, 2016), su nombre común es “almizclillo”, y su uso en la medicina

tradicional colombiana es como antihipertensivo (A. Salatino, F. Salatino, 2007), utilizando sus hojas en infusión (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012).

En estudios previos, se ha demostrado que el extracto acuoso de *C. schiedeana*, y en mayor medida el extracto etanólico, ejercen efectos hipotensores y vasodilatadores en ratas. Se ha llevado a cabo el aislamiento e identificación de metabolitos de tipo flavonoide, diterpenoide, esterol y fenilbutanoide, en donde los metabolitos activos principales son: ayanina, el compuesto mayoritario y 3,7-Di-O-metilquercetina, uno de los agentes más potentes (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012). De allí el interés del presente estudio, en investigar más a fondo sobre su capacidad antihipertensiva y las posibles interacciones aditivas o sinérgicas.

#### **1.1.4 Baño de órgano aislado**

Consiste en una técnica *ex vivo*, útil para examinar entre otros, efectos vasodilatadores en anillos de aorta aislados. Entre sus ventajas se encuentra: requerir pequeñas cantidades de cada compuesto, estar libre de ajustes homeostáticos sistémicos que dificultan el estudio farmacodinámico y la obtención con bastante precisión de parámetros claves en farmacología experimental como: concentración efectiva cincuenta ( $CE_{50}$ ) y efecto máximo  $E_{m\acute{a}x}$ , indicativos de la potencia y la eficacia de un compuesto, o de una combinación de compuestos. Además, permite reducir el número de animales de experimentación, imperativo ético en experimentos con animales de laboratorio, dado que de cada ejemplar se obtienen varios fragmentos vasculares, haciendo la técnica más eficiente en la obtención de resultados (Guerrero, 2016).

Al requerir poca cantidad de cada compuesto en estudio, esta técnica es muy útil para hacer seguimiento bioguiado de un extracto con capacidad vasodilatadora y determinar sus principales metabolitos, una vez aislados e identificados, así como también permite determinar si varios metabolitos ejercen efectos sinérgicos, lo cual es interés propio de este estudio (Guerrero, 2016).

## 1.2 Estado del arte

La hipertensión arterial se asocia a diferentes complicaciones como: enfermedad coronaria, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, falla renal, retinopatía hipertensiva y aneurismas vasculares, entre otras; por lo que aún constituye un problema de salud pública con importante impacto a nivel mundial, pese a que se ha estudiado a fondo su fisiopatología y su abordaje terapéutico. El objetivo del tratamiento antihipertensivo es eliminar los riesgos asociados con la elevación de la presión arterial (PA), sin afectar negativamente la calidad de vida. La selección de fármacos se basa en la eficacia para disminuir la PA y el riesgo cardiovascular, incluidos los accidentes cerebrovasculares, el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca (Gradman, Basile, Carter, & Bakris, 2010). Por lo anterior, con miras a lograr dicho objetivo, y teniendo en cuenta que la terapia combinada es una estrategia terapéutica eficaz en clínica cuando los agentes logran mejorar la respuesta farmacológica, se hace cada vez más necesario establecer nuevas alternativas terapéuticas, que pueden ser extraídas de fuentes naturales. *Croton schiedeanus* es una planta utilizada comúnmente en Colombia como tratamiento para la hipertensión y los estudios hasta la fecha, han mostrado que el extracto de esta especie disminuye la presión sanguínea en ratas Wistar y en ratas espontáneamente hipertensas, sí como disminuye el tono vascular en anillos de aorta aislados. Dentro de los compuestos identificados, se encuentran varios flavonoides, en donde el más abundante es ayanina, cuya propiedad vasorrelajante se ha asociado con la vía de NO y GMPc (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012). Es importante determinar si el uso combinado de los principales metabolitos de *C. schiedeanus* permite plantear una posible base de un fitoterapéutico.

Los compuestos polifenólicos han sido estudiados ampliamente, demostrando sus utilidades cardiovasculares en humanos. Dentro de este grupo, los flavonoides poseen capacidad vasodilatadora, siendo esta actividad, predominantemente endotelio-dependiente para el caso de los principales metabolitos de *Croton schiedeanus* (Hernández, S. X. C., Ibáñez, P. P., de la Calle, R. C., Calvo, M. L. M., del Barrio, L. S. R., & Pabón, 2008) (Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M. L., San Román, L., & Guerrero, 2010).

Se ha demostrado en experimentos previos, que el extracto acuoso de *C. schiedeanus*, y en mayor medida el extracto etanólico, ejercen efectos hipotensores y vasodilatadores en ratas. Así como se ha llevado a cabo el aislamiento e identificación de metabolitos de tipo flavonoide, diterpenoide, esterol y fenilbutanoide, en donde los metabolitos activos principales son: ayanina, el cual es el compuesto mayoritario; 3,7-Di-O-metilquercetina el agente más potente pero con



menor rendimiento que ayanina (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012) (Guerrero, 2001); y 3-O-metilquercetina, con un rendimiento menor y con un perfil vasodilatador comparable al de 3,7-Di-metilquercetina (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & San Román, 2002) (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012) (Guerrero, Puebla, Reguero, & Arteaga, 2002).

Al evaluar los efectos vasodilatadores de *Croton schiedeanus*, se ha encontrado que se correlaciona con la liberación de NO y la vía de guanilato ciclasa, además de carecer de efecto muscarínico, beta-adrenérgico, prostanoide o antagonismo de canales de calcio (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012) (Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M. L., San Román, L., & Guerrero, 2010) (Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M. L., San Román, L., & Guerrero, 2010).

Los hallazgos de los estudios realizados hasta el momento revelan que diferentes flavonoides de *C. schiedeanus* poseen actividad antihipertensiva por separado, sin embargo, no se han realizado ensayos con combinaciones a diferentes concentraciones de los metabolitos activos mayoritarios presentes en esta planta: 3,7-Di-O-metilquercetina y ayanina, con el fin de determinar si existe algún tipo de interacción, ya sea efecto aditivo o sinergismo, lo que constituye la principal intención de la presente investigación.

El interés en estudiar efectos sinérgicos con mezclas de compuestos ha crecido enormemente en las últimas dos décadas, tanto en farmacología, como en toxicología (Ritz & Streibig, 2014), una de las razones es que este tipo de interacción permite el uso de dosis más bajas de cada uno de los compuestos, que a su vez puede reflejarse en una reducción de reacciones adversas. Las combinaciones de medicamentos son bastante comunes en el tratamiento de diferentes enfermedades como cánceres, infecciones, dolor, hipertensión, entre otras. Además, cuando se detecta un efecto sinérgico, éste usualmente depende de la relación de dosis o concentración de la combinación que se prueba, y por lo tanto, esta información permite establecer combinaciones de dosis óptimas (Tallarida, 2011).

En la industria farmacéutica, gran parte de la investigación se centra en la identificación de efectos sinérgicos, puesto que la combinación de medicamentos es una estrategia importante para tratar diversas enfermedades, siendo el objetivo de esto, aumentar la eficacia, evitando en

la medida de lo posible la toxicidad, y de esta manera poder mejorar el esquema terapéutico (Veroli et al., 2016).

Existen varios ejemplos en la literatura en donde se ha encontrado efectos sinérgicos en combinaciones de metabolitos activos de fuentes naturales (Mills, S., & Bone, 2012), las cuales han sido detectadas mediante la realización de un gráfico conocido como isoblograma, el cual fue introducido por Loewe (1953, 1957), sin atraer mucho la atención en sus inicios, hasta que fue utilizado en un estudio de la combinación de alcohol etílico e hidrato de cloral, en el cual se demostró que al probar diferentes combinaciones de proporciones fijas, en algunos casos resultaron siendo aditivos, mientras que otros fueron sub-aditivos, y otros super-aditivos (Tallarida, 2001).

La evaluación de la sinergia se ha convertido en un punto clave en fitomedicina en los últimos años. Desde la antigüedad se ha observado que existe superioridad terapéutica al combinar múltiples sustancias en la medicina tradicional sobre sustancias individuales. Con estudios a lo largo del tiempo, se ha observado que muchas enfermedades poseen una etiología multicausal y una fisiopatología compleja, que sugiere que se pueden tratar de manera más efectiva con combinaciones de medicamentos estratégicamente elegidos, en comparación con un solo medicamento. Hoy en día, la terapia combinada, se practica en todo el mundo en el tratamiento del SIDA y otras enfermedades infecciosas, en hipertensión, numerosos tipos de cáncer y enfermedades reumáticas (Wagner, 2011).

El aprovechar el sinergismo terapéutico, se ha venido utilizando desde los años 1950 y 1960, en donde la combinación de medicamentos era muy común en el mercado farmacéutico. Sin embargo, estas combinaciones rara vez eran el resultado de un desarrollo racional, sino que se basaban en conocimiento empírico. Como consecuencia, la inseguridad asociada a reacciones adversas y toxicidad empezó a incrementar, de allí la importancia de estudiar con profundidad la dosificación individual de cada principio activo cuando se pretende utilizarlos simultáneamente. La combinación de principios activos en medicamentos está justificada cuando se puede demostrar que cada compuesto tiene un efecto terapéutico pertinente a su indicación, así como se ha evaluado su eficacia y seguridad en relación riesgo-beneficio (Schweim, J. K., & Schweim, 2014).

Las enfermedades cardiovasculares a menudo requieren múltiples principios activos para cubrir las necesidades individuales de los pacientes. Los medicamentos con varios principios activos

son más fáciles de usar para el paciente, pues disminuye la frecuencia de administración y por lo tanto se favorece la adherencia terapéutica (Schweim, 2017).

## 2. Capítulo 2

### 2.1 Justificación

Considerando que la hipertensión se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, causando enfermedades y eventos cardiovasculares, como la enfermedad coronaria, arritmias cardíacas, accidente cerebrovascular y falla renal, entre otras (Kjeldsen, 2017); se hace necesario continuar investigando más ampliamente nuevas fuentes de fármacos o alternativas de tratamiento, tales como las plantas medicinales, entre las cuales se encuentra *Croton schiedeanus*, que cuenta con varios metabolitos activos que ejercen acciones a nivel cardiovascular, como 3,7-Di-O-metilquercetina, el agente más potente y ayanina, como el compuesto mayoritario; y en tercer lugar, también se ha identificado el compuesto 3-O-metilquercetina, con un rendimiento menor, y con un perfil vasodilatador comparable al de 3,7-Di-metilquercetina. El mecanismo de relajación de este último compuesto está estrechamente vinculado con el incremento en la producción de NO y la consecuente liberación de GMPc (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & San Román, 2002) (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012) (Guerrero et al., 2002).

