



Evaluación farmacológica de distintos extractos de los rabos de cereza (*Prunus avium* L.)

Ane Arbelaiz Sarasola

Trabajo presentado en el Instituto Politécnico de Bragança y en la Universidad de Salamanca para la obtención del título de Máster en Farmacia y Química de Productos Naturales

Orientado por:

Rosalía Carrón de la Calle

María Angeles Sevilla Toral

Pablo Anselmo García García

Bragança

2016

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha podido realizar gracias a la colaboración de mucha gente, que me ha acompañado durante todas las etapas del proyecto aportando cada una de ellas algo esencial para llevarlo a cabo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras, las Doctoras Rosalía Carrón y M^a Ángeles Sevilla, por apoyarme, enseñarme y ayudarme en la realización de este proyecto. También a los compañeros del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Salamanca, en especial a Pedro Santos, por ayudarme en todo lo que me ha hecho falta y por su apoyo y amistad.

Quiero agradecer también al Doctor Pablo A. García, del Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad de Salamanca, por su apoyo, disponibilidad y enseñanzas en la realización de este trabajo.

Agradecer también al Doctor Julio López y a Sergio Parejo, del Área de Parasitología de la Universidad de Salamanca, por realizar los ensayos e intentar que comprendiera el funcionamiento del protocolo que realizaban de principio a fin.

A la Doctora Lillian Barros, del Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada del Instituto Politécnico de Bragança, y al Doctor Cesar Raposo Funcia, responsable del Servicio General de Espectrometría de Masas de la Universidad de Salamanca, por ayudarme con la identificación de los compuestos de los extractos obtenidos.

Al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología y, en especial, a José Joaquín Pérez Alonso, por permitirme utilizar los aparatos de sus laboratorios para la realización de este trabajo.

A la Doctora Isabel Ferreira y al GRI del Instituto Politécnico de Bragança por la ayuda en la obtención de la beca Erasmus+ para estancias con fines de aprendizaje.

De nuevo a la Doctora Isabel Ferreira y al Doctor Pablo A. García por hacer posible que año tras año este Máster siga adelante, y a los docentes del mismo, tanto del Instituto Politécnico de Bragança como de la Universidad de Salamanca, por su dedicación y por lo que hemos aprendido de ellos.

A mis compañeros del máster, Beñat, Joana, Liane, Maitane y Mireia, por hacer de estos dos años una experiencia increíble y por aguantarme en los buenos y malos momentos.

A la gente que he conocido gracias a mi estancia en Salamanca, que aunque hace relativamente poco que los conozco, me han hecho pasar momentos increíbles e inolvidables.

A mi familia, en especial a mis padres, Conchi y Juan Mari, y a mi hermana, Olaia, por el apoyo incondicional y porque, aunque estoy segura de que a veces no entienden por completo de lo que estoy hablando, siempre se han interesado por lo que he hecho.

Y por último, dar las gracias a todos mis amigos, por animarme a seguir adelante en los malos momentos y alegrarse cuando todo estaba bien, por escuchar mis historias sin entenderlas y por interesarse en lo que hago y querer entenderlo.

A TODOS UN AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Índice

Lista de abreviaturas	6
Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción	10
<i>Prunus avium</i> L.	15
Composición y bioactividad de los frutos de <i>Prunus avium</i> L.....	16
Composición y bioactividad de los rabos de cereza.....	20
2. Objetivos	24
3. Materiales y métodos	25
Reactivos y disolventes	25
Extracción	25
Soluciones nutricias.....	25
Sustancias utilizadas.....	25
Tratamiento del material vegetal.....	26
Recolección y preparación del material vegetal.....	26
Fraccionamiento fitoquímico	27
Identificación primaria	28
Ensayos in vitro en arteria aorta de rata	29
Evaluación del efecto vasodilatador.....	30
Curva concentración-respuesta a fenilefrina	31
Disfunción endotelial por pirogalol.....	32
Ensayo de biodisponibilidad del óxido nítrico	32
Actividad antioxidante	33
Ensayo de actividad captadora de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	33
Determinación del anión superóxido.....	34
Expresión y análisis estadístico de los resultados	36
4. Resultados y discusión	37
Extractos obtenidos de <i>P. avium</i> y sus rendimientos	37
Identificación de los compuestos volátiles de los extractos de hexano y diclorometano.....	37
Extracto de hexano	37
Extractos de diclorometano.....	39
Ensayos in vitro en arteria aorta de rata	42