Los hallazgos de estudios previos confirman la potencial utilidad etnobotánica de *Croton schiedeanus*. A partir de sus metabolitos activos, se podría llegar a considerar la posibilidad de

obtener fitofármacos con un perfil farmacodinámico tal, que les permita constituirse en una alternativa farmacológica para el tratamiento de trastornos cardiovasculares de importancia, con alta morbimortalidad a nivel mundial, como la hipertensión arterial y la enfermedad coronaria. Para complementar dichos hallazgos de experimentos realizados en aorta aislada con el extracto etanólico completo de *C. schiedeana* y con sus metabolitos activos por separado, se propone llevar a cabo ensayos con combinaciones de sus principales metabolitos activos, lo cual nos arrojaría información de las posibles interacciones que se generen entre ellos, ya sea de adición o sinergismo. La detección de dichas interacciones entre los principales metabolitos activos, responsables del efecto vasodilatador y antihipertensivo, podría permitir proponer un preparado a base de combinaciones apropiadas de los mismos que conserve o mejore el efecto farmacológico, al tiempo que reduzca el riesgo de posibles reacciones adversas.

## 2.2 Planteamiento del problema

La hipertensión arterial, considerado actualmente como uno de los principales problemas de salud pública, y como uno de los factores más importantes causantes de enfermedades y eventos cardiovasculares, como la enfermedad coronaria, arritmias cardíacas, accidente cerebrovascular y falla renal, entre otras (Kjeldsen, 2017), requiere de investigaciones más amplias, en miras de encontrar nuevas alternativas de tratamiento, aprovechando las fuentes naturales que pueden contener metabolitos activos prometedores.

*Croton schiedeanus* es una planta que pertenece a la familia *Euphorbiaceae*, conocida popularmente como “almizclillo”, y su uso en la medicina tradicional colombiana es como antihipertensivo (A. Salatino, F. Salatino, 2007), en la cual se aprovechan sus hojas para realizar una infusión (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012).

En estudios previos, se ha demostrado que el extracto acuoso de *C. schiedeanus*, y en mayor medida el extracto etanólico, ejercen efectos hipotensores y vasodilatadores en ratas (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012), disminuyendo significativamente la presión arterial y la frecuencia cardíaca (Páez et al., 2013) además de producir relajación del tono vascular (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & San Román, 2002). No obstante, las interacciones que estos agentes ejercen entre sí no han sido dilucidadas hasta la fecha.

*Croton schiedeanus* podría constituirse en una fuente natural con actividad vasodilatadora y antihipertensiva, no únicamente por el efecto independiente de cada metabolito activo por separado, sino por posibles interacciones, aditivas o sinérgicas de los principales constituyentes de esta especie. La naturaleza de tales interacciones y el efecto de éstas sobre la potencia y eficacia de la respuesta farmacológica de *C. schiedeanus* no se ha determinado ni cuantificado hasta la fecha, y constituye el objetivo principal de la presente investigación.

## 2.3 Hipótesis

Los metabolitos activos presentes en *C. schiedeana* (3,7-Di-O-metilquercetina y 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina)) interactúan ejerciendo efectos sinérgicos, aditivos o sub-aditivos en los efectos vasodilatadores, en la preparación de anillos aislados de aorta de rata.

## **3. Capítulo 3**

### **3.1 Objetivo general**

Determinar si los metabolitos activos presentes en *Croton schiedeanus* interactúan ejerciendo efectos sinérgicos, aditivos o sub-aditivos.

## 3.2 Objetivos específicos

1. Determinar en la preparación de anillos aislados de aorta de rata si la asociación de 3,7-Di-O-metilquercetina y 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina), principales metabolitos activos presentes en *Croton schiedeanus*, ejercen efectos sinérgicos o aditivos.
2. Establecer si el uso combinado de 3,7-Di-O-metilquercetina y ayanina igualan o mejoran el efecto vasodilatador del extracto total de *Croton schiedeanus*.
3. Determinar si las interacciones entre 3,7-Di-O-metilquercetina y ayanina dependen de la ruta metabólica óxido nítrico – guanilato ciclasa.



## 4. Capítulo 4

### 4.1 Materiales y Reactivos

Los metabolitos principales de *Croton schiedeanus*: 3,7-Di-O-metilquercetina y 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina), fueron aislados e identificados y proporcionados por el Departamento de Química Farmacéutica, de la Universidad de Salamanca. El extracto etanólico fue obtenido y proporcionado el Grupo de Investigación “Estudio químico de actividad biológica de *Rutaceae* y *Myristaceae*” del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

Se utilizaron ratas Wistar adultas, macho y hembras, de 7-9 semanas de edad, machos y hembras, las cuales fueron suministradas por el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, mantenidas en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con acceso a dieta y agua a libre demanda, excepto de 12 horas antes de cada experimento.

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Recolección del material vegetal

El material vegetal de *Croton schiedeanus* Schlecht fue recolectado en la región de Tocaima, Cundinamarca, Colombia. Su identidad fue confirmada por el Dr. José Luis Fernández, y se depositó una muestra (N° 432164) en el Herbario del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia.

### 4.2.2 Obtención del extracto

Las partes aéreas de las plantas se secaron en un horno a 40 °C y posteriormente fueron trituradas (Guerrero, M. F., Carrón, R., Martín, M. L., San Román, L., & Reguero, 2001) y se llevaron a maceración con etanol al 96%, se filtró y concentró bajo presión reducida, y finalmente se liofilizó. Para los ensayos en baño de órgano aislado, el extracto se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,1% (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & San Román, 2002).

### 4.2.3 Aislamiento e identificación de los principales metabolitos de *Croton schiedeanus*

A partir del extracto etanólico de *Croton schiedeanus* se llevó a cabo el aislamiento de tres flavonoides: 3,7-Di-O-metilquercetina (DMQ); 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina) y 3-O-metilquercetina. Para la obtención de ayanina, el extracto etanólico de *C. schiedeanus* se fraccionó para dar lugar a un extracto acuoso y clorofórmico. El residuo clorofórmico se fraccionó con 4% de NaOH, para luego aislar ayanina de la fracción neutral mediante cromatografía en columna de sílica-gel, empleando hexano-acetato de etilo (1: 1). Finalmente, se identificó a ayanina, comparando los valores de <sup>1</sup>H-NMR y <sup>13</sup>C-RMN con los reportados en la literatura (Ver Anexo 1) (Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M. L., San Román, L., & Guerrero, 2010) (Guerrero Pabón, 2001).

Para la obtención de DMQ, se realizó una elución de la fracción de cloroformo con acetato de etilo-*n*-hexano, donde se obtuvo como una fracción oleosa después de remover el solvente, finalmente se llevó a cabo purificación mediante cromatografía en columna Sephadex LH-20, empleando metanol-cloruro de metileno-*n*-hexano. Posteriormente se identificó este compuesto,

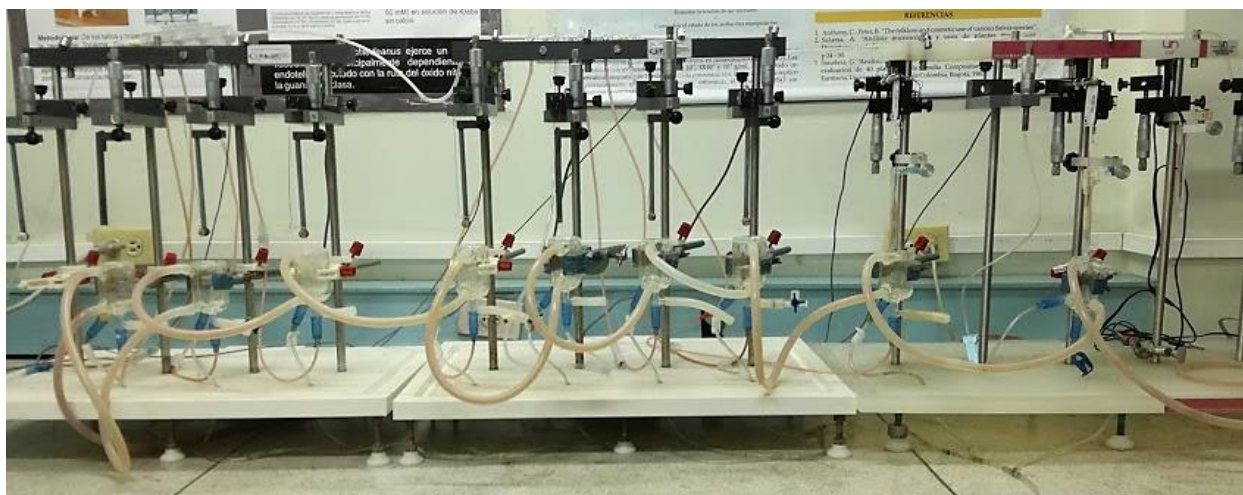
comparando los valores de  $^1\text{H}$ NMR y  $^{13}\text{C}$ -RMN con los reportados en la literatura (ver Anexo 1) (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., & Román, 2002).

En cuanto al rendimiento de los dos flavonoides en cuestión obtenidos, se relaciona con la cantidad de material procesado inicialmente correspondiente a 5kg de la parte aérea de la planta, a partir del cual se obtuvo 1,7g de ayanina y 0,3g de DMQ; siendo menor el rendimiento de este último compuesto (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., & Román, 2002).

#### **4.2.4 Descripción de la técnica de Baño de Órgano Aislado**

En el laboratorio de baño de órgano aislado de la Universidad Nacional de Colombia, se desarrollaron los experimentos de baño de órgano aislado. Al animal se le indujo anestesia en cámara de dióxido de carbono cerrada, se efectuó un corte por la parte media de piel, planos musculares de la pared abdominal y del tórax hasta el cuello. Luego, se procedió a retirar las vísceras, para observar la arteria aorta descendente, que se encuentra ubicada por delante de la columna vertebral, esta es separada y cortada. Después, se colocó la aorta en una caja de Petri con una base de parafina inmersa en solución nutritiva o solución de Krebs, oxigenada con carbógeno, en donde se retiró la grasa y el tejido conectivo adyacente, para finalmente cortarla en fragmentos de 4 – 6mm. Los anillos obtenidos fueron transferidos con una pinza al interior del baño de vidrio y se fijaron al soporte inferior por uno de sus extremos, y al transductor por el otro extremo. Cada baño se llenó con un volumen de aproximadamente 15mL de solución de Krebs mantenida a 37°C, gasificada con carbógeno ( $\text{O}_2$  95%,  $\text{CO}_2$  5%), y a un pH de 7,4. La solución de Krebs contiene: NaCl, 118,0mM; KCl, 4,75mM;  $\text{CaCl}_2$ , 1,8mM;  $\text{MgSO}_4$ , 1,2mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,2mM;  $\text{NaHCO}_3$ , 25mM; glucosa, 11mM y ácido ascórbico, 0,1mM (Guerrero, 2016).

Seguido de lo anterior, se estabilizaron las tensiones de base de los anillos a 2000mg cambiando la solución nutritiva cada 15 minutos; dicha estabilización se logró en un tiempo entre 60 y 90 minutos. Una vez se estabilizaron las tensiones basales, se procedió a añadir fenilefrina ( $1 \times 10^{-6}\text{M}$ ) como agente contacturante, el cual tardó 40 minutos en alcanzar una tensión máxima, momento en el cual se adicionó los diferentes compuestos a ensayar (Guerrero, 2016). El transductor permite medir la fuerza de las contracciones producidas por los anillos, con la ayuda del programa *Data Trax 2* (WPI).



**Figura 4.** Baño de Órgano Aislado.

### **4.2.5 Protocolos de trabajo**

Para efectos de este estudio, una vez alcanzado el nivel meseta o tensión mayor, después de aproximadamente 45 minutos de adicionar fenilefrina como contracturante a la solución de Krebs, donde se encontraban sumergidos los fragmentos de aorta, se llevaron a cabo cuatro protocolos para dar cumplimiento a los objetivos específicos, de la siguiente manera:

#### **Protocolo 1**

Se determinaron curvas de concentración – respuesta de la vasodilatación inducida por extracto etanólico total de *Croton schiedeanus*, en anillos de aorta de rata Wistar, contraídos con fenilefrina ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ). Para lo cual se adicionó el extracto en concentraciones acumulativas en mg/mL, así:  $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  y  $3 \times 10^{-4}$ .

Se determinó una curva control con varias réplicas ( $n > 4$ ) durante el experimento adicionando alícuotas de DMSO al 0.1%, en el mismo volumen de las alícuotas de los compuestos evaluados.

#### **Protocolo 2**

Se determinaron curvas de concentración – respuesta, de la vasodilatación inducida por ayanina en anillos de aorta de rata Wistar, previamente contraídos con fenilefrina ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ). Para ello, fueron adicionadas en concentraciones acumulativas, de la siguiente manera:  $1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  y  $6 \times 10^{-5} \text{M}$ . Cada una de las concentraciones

anteriores, fueron evaluadas en presencia y ausencia de 3,7-Di-O-metilquercetina en concentraciones acumulativas así:  $1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  M.

Se determinó una curva control con varias réplicas ( $n > 4$ ) durante el experimento adicionando alícuotas de DMSO al 0.1%, en el mismo volumen de las alícuotas de los compuestos evaluados.

### **Protocolo 3**

Con el fin de identificar el posible mecanismo vasodilatador empleado por los principales metabolitos activos de ayanina y DMQ, los anillos aórticos se incubaron durante 15 minutos con el inhibidor de óxido nítrico sintetasa L-NAME a una concentración de  $1 \times 10^{-4}$  M (añadido a la solución nutricia), de la vasodilatación inducida por ayanina en anillos de aorta de rata Wistar, previamente contraídos con fenilefrina ( $1 \times 10^{-6}$  M), en concentraciones acumulativas ( $1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  y  $6 \times 10^{-5}$  M) de ayanina, en presencia y ausencia de 3,7-Di-O-metilquercetina a una concentración de  $3 \times 10^{-5}$  M, combinación con la que se consiguió previamente el mayor efecto vasodilatador.

Se determinó una curva control ( $n > 4$ ) durante el experimento adicionando alícuotas de DMSO al 0,1% en el mismo volumen de las alícuotas de los compuestos evaluados.

### **Protocolo 4**

Por otro lado, para identificar el posible mecanismo vasodilatador empleado por los principales metabolitos activos de ayanina y DMQ, los anillos aórticos se incubaron durante 15 minutos con N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster clorhidrato sintasa (L-NAME), inhibidor de óxido nítrico ( $1 \times 10^{-4}$  M) y azul de metileno, inhibidor de guanilato ciclasa ( $1 \times 10^{-4}$  M). Luego se adicionará fenilefrina ( $1 \times 10^{-6}$  M), una vez alcanzada la estabilidad de contracción se añadirán los compuestos y el extracto etanólico a evaluar, lo que permitirá establecer si los eventuales efectos relajantes se deben a mecanismos dependientes de las vías de óxido nítrico y guanilato ciclasa.

Los flavonoides se adicionaron en concentraciones acumulativas, de la siguiente manera:  $1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  y  $6 \times 10^{-5}$  M, en presencia y ausencia de 3,7-Di-O-metilquercetina a una concentración de  $3 \times 10^{-5}$  M, combinación con la que se consiguió previamente el mayor efecto vasodilatador sinérgico.

Se determinó una curva control con varias réplicas ( $n > 4$ ) durante el experimento adicionando alícuotas de DMSO en el mismo volumen de las alícuotas de los compuestos evaluados.

### 4.3 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron con el promedio  $\pm$  el error estándar (E.M.S). Se efectuó un análisis de regresión sigmoidal de las curvas concentración – respuesta, obteniendo al menos tres concentraciones entre el 20 y 80% del efecto máximo de relajación, con lo cual fue posible determinar la concentración efectiva 50, y su respectivo valor de  $pD_2$  ( $-\log CE_{50}$ ) con su intervalo de confianza. Lo anterior se llevó a cabo utilizando los paquetes *Excel*<sup>®</sup>-2016 y *GraphPad-Prism-6*<sup>®</sup>. Adicionalmente, se efectuó un análisis de varianza entre las respectivas curvas de concentración, incluyendo la prueba de diferencias múltiples de Tukey, asumiendo un valor de  $p \leq 0.05$ .

Con el fin de evaluar la interacción sinérgica, aditiva o antagónica entre ayanina y DMQ, se utilizó la plataforma *Combenefit*. Se aplicó para ello el modelo de Loewe, que analiza en una prueba de t test, los datos obtenidos contrastados con los datos esperados, entendidos estos como los que arroja el programa cuando el efecto es eminentemente aditivo (ni sinérgico, ni antagónico). El paquete genera los valores en el porcentaje en que difieren positivamente sinergia, o negativamente, antagonismo del control esperado, para una respuesta aditiva (ver Anexo 2) (Veroli et al., 2016) (Tang, J., Wennerberg, K., & Aittokallio, 2015).

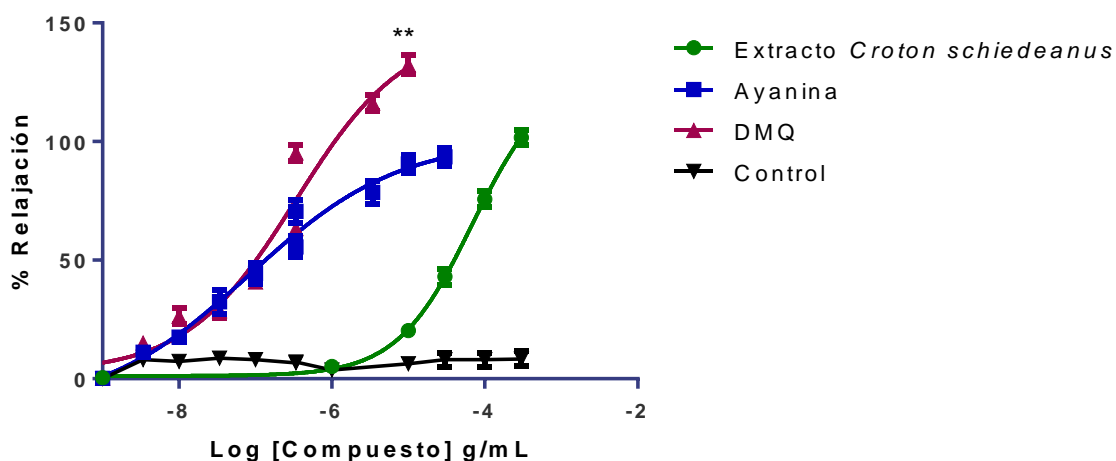
## 5. Capítulo 5

### 5.1 Resultados

Inicialmente, se determinaron curvas de concentración – respuesta de la vasodilatación inducida por extracto etanólico total de *Croton schiedeanus*, en anillos de aorta contraídos con fenilefrina ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ) en concentraciones acumulativas ( $1 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  y  $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ), así como también, se ensayaron concentraciones acumulativas de ayanina ( $1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  y  $6 \times 10^{-5} \text{M}$ ), y de DMQ en concentraciones acumulativas ( $1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$ ). A su vez se compararon paralelamente con una curva control, en donde sólo se adicionó DMSO al 0,1%; dando como resultado una mayor eficacia por parte de DMQ en comparación con ayanina. Además, aunque el efecto relajante alcanzado por parte del extracto etanólico de *Croton schiedeanus* es similar en comparación con el logrado con ayanina, es necesaria una concentración mayor de éste comparado con ayanina y DMQ para iniciar a ejercer el efecto evaluado.

El extracto de *C. schiedeanus* ejerció un efecto vasodilatador en función de la concentración, alcanzando una relajación total, con un  $E_{\text{máx}}$  de  $101,6 \pm 3,1\%$ ; con una  $CE_{50}$  de  $7,6 \times 10^{-5} \text{M}$  y  $pD_2$  de 4,1. En segundo lugar, ayanina produjo una respuesta dilatadora con concentraciones menores, dando valores de  $CE_{50}$  de  $1,1 \times 10^{-6} \text{M}$ ;  $E_{\text{máx}}$  de  $93,7 \pm 1,7$  y  $pD_2$  de 5,9. Finalmente, el efecto de DMQ fue aún mayor que ayanina y que el extracto, con  $CE_{50}$  de  $7,6 \times 10^{-5} \text{M}$ ;  $E_{\text{máx}}$  de  $132,4 \pm 1,6$  y  $pD_2$  de 6,1.





**Gráfica 1.** Curva de concentración – respuesta del extracto de *Croton schiedeanus*, ayanina, DMQ y control (DMSO) en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .

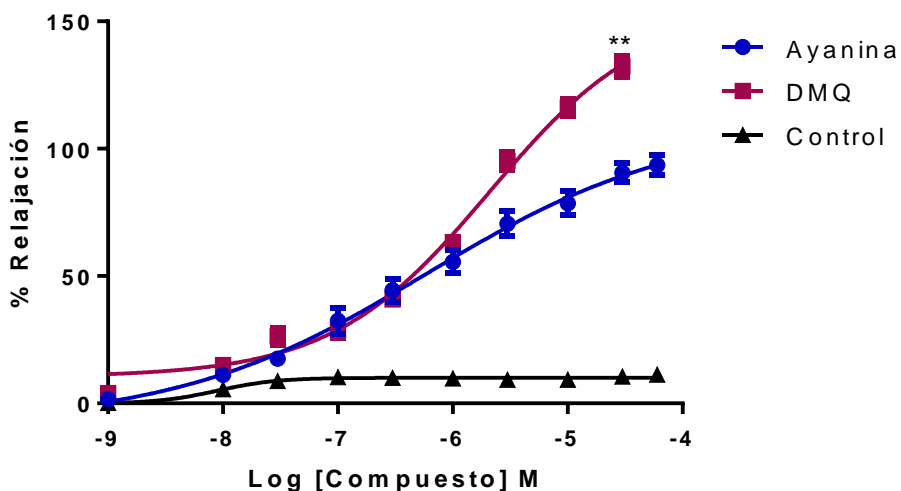
Cada punto se representa con su respectiva  $\pm \text{SEM}$  ( $n = 4 - 11$ ).  $**p < 0,01$  vs. Control.