Evaluación del efecto vasodilatador.....	42
Curvas concentración-respuesta a fenilefrina.....	46
Ensayo de biodisponibilidad de óxido nítrico	48
Actividad antioxidante	49
Ensayo de actividad captadora de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	49
Determinación del radical superóxido.....	51
Disfunción endotelial por pirogalol:	53
5. Referencias	56
ANEXO I	62

Lista de abreviaturas

ACh: acetilcolina

AcOEt: acetato de etilo

BH₄: tetrahidrobiopterina

BuOH: *n*-butanol

CAT: catalasa

CE₅₀: concentración de extracto correspondiente al 50% de actividad

DCM: diclorometano

DCM_i: fracción insoluble en frío de diclorometano

DCM_s: fracción soluble en frío de diclorometano

DDC: *N,N'*-dietilditiocarbamato de amonio

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

E-: arterias aorta sin endotelio

ECV: enfermedad cardiovascular

EGTA: ácido bis(2-aminoetil)etilenglicol-*N,N,N',N'*-tetraacético

E_{max}: efecto máximo

ERO: especies reactivas de oxígeno

FE: fenilefrina

GC: cromatografía de gases

cGMP: 3',5'-guanosina monofosfato cíclico

GPx: glutatión peroxidasa

INE: Instituto Nacional de Estadística

K-PSS: solución hiperpotásica (124 mM)

L-NAME: ester metílico de *N*-nitro-*L*-arginina

MeOH: metanol

MS: espectrometría de masas

NADPH: nicotinamida adenin-dinucleótido fosfato

NMA: *N*-metilacridona

NO: óxido nítrico

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

O₂⁻: anión superóxido

OH⁻: anión hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONOO⁻: peroxinitrito

SOD: superóxido dismutasa

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en el mundo. La alteración del endotelio vascular y el incremento del estrés oxidativo están asociados al desarrollo de algunas enfermedades cardiovasculares, por lo que la incorporación de antioxidantes a la dieta puede ser una buena terapia alternativa.

Pese a su gran uso en la medicina tradicional y a ser un producto de desecho que se puede adquirir en gran cantidad, se han realizado pocos estudios sobre los rabos de cereza. Dado que en estudios previos se identificaron varios compuestos polifenólicos en esta matriz y la actividad beneficiosa de este tipo de compuestos sobre la salud cardiovascular ya está descrita, nos planteamos estudiar el efecto antioxidante y la actividad vascular de distintos extractos polifenólicos de *P. avium*.

Hemos realizado un fraccionamiento con los rabos de cereza secos y triturados utilizando disolventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua y decocción del marco vegetal. Además, se han realizado dos preparaciones acuosas al 0,5%, infusión y decocción, que representan las formulaciones tradicionalmente utilizadas por la población general. Los extractos más apolares se analizaron por la técnica GC-MS y los resultados se compararon con bases de datos de espectros y con publicaciones, con el fin de identificar los compuestos presentes.

En total, fueron identificados 13 compuestos en los extractos apolares de *P. avium*: el ácido palmítico, 7 hidrocarburos lineales (*n*-pentacosano, *n*-hexacosano, *n*-heptacosano, *n*-octacosano, *n*-nonacosano, *n*-triacontano y *n*-hentriacontano) y el perfil de fitosteroles (campesterol, estigmasterol, clerosterol, β -sitosterol y Δ