Todos los valores de  $\text{CE}_{50}$  de la presente investigación fueron obtenidos mediante el software *GraphPad-Prism-6*® con un intervalo de confianza del 95%. En la tabla 2, se muestran los valores de  $\text{CE}_{50}$  y  $\text{pD}_2$  de ayanina, DMQ y del extracto etanólico de *Croton schiedeanus*, resultando menor el valor de  $\text{CE}_{50}$  de DMQ, así como el mayor  $\text{pD}_2$ ; por lo tanto, DMQ resulta ser el más potente de los tres, seguido de ayanina y del extracto.

**Tabla 2.** Valores de  $\text{CE}_{50}$  y de  $\text{pD}_2$ , de Ayanina, DMQ y extracto etanólico de *Croton schiedeanus*.

Compuesto	Ayanina	DMQ	Extracto <i>Croton schiedeanus</i>
$\text{CE}_{50}$ [g/mL]	$1,1 (0,89 - 1,3) \times 10^{-6}$	$8,9 (4,9 - 17) \times 10^{-7}$	$7,6 (2,5 - 23) \times 10^{-5}$
$\text{pD}_2$	5,9 (5,9 – 6,0)	6,1 (5,8 – 6,3)	4,1 (3,6 – 4,6)
$E_{\text{máx}}$ (%Relajación)	$93,7 \pm 1,7$	$132,4 \pm 1,6$	$101,6 \pm 3,1$

A continuación, se relacionan las curvas de concentración – respuesta de ayanina y DMQ, así como los valores de CE<sub>50</sub> y pD<sub>2</sub>.



**Gráfica 2.** Curva de concentración – respuesta de ayanina, DMQ y control (DMSO) en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .

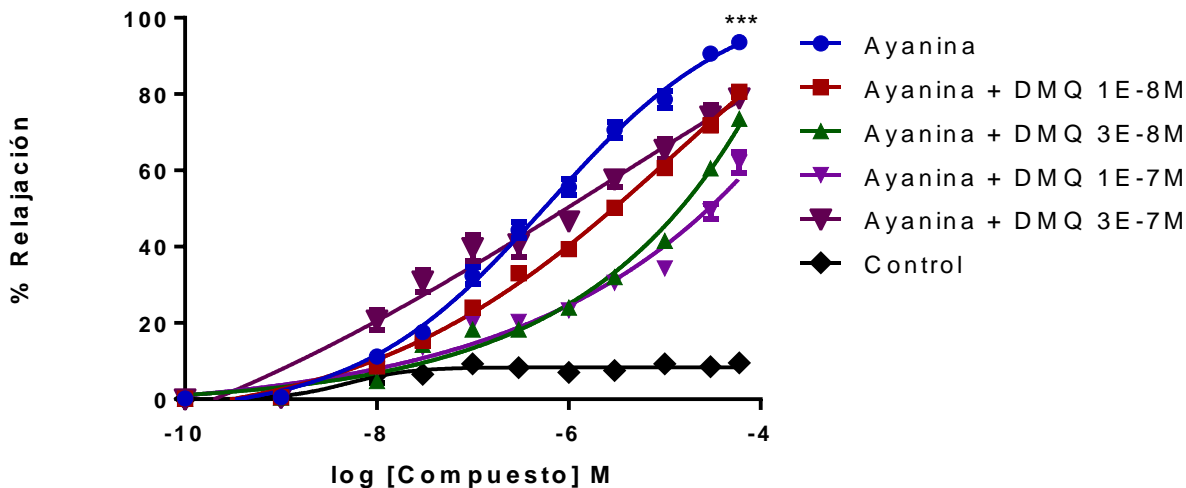
Cada punto se representa con su respectiva  $\pm \text{SEM}$  (n = 4 - 11). \*\*p < 0,01 vs. Control.

**Tabla 3.** Valores de CE<sub>50</sub> y de pD<sub>2</sub>, de Ayanina y DMQ.

Compuesto	Ayanina	DMQ
CE <sub>50</sub> [M]	3,1 (2,6 - 3,7) $\times 10^{-6}$	7,8 (6,6 – 9,1) $\times 10^{-7}$
pD <sub>2</sub>	5,5 (5,4 – 5,6)	6,1 (6,0 – 6,2)
E <sub>máx</sub> (%Relajación)	93,7 $\pm$ 1,7	132,4 $\pm$ 1,6

Posteriormente, se determinaron curvas de concentración – respuesta, de la vasorrelajación inducida por ayanina en anillos de aorta de rata Wistar, previamente contraídos con fenilefrina ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ), en concentraciones acumulativas ( $1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$  y  $6 \times 10^{-5} \text{M}$ ), en presencia y ausencia de 3,7-Di-O-metilquercetina en concentraciones acumulativas ( $1 \times 10^{-8}$ ,  $3 \times 10^{-8}$ ,  $1 \times 10^{-7}$ ,  $3 \times 10^{-7}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ ,  $3 \times 10^{-6}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $3 \times 10^{-5}$ ). Lo anterior, se realizó

paralelamente a una curva de control, adicionando alícuotas de DMSO en el mismo volumen de las alícuotas de los compuestos evaluados. En la gráfica 3, se puede observar que al añadir DMQ en concentraciones de  $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $3 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  y  $3 \times 10^{-7} \text{M}$ , se disminuye el efecto relajante de ayanina.



**Gráfica 3.** Curva de concentración – respuesta de ayanina en ausencia y presencia de las concentraciones más bajas evaluadas de DMQ en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .

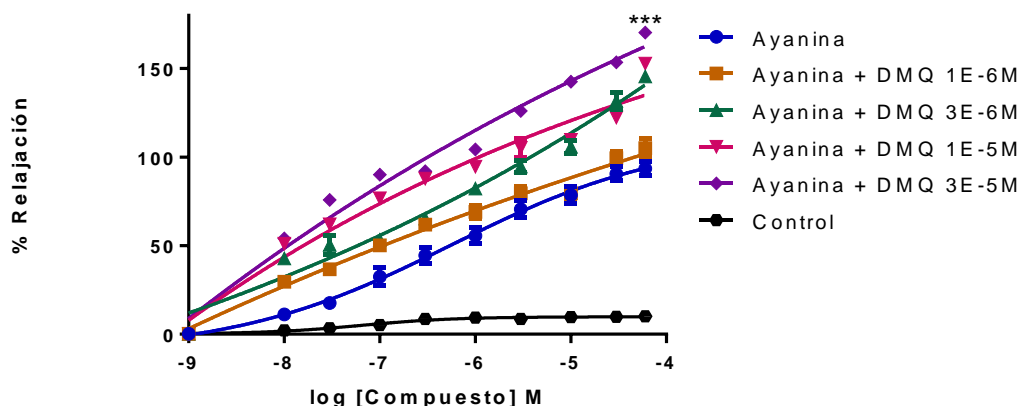
Cada punto se representa con su respectiva  $\pm \text{SEM}$  ( $n = 4 - 11$ ). \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control.

Se obtuvieron los valores correspondientes de  $\text{CE}_{50}$  y  $\text{pD}_2$  para cada una de las combinaciones de ayanina más DMQ evaluadas, en la tabla 4 se relacionan dichos valores para las cuatro concentraciones más bajas evaluadas de DMQ; donde dichos valores confirman que dichas concentraciones disminuyen la potencia y eficacia de ayanina.

**Tabla 4.** Concentración efectiva cincuenta de ayanina en presencia y ausencia de DMQ ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $3 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $1 \times 10^{-7} \text{M}$  y  $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ), en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.

Compuesto	Ayanina	Ayanina + DMQ $1 \times 10^{-8} \text{M}$	Ayanina + DMQ $3 \times 10^{-8} \text{M}$	Ayanina + DMQ $1 \times 10^{-7} \text{M}$	Ayanina + DMQ $3 \times 10^{-7} \text{M}$
<b>CE<sub>50</sub> [M]</b>	3,1 (2,6 - 3,7) $\times 10^{-6}$	8,1 (6,6 - 9,9) $\times 10^{-5}$	1,8 (1,3 - 2,5) $\times 10^{-4}$	8,1 (4,6 - 14) $\times 10^{-4}$	9,4 (6,1 - 14) $\times 10^{-5}$
<b>pD<sub>2</sub></b>	5,5 (5,4 - 5,6)	4,1 (4,0 - 4,2)	3,7 (3,6 - 3,9)	3,1 (2,9 - 3,3)	4,0 (3,9 - 4,2)
<b>E<sub>máx</sub> (%Relajación)</b>	93,7 $\pm$ 1,7	80,4 $\pm$ 0,7	73,3 $\pm$ 1,3	62,0 $\pm$ 2,7	78,9 $\pm$ 0,7

En la siguiente gráfica se muestra que, en lugar de disminuir el efecto relajante, las cuatro concentraciones de DMQ más elevadas evaluadas, incrementan el efecto vasorrelajante de ayanina, mejorando su eficacia, sobrepasando incluso el 100% de relajación, es decir que los anillos aórticos llegan a una tensión menor que la basal estabilizada inicialmente (2000mg).



**Gráfica 4.** Curva de concentración – respuesta de ayanina en ausencia y presencia de las concentraciones más altas evaluadas de DMQ, en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .

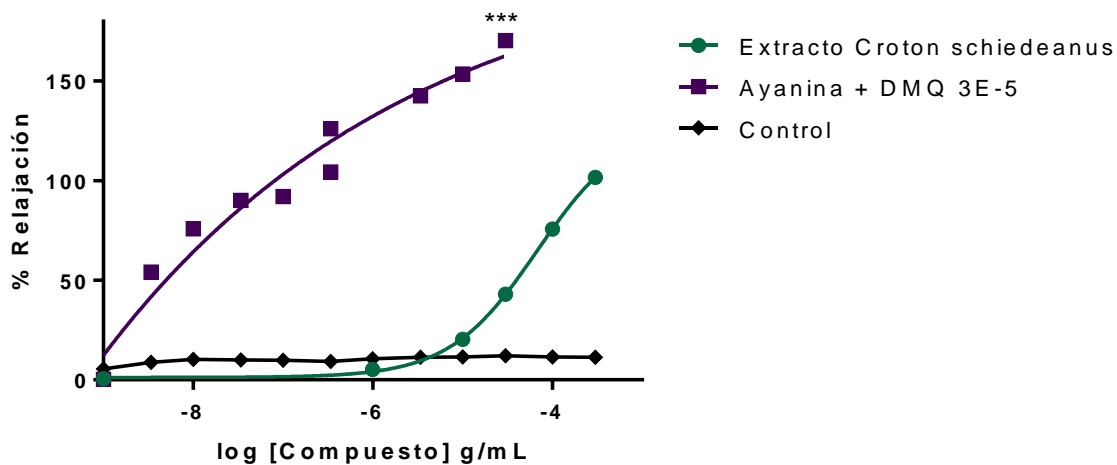
Cada punto se representa con su respectiva  $\pm \text{SEM}$  ( $n = 4 - 11$ ). \*\*\* $p < 0,001$  vs. Ayanina.

Por otro lado, los valores de  $CE_{50}$  y  $pD_2$  relacionados en la tabla 5, corresponden a las concentraciones más altas evaluadas de DMQ en presencia de ayanina, en donde dichos valores muestran que se mejora la eficacia y la potencia de ayanina.

**Tabla 5.** Concentración efectiva cincuenta de ayanina en presencia y ausencia de DMQ ( $1 \times 10^{-6}M$ ,  $3 \times 10^{-6}M$ ,  $1 \times 10^{-5}M$  y  $3 \times 10^{-5}M$ ), en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.

Compuesto	Ayanina	Ayanina + DMQ $1 \times 10^{-6}M$	Ayanina + DMQ $3 \times 10^{-6}M$	Ayanina + DMQ $1 \times 10^{-5}M$	Ayanina + DMQ $3 \times 10^{-5}M$
$CE_{50}$ [M]	3,1 (2,6 - 3,7) $\times 10^{-6}$	7,1 (5,5 - 9,0) $\times 10^{-6}$	1,0 (0,7 - 1,3) $\times 10^{-6}$	3,8 (2,6 - 5,5) $\times 10^{-7}$	1,2 (0,9 - 1,7) $\times 10^{-7}$
$pD_2$	5,5 (5,4 - 5,6)	5,1 (5,0 - 5,3)	6,0 (5,9 - 6,2)	6,4 (6,3 - 6,6)	6,9 (6,8 - 7,0)
$E_{m\acute{a}x}$ (%Relajaci3n)	93,7 $\pm$ 1,7	105,2 $\pm$ 2,2	145,6 $\pm$ 0,7	152,8 $\pm$ 0,8	170,1 $\pm$ 2,0

Adicionalmente, se hizo un análisis de la combinaci3n cuyo efecto máximo y potencia fueron las mayores, con el fin de compararla con el extracto etan3lico de *Croton schiedeanus*, el cual indica que efectivamente la combinaci3n es más eficaz y potente que el extracto.



**Gráfica 5.** Curva de concentración – respuesta de ayanina en presencia de DMQ  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ , en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .

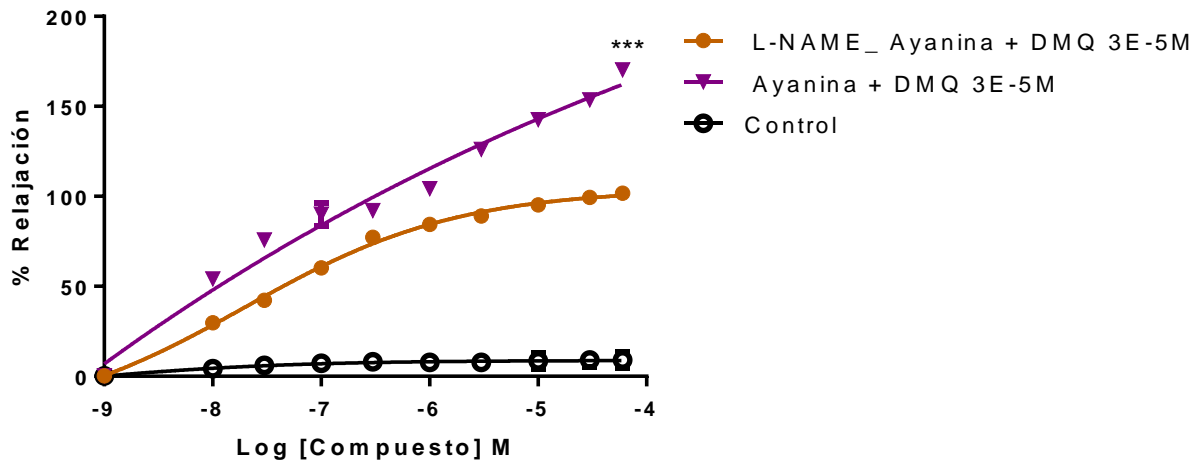
Cada punto se representa con su respectiva  $\pm \text{SEM}$  ( $n = 4 - 11$ ).  $***p < 0,001$  vs. Extracto de *Croton schiedeanus*.

**Tabla 6.** Concentración efectiva cincuenta de ayanina en presencia de DMQ  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ; y en extracto de *Croton schiedeanus* en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina.

Compuesto	Ayanina + DMQ $3 \times 10^{-5} \text{M}$	Extracto <i>Croton schiedeanus</i>
<b>CE<sub>50</sub> [g/mL]</b>	1,2 (0,9 – 1,7) $\times 10^{-7}$	7,6 (2,5 – 23) $\times 10^{-5}$
<b>pD<sub>2</sub></b>	6,9 (6,8 – 7,0)	4,1 (3,6 – 4,6)
<b>E<sub>máx</sub> (%Relajación)</b>	170,1 $\pm$ 2,0	101,6 $\pm$ 3,1

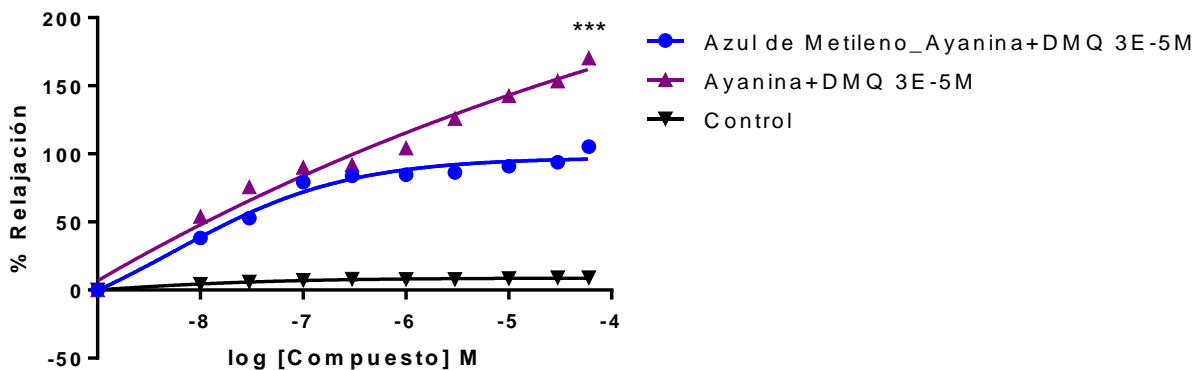
Luego de haber determinado las curvas de concentración – respuesta de ayanina en presencia y ausencia de concentraciones determinadas de DMQ, la concentración de  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  este último compuesto más ayanina, resulta ejerciendo el mayor efecto vasorrelajante y la mejor potencia; por ello, se considera dicha combinación para evaluarla en presencia de L-NAME y azul de metileno, compuestos que fueron añadidos justo cuando se alcanzó la máxima vasoconstricción

con fenilefrina, lo que manifestó una reducción del efecto relajante sin revertirlo totalmente. A su vez estos ensayos también se compararon con una curva control con DMSO.



**Gráfica 6.** Curva de concentración – respuesta de ayanina en presencia de DMQ  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  y L-NAME, versus ayanina más DMQ  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  sin L-NAME, en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .

Cada punto se representa con su respectiva  $\pm \text{SEM}$  (n = 4 - 11). \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control.

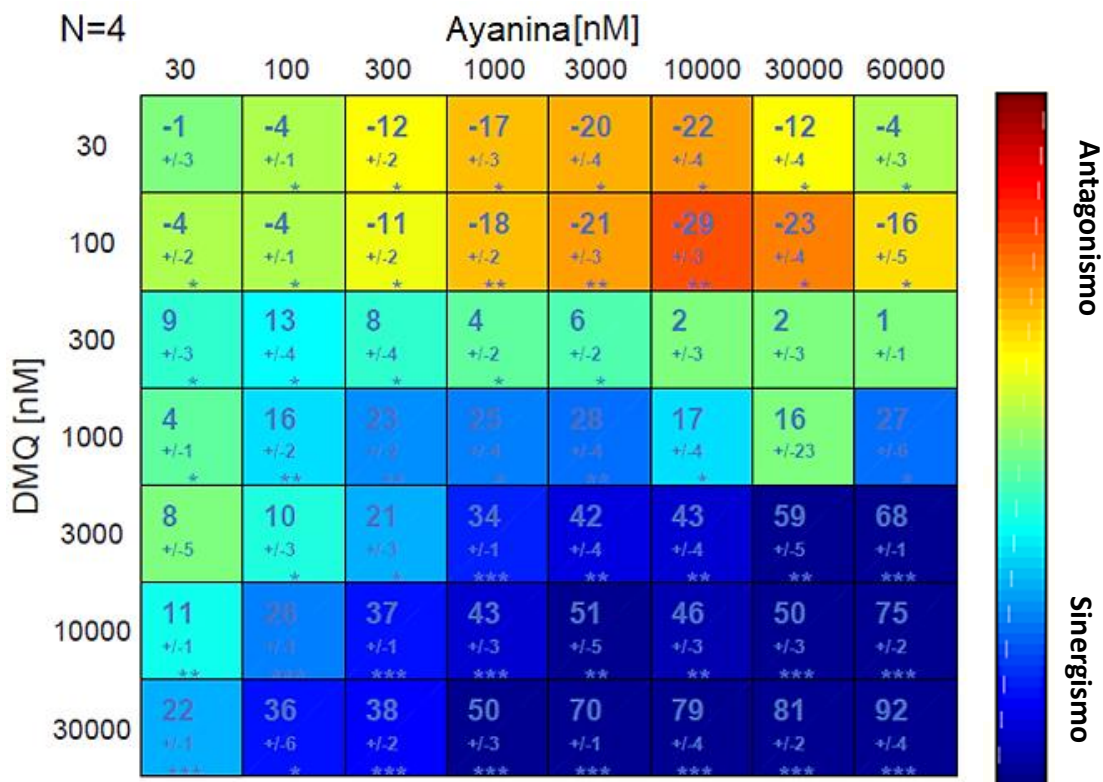


**Gráfica 7.** Curva de concentración – respuesta de ayanina en presencia de DMQ  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  y azul de metileno, versus ayanina más DMQ  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  sin azul de metileno, en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina  $1 \times 10^{-6} \text{M}$ .

Cada punto se representa con su respectiva  $\pm \text{SEM}$  (n = 4 - 11). \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control.

Las figuras 5 y 6, muestran que existe un efecto dual, tanto incremento en el efecto relajante, como disminución de éste, dependiendo de la concentración de DMQ que se adicione junto con ayanina. Se muestra una tabla en donde se correlaciona al mismo tiempo las diferentes concentraciones de ayanina y DMQ, y se observa el porcentaje de sinergismo entre estos dos compuestos, representando en azul de más claro a más oscuro, aquellas concentraciones que generan sinergismo; así como representa en una gama de amarillo a rojo a las concentraciones que resultan en antagonismo.

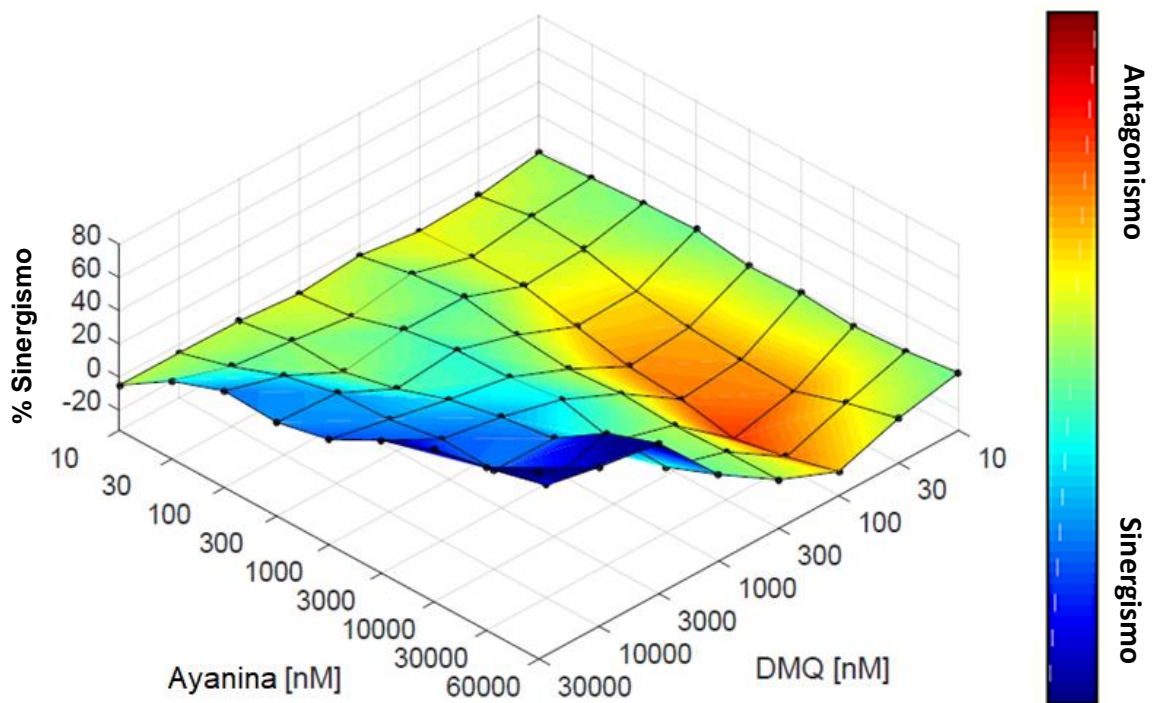
Es importante recalcar que cada uno de los puntos de la figura 6, representan las diferentes combinaciones de ayanina más DMQ, cuya altura sobre el cero (respecto del eje de % sinergia), indica que existe sinergismo, así como hay antagonismo en aquellas combinaciones que se sitúan por debajo del cero. De igual manera, si los puntos se ubican sobre el plano o cero de porcentaje de sinergia, indica que hay aditividad.



**Figura 5.** Matriz generada por *Combenefit* empleando el modelo de Loewe. Representa las interacciones de sinergismo y antagonismo entre ayanina y DMQ.

Donde \* hace alusión a la significancia estadística, de la siguiente manera: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; y \*  $p < 0,05$ .





**Figura 6.** Mapa de superficie generado por Combeneft empleando el modelo de Loewe.

Representa las interacciones de sinergismo y antagonismo de ayanina ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$  –  $6 \times 10^{-5} \text{M}$ ) más DMQ ( $1 \times 10^{-8} \text{M}$  –  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ).

## 5.2 Discusión de resultados

Este estudio mostró efectos relajantes tanto del extracto, como de los flavonoides ayanina y DMQ, mayores en el caso de estos últimos, de tipo sinérgico al aumentar la concentración de los agentes; y de tipo antagónico al disminuir su concentración. Estos efectos se ven disminuidos parcialmente, más no revertidos totalmente con la adición de L-NAME y azul de metileno.

La presente investigación buscó principalmente detectar e identificar si existe sinergismo entre los dos flavonoides ensayados: 3,7-Di-O-metilquercetina (DMQ) y 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina), debido a que son los compuestos mayoritarios en *Croton schiedeanus*, pero no se había investigado sus posibles interacciones. Para ello se tuvieron en cuenta los resultados expresados en curvas de concentración – respuesta, entendiéndose como respuesta, el porcentaje de relajación de los anillos aórticos previamente contraídos con fenilefrina.

Inicialmente se verificó el efecto relajante del extracto etanólico total de *Croton schiedeanus*, encontrando que dicho efecto es similar en comparación con el logrado con ayanina, puesto que es necesaria una concentración mayor de éste comparado con ayanina y DMQ para iniciar a ejercer el efecto evaluado, concentración mayor aún a las  $CE_{50}$  de los otros dos compuestos, por lo que el extracto resulta menos potente que los flavonoides evaluados, considerando también que tiene el menor valor de  $pD_2$  de los tres. Además, teniendo en cuenta investigaciones previas realizadas con *C. schiedeanus*, se puede decir que la  $CE_{50}$  resultante de esta investigación, es muy cercana a la reportada en la literatura en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina:  $7,6 \times 10^{-5} \text{g/mL}$  y respectivamente  $1,3 \times 10^{-5} \text{g/mL}$  (Torres M., Puebla P., Guerrero M., 2012).

Con respecto a la eficacia de los flavonoides evaluados individualmente, se encuentra que DMQ ejerce un efecto mayor en cuanto a relajación, en comparación con ayanina, por lo tanto, es su eficacia es mayor. De igual forma, los valores de  $CE_{50}$  y de  $pD_2$  indican que la potencia de DMQ es mayor que la de ayanina. Estudios previos reportan que la  $CE_{50}$  en anillos de aorta precontraídos con fenilefrina son de  $4,9 \times 10^{-6} \text{M}$  para DMQ (Hernández, S. X. C., Ibáñez, P. P., de la Calle, R. C., Calvo, M. L. M., del Barrio, L. S. R., & Pabón, 2008) y de  $5,4 \times 10^{-5} \text{M}$  para ayanina (Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M. L., San Román, L., & Guerrero, 2010). Sin embargo, en la presente investigación, se encontraron valores de  $CE_{50}$  de  $7,7 \times 10^{-7} \text{M}$  para DMQ y de  $3,1 \times 10^{-6} \text{M}$  para ayanina; resultando ser menores que los reportados en la literatura.

El hecho de que no todas las concentraciones de DMQ añadidas al mismo tiempo que ayanina resulten en un incremento del efecto relajante, ni que dicho efecto se incremente o disminuya en función de la concentración de los compuestos, puede relacionarse a que ambos flavonoides

ejercen un efecto pero son mutuamente excluyentes, en donde el uno o el otro puede ser activo en un momento dado (Breitinger, 2012).

Según el mayor efecto obtenido en cuanto al porcentaje de relajación, la combinación de compuestos que ejercen este efecto resultó siendo ayanina más DMQ  $3 \times 10^{-5} M$ , alcanzando un porcentaje de relajación mayor al 150%, lo que indica que los anillos aórticos precontraídos con fenilefrina alcanzaron una disminución en la tensión menor a 2000mg, que es la tensión basal estimada al momento de estabilizar los anillos, previo a la adición del agente contracturante.

Con el fin de determinar el tipo de interacción con cada una de las combinaciones de los flavonoides evaluadas, se analizaron los datos en la plataforma *Combeneft*, empleando el modelo de Loewe, el cual permite clasificar las respuestas de determinadas combinaciones de compuestos como sinergismo o antagonismo farmacológico (Tang, J., Wennerberg, K., & Aittokallio, 2015). Es posible observar que existe un efecto dual, tanto incremento en el efecto relajante, como disminución de este.

En la matriz del modelo de Loewe se correlaciona al mismo tiempo las diferentes concentraciones de ayanina y DMQ, y se muestra el grado de interacción entre estos compuestos, representando en azul de más claro a más oscuro, aquellas concentraciones que generan sinergismo; así como representa en una gama de amarillo, naranja y rojo a las concentraciones que resultan en antagonismo.

La definición exacta de sinergia farmacológica aún se encuentra en debate, es posible considerarla como un grado de interacción positiva al generar un efecto farmacológico, a diferencia de la eficacia, la cual es una medida de la respuesta de una combinación de fármacos, de tal manera que es posible que una combinación de compuestos resulte altamente sinérgica, pero al mismo tiempo sea insuficiente para alcanzar el efecto farmacológico esperado. Así como una combinación que ejerce un efecto muy elevado, no necesariamente implica que tendrá una interacción sinérgica (Tang, J., Wennerberg, K., & Aittokallio, 2015). Para efectos de los resultados de la presente investigación, es posible considerar que la interacción positiva encontrada se relaciona más con la definición de sinergismo que con la de aditividad, puesto que esta última considera la interacción positiva cuando la eficacia de los compuestos evaluados es igual, así como potencias mínimamente diferentes entre sí (Tallarida, 2001), condiciones que no se reflejan en los presentes resultados.

El efecto dual encontrado en los resultados, pueden correlacionarse con determinadas concentraciones de ayanina y DMQ adicionadas al tiempo en aorta de ratas Wistar en baño de

órgano aislado, lo cual resulta bastante interesante, puesto que, dentro de una misma planta y en un mismo extracto etanólico, se encuentran compuestos de similar estructura química con efectos diferentes cuando se adicionan juntos.

Los efectos duales se han observado en varias ocasiones en compuestos encontrados en plantas, para el caso de algunos flavonoides, se ha encontrado que manifiestan una amplia gama de actividades biológicas, entre las cuales se encuentran sus propiedades ansiolíticas, sin embargo, preparaciones de partes frescas de *Petiveria alliacea*, rica en flavonoides, pueden dar como resultado efectos opuestos sobre la ansiedad en ratones (Blainski, A., Piccolo, V. K., Mello, J. C. P., & de Oliveira, 2010).

Los flavonoides en general son capaces de inhibir varias enzimas *in vitro* (Mills, S., & Bone, 2012), sus mecanismos de acción en la membrana plasmática se asocian al transporte de iones a través de la membrana, como  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPasa,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y ATPasa mitocondrial, así como inhibición de AMPc o cGMP-fosfodiesterasa y de proteínas quinasas (Chiwororo & Ojewole, 2010). En un estudio realizado con Quercetina, en vena porta de ratas Wistar, se evidenció la dualidad del efecto vasorrelajante y contracturante, pese a que, en estudios previos la quercetina resultaba ejerciendo efecto vasodilatador en aorta aislada de rata. Los resultados que demuestran el efecto inhibitorio de la quercetina en la vena porta se relacionan a un aumento en el tono basal y en las frecuencias contráctiles, seguido por relajaciones secundarias más pronunciadas y duraderas (Chiwororo & Ojewole, 2010).

Retomando, los resultados mostraron un efecto dual, al examinar la relajación inducida por ayanina en concentraciones variables de DMQ; de tipo antagónico a bajas concentraciones, y de sinergismo a altas concentraciones. Sin embargo, hasta donde alcanza la revisión bibliográfica de esta investigación, no estaba documentada en estos flavonoides con efectos vasodilatadores. Teniendo en cuenta las proporciones relativas de ayanina y DMQ presentes en el extracto del orden de 6:1 (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., & Román, 2002), hay elementos para plantear que estos agentes ejercen efectos sinérgicos. Adicionalmente, al observar una potencia y eficacia de relajación de la combinación de estos flavonoides, ampliamente superior al obtenido con el extracto total, se encuentra sustento para proponer la obtención de un agente fitoterapéutico a base de estos dos agentes en proporción 6:1 como una posible fuente con fines vasodilatadores, y posiblemente antihipertensivos.

De acuerdo con lo anterior, al encontrar un menor rendimiento de DMQ, conviene correlacionarlo con concentraciones evaluadas en el presente trabajo, que sean afines a la proporción de los flavonoides evaluados. Las concentraciones que se acomodarían a dicha proporción serían cuando ayanina se encuentra entre  $6 \times 10^{-8} \text{M}$  y  $1,8 \times 10^{-5} \text{M}$ , y DMQ se encuentra en concentraciones comprendidas entre  $3,0 \times 10^{-8} \text{M}$  y  $3,0 \times 10^{-5} \text{M}$ . De estas concentraciones, aquellas que involucran una interacción de sinergismo son en las que ayanina se encuentra a una concentración de  $1,8 \times 10^{-5} \text{M}$ , y DMQ está presente a concentraciones comprendidas entre  $3 \times 10^{-6} \text{M}$  a  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ , que como se observó en los resultados, corresponde a las combinaciones con mayor potencia y eficacia.

Sumado a lo anterior, se hizo un análisis de la combinación cuyo efecto máximo y potencia fueron las mayores (ayanina + DMQ  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ ), con el fin de compararla con el extracto etanólico de *Croton schiedeanus*, el cual indica que efectivamente la combinación es más eficaz y potente que el extracto.

Gracias a investigaciones previas, se conoce que L-NAME revierte completamente el efecto relajante de ayanina. Por otro lado, también se sabe que el NO activa la guanilato ciclasa, causando la formación de cGMP, con consecuente relajación vascular; con esto, se relaciona el mecanismo de acción de este flavonoide con la vía NO/cGMP (Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M. L., San Román, L., & Guerrero, 2010) (Guerrero et al., 2002). Estudios anteriores muestran que DMQ es capaz de ejercer una respuesta vasorrelajante cercana al 100% en anillos aórticos precontraídos con fenilefrina, respuesta que fue corroborada con la presente investigación, también se corroboró la reversión del efecto relajante por parte de L-NAME y azul de metileno, los cuales se encuentran involucrados en la vía de NO/guanilato ciclasa (Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., & Román, 2002). Los resultados obtenidos en la presente investigación resultado sugieren que posiblemente hay una interacción de sinergismo en esta combinación de compuestos, puesto que se conocen por literatura que L-NAME revierte completamente el efecto relajante de ayanina, así como se conoce que L-NAME y azul de metileno revierten el efecto de DMQ. Sin embargo, al combinarse este compuesto con DMQ en concentración de  $3 \times 10^{-5} \text{M}$ , no se revierte el efecto de ayanina completamente, sólo se ve disminuido casi en un 50% para ambos casos (L-NAME y azul de metileno). Lo que fortalece la conclusión de que existe una interacción de sinergismo entre ayanina y DMQ dependiente de la concentración, y que probablemente en dicha interacción se esté inhibiendo parcialmente el efecto de L-NAME y azul de metileno. Por lo anterior, este estudio mostró que se ve reducida la vasorrelajación de ayanina más DMQ, pero se mantiene el efecto sinérgico, lo cual da a pensar

que el mecanismo sinérgico asociado a esta combinación estaría involucrando otras rutas metabólicas diferentes a las de NO/guanilato ciclasa.

La sinergia es considerada efectivamente como una ventaja de la complejidad química para los extractos obtenidos a partir de plantas, siempre y cuando el efecto y/o potencia de una combinación o mezcla de compuestos sea mayor que cada compuesto por separado, ejerciendo un efecto cooperativo; varios ejemplos dan fe de ello (Mills, S., & Bone, 2012); para efectos de la presente investigación, el mejoramiento del efecto vasorrelajante de ayanina en presencia de determinadas concentraciones de DMQ, aislados de *Croton schiedeanus*. Actualmente, es de creciente interés enfocar la investigación de interacciones sinérgicas en fitoterapia, teniendo presente siempre el cumplimiento en la medida de lo posible de mejorar el efecto terapéutico disminuyendo efectos adversos, proyectando la investigación hacia una fitoterapia que involucre la combinación de varios compuestos. Para concluir este estudio, puede decirse que se logró determinar que el uso combinado de los principales metabolitos de *C. schiedeanus* (ayanina más DMQ) permite plantear una posible base de un fitoterapéutico.

## 6. Capítulo 6

### 6.1 Conclusiones

- ✓ La combinación de los metabolitos 3,7-Di-O-metilquercetina y ayanina a determinadas concentraciones, mejoran el efecto vasodilatador del extracto total de *Croton schiedeanus*.
- ✓ Es evidente la existencia de un efecto dual de tipo antagónico a bajas concentraciones de ayanina más DMQ, y sinérgico a altas concentraciones de estos mismos.
- ✓ Existen combinaciones de los flavonoides evaluados que presentan sinergismo, y a su vez se acomodan a la proporción en la que se encuentran en la planta (1:6 DMQ y ayanina, respectivamente).
- ✓ La disminución parcial de la vasorrelajación con los inhibidores de la vía de NO/guanilato ciclasa demuestra que el sinergismo entre ayanina y DMQ está asociado a esta combinación estaría involucrando otras rutas metabólicas diferentes a las de NO/guanilato ciclasa.

## 6.2 Recomendaciones

Se recomienda trasladar este trabajo hacia el desarrollo de un modelo *in vivo* que permita posteriormente evaluar el comportamiento de la combinación 3,7-Di-O-metilquercetina y 3,7,4'-Tri-O-metilquercetina (ayanina). Lo anterior, como un requisito previo a la estructuración de ensayos preclínicos y clínicos controlados, así como con miras a la generación de oportunidades de aprovechamiento productivo de la especie *Croton schiedeanus*.



# **Aspectos éticos, legales y ambientales**

## **Aspectos éticos y legales**

Este trabajo se realizó empleando la técnica de baño de órgano aislado (con anillos de aorta de rata), en la cual se reduce el dolor del animal al máximo gracias a la anestesia aplicada durante el procedimiento previo a la resección de la aorta. Se consideró lo referente a la Ley 84 de 1989, de conformidad con las “Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, establecida en la Resolución 8430 de 1993, del Ministerio de Salud de Colombia, y siguiendo los lineamientos trazados en la “Guía para el uso de animales de laboratorio” de la Universidad Nacional de Colombia. Además, se llevó a cabo según lo dispuesto por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

## **Impacto ambiental**

Las actividades realizadas durante la ejecución de esta investigación no tuvieron efectos negativos sobre el medio natural y la salud humana, puesto que los efectos que se pudieron haber derivado de los desechos químicos y anatomopatológicos animales que se generaron, se encontraban controlados, mediante el cumplimiento del Manual General de Bioseguridad para la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia, el cual está basado en la normatividad vigente.

## Grupo de investigación que soportó la investigación

El Grupo de Investigaciones en Farmacología Molecular lleva a cabo estudios encaminados a evaluar agentes con potencial utilidad en el campo cardiovascular y del sistema nervioso central que sirvan de base para la obtención de prototipos farmacológicos; pretende también establecer alianzas con grupos de química medicinal y de tecnología farmacéutica para trabajar mancomunadamente en la identificación de moléculas y estandarización de extractos con posible aplicación terapéutica.

En miras de convertirse en grupo de referencia en la investigación de moléculas con potencial farmacológico en los campos cardiovascular y de sistema nervioso central, ha incursionado en la obtención de derivados cumarínicos con efectos farmacológicos promisorios sobre el sistema nervioso central, de tipo antidepresivo y antiparkinsoniano; así como en la síntesis de pirazolotriazinas con efectos anticonvulsivantes. Por otro lado, ha venido trabajando en el campo cardiovascular, estudiando las propiedades antihipertensivas de especies medicinales colombianas, como *Croton schiedeanus* o “almizclillo”, y *Solanum tuberosum* “papa”, ésta última con propiedades antiaregantes adicionalmente.

## Bibliografía

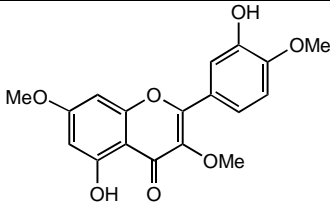
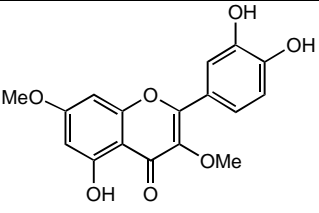
- A. Salatino, F. Salatino, G. N. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (*Euphorbiaceae*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 11–33.
- Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 317–325.
- Barrera, C., Andrés, C., Constanza Gómez, D., & Castiblanco, F. A. (2016). Importancia medicinal del género Croton Medicinal importance of Croton genus (*Euphorbiaceae*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 234–247.
- Bjørklund, G., Dadar, M., Chirumbolo, S., & Lysiuk, R. (2017). Flavonoids as detoxifying and pro-survival agents: What's new? *Food and Chemical Toxicology*, 110, 240–250.
- Blainski, A., Piccolo, V. K., Mello, J. C. P., & de Oliveira, R. M. (2010). Dual effects of crude extracts obtained from *Petiveria alliacea* L.(Phytolaccaceae) on experimental anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 541–544.
- Breitinger, H. G. (2012). Drug Synergy – Mechanisms and Methods of Analysis. In P. B. Acree (Ed.), *Toxicity and Drug Testing* (pp. 143–166). InTech.
- Carrón, R., Sanz, E., Puebla, P., Martín, M. L., San Román, L., & Guerrero, M. F. (2010). Mechanisms of relaxation induced by flavonoid ayanin in isolated aorta rings from Wistar rats. *Colombia Médica*, 41, 2–8.
- Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis , biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 1–16.
- Chiwororo, W. D. H., & Ojewole, J. A. O. (2010). Cardiovascular Topics Dual effect of quercetin on rat isolated portal vein smooth muscle contractility. *Cardiovascular Journal of Africa*, 21(3), 132–136.
- Gradman, A. H., Basile, J. N., Carter, B. L., & Bakris, G. L. (2010). Combination therapy in hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*, 4(2), 90–98.

- Guerrero, M. F., Carrón, R., Martín, M. L., San Román, L., & Reguero, M. T. (2001). Antihypertensive and vasorelaxant effects of aqueous extract from *Croton schiedeanus* Schlecht in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *75*, 33–36.
- Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., & Román, L. S. (2002). Quercetin 3, 7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *Pharmacy and Pharmacology*, *54*(10), 1373–1378.
- Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., & San Román, L. (2004). Vasorelaxant effect of new neo-clerodane diterpenoids isolated from *Croton schiedeanus*. *Journal of Ethnopharmacology*, *94*, 185–189.
- Guerrero, M. F., Puebla, P., Carrón, R., Martín, M. L., Arteaga, L., & San Román, L. (2002). Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *80*, 37–42.
- Guerrero, M. F. (2001). *Evaluación de la actividad antihipertensiva y relajante vascular de plantas medicinales colombianas*. Universidad de Salamanca, Salamanca, España.
- Guerrero, M. F. (2016). *Guía para la evaluación farmacológica de agentes vasodilatadores en Baño de Órgano Aislado*. (Universidad Nacional de Colombia, Ed.) (Primera Ed). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Guerrero, M. F., Puebla, P., Reguero, M. T., & Arteaga, L. (2002). Inhibitory Effect of N (G)-Nitro-L-arginine Methyl Ester on the Anti-Adrenergic Response Elicited by Ayanin in the Pithed Rat. *Planta Médica*, *68*, 322–325.
- Guerrero Pabón, M. F. (2001). *Evaluación de la actividad antihipertensiva y relajante vascular de plantas medicinales colombianas*. Universidad de Salamanca.
- Hardman, J., & Goodman, L. L. (2012). *Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (McGraw-Hill, Ed.) (12th ed.). McGraw-Hill.
- Hernández, S. X. C., Ibáñez, P. P., de la Calle, R. C., Calvo, M. L. M., del Barrio, L. S. R., & Pabón, M. F. G. (2008). Perfil vasodilatador de compuestos flavonoides y fenilbutanoides aislados de *Croton Schiedeanus* Schlecht. *Revista Facultad de Medicina*, *56*, 291–301.
- Kjeldsen, S. E. (2017). Hypertension and cardiovascular risk: general aspects. *Pharmacological Research*, *1*, 1–20.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, *0*, 1–16.
- Luqman, S., & Pezzuto, J. M. (2010). NF  $\kappa$  B: A Promising Target for Natural Products in Cancer Chemoprevention. *Phytotherapy Research*, *963*, 949–963.
- Maciel, MAM. Cortez, J. K. P. C. (2006). *O gênero Croton e Aspectos Relevantes de Diterpenos*

- Clerodanos. Croton Genus and Relevant Aspects of Clerodane Diterpenes. Universidade Federal do Rio Grande do Norte (Vol. 2).*
- Macready, A. L., George, T. W., Chong, M. F., Alimbetov, D. S., Jin, Y., Vidal, A., ... Study, F. (2014). Flavonoid-rich fruit and vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease — FLAVURS: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, (5), 1–11.
- Mills, S., & Bone, K. (2012). Principles of herbal pharmacology. In *Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine* (pp. 45–82). Churchill Livingstone: Elsevier.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2017). *DÍA MUNDIAL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL Colombia – mayo 17 de 2017*. Bogotá. Retrieved from [ish-world.com/events/e/World-Hypertension-Day-2016/](http://ish-world.com/events/e/World-Hypertension-Day-2016/)
- Observatorio Nacional de Salud. (2013). *Enfermedad cardiovascular: Boletín técnico ONS*. Retrieved from <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Boletin-tecnico-1-ONS.pdf>
- Ordunez P., Martinez R., Niebylski M., C. N. (2017). Hypertension Prevention and Control in Latin America and the Caribbean. *The Journal of Clinical Hypertension*, 17, 499–502.
- Páez, M. T., Rodríguez, D. C., López, D. F., Castañeda, J. A., Buitrago, D. M., Cuca, L. E., & Guerrero, M. F. (2013). *Croton schiedeanus* Schltd prevents experimental hypertension in rats induced by nitric oxide deficit. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 865–871.
- Puebla, P., López, J. L., Guerrero, M., Martí, M. L., San Román, L., & San Feliciano, A. (2003). Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus*. *Phytochemistry*, 62(4), 551–555.
- Rees, A., Dodd, G., & Spencer, J. (2018). The Effects of Flavonoids on Cardiovascular Health: A Review of Human Intervention Trials and Implications for Cerebrovascular Function. *Nutrients*, 10(12), 1852.
- Ritz, C., & Streibig, J. C. (2014). From additivity to synergism — A modelling perspective. *Synergy Research*, 1(1), 22–29.
- Salatino, A., Salatino, M. L. F., & Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (*Euphorbiaceae*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11–33.
- Schweim, J. K., & Schweim, H. G. (2014). Status quo and future developments of combinations of medicinal products. *Synergy Research*, 1(1), 70–75.
- Schweim, H. G. (2017). Synergistic effects — Is it possible to make “the devil an angel”? *Synergy*, 4, 8–12.

- Sherbet, G. V. (2017). The Anti-Cancer Potential of Flavonoids. In *Molecular Approach to Cancer Management* (pp. 151–162). Elsevier Inc.
- Tallarida, R. J. (2001). Drug Synergism: Its Detection and Applications. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 865–872.
- Tallarida, R. J. (2011). Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. *Genes y Cáncer*, 2, 1003–1008.
- Tang, J., Wennerberg, K., & Aittokallio, T. (2015). What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 1–5.
- Torres M., Puebla P., Guerrero M., et al. (2012). Vasodilatación inducida por *Croton schiedeanus* Schlecht vinculada con la ruta metabólica de guanilato ciclasa. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 41(1), 36–49.
- Ulrich-Merzenich, G. S. (2014). Combination screening of synthetic drugs and plant derived natural products — Potential and challenges for drug development. *Synergy Research*, 1(1), 59–69.
- Vargas, F., Ocete, M. A., Duarte, J., Pe, R., Zarzuelo, A., Tamargo, J., & Pe, F. (2001). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 133, 117–124.
- Veroli, G. Y. Di, Fornari, C., Wang, D., Bramhall, J. L., Richards, F. M., & Jodrell, D. I. (2016). Systems biology Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*, 32, 2866–2868.
- Wagner, H. (2011). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, 82(1), 34–37.
- Whelton, PK. Carey, RM. Aronow, W. (2017). 2017 Guideline for High Blood Pressure in Adults - American College of Cardiology. Retrieved December 1, 2018, from <https://www.acc.org/latest-in-cardiology/ten-points-to-remember/2017/11/09/11/41/2017-guideline-for-high-blood-pressure-in-adults>
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., & He, K. (2014). Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92, 133–147.

## A. Anexo: RMN $^{13}\text{C}$ de ayanina y DMQ

Nombre del compuesto	3,7,4'-Tri-O-Metilquercetina (Ayanina)	3,7-Di-O-metilquercetina (DMQ)
N $^{\circ}$ C		
2	155,6	155,9
3	138,1	137,8
4	178,0	178,0
5	160,9	160,9
6	97,6	97,6
7	165,0	165,0
8	92,1	92,1
9	156,2	156,1
10	105,1	105,1
1'	122,1	120,7
2'	115,0	115,5
3'	146,3	145,2
4'	150,2	148,8
5'	111,7	115,7
6'	120,3	120,6
OMe	55,5	56,0
	55,9	59,5
	59,6	

(Guerrero, 2001).

## B. Anexo: Supuestos del modelo de Loewe

Para el modelo de Loewe, el efecto de referencia para la combinación  $(a,b)$  se calcula al encontrar dos dosis  $a_u$  y  $b_u$ :

$$E_A(a_u) = E_B(b_u)$$

Para el cual se verifica la ecuación de la isobola:

$$\frac{a}{a_U} + \frac{b}{b_U} = 1$$

Estas dos ecuaciones se resuelven numéricamente para  $(a_u, b_u)$ . La solución numérica se usa para definir el efecto de referencia como:

$$R_{AB\_Loewe}(a, b) = E(a_u) = E_B(b_u)$$

Debido a que se consideran curvas monotónicas de dosis-respuesta, si existe una solución, esta solución es única (es decir, el proceso de optimización encuentra un mínimo global). Se debe tener en cuenta que, si por ejemplo, A tiene una eficacia menor que B, no existe una solución para las concentraciones de  $b$  suficientemente altas como para que  $E_B(b) < \min(E_A)$ . Por lo tanto, la aplicabilidad del modelo de Loewe es en principio limitada.

Sin embargo, para los casos en donde la ecuación original de la isobola del modelo de Loewe no se puede usar debido a las diferencias en los efectos máximos, se desarrolla una extensión del modelo de Loewe. De hecho, siempre se puede suponer con seguridad que concentraciones muy altas de A inducen efectos superiores a la eficacia observada (todos los compuestos son tóxicas en concentraciones suficientemente altas). Por lo tanto, si consideramos una concentración  $a_u$  que es lo suficientemente grande, la relación  $a/a_u$  se vuelve infinitamente pequeña y de acuerdo con la ecuación de la isobola, obtenemos:

$$\frac{b}{b_U} = 1$$



Por lo tanto, para las concentraciones de  $b$  que inducen efectos más allá del efecto máximo observado de A, se amplía el modelo de Loewe definiendo la siguiente referencia:

$$R_{AB\_Loewe}(a, b) = E(b_u) = E_B(b)$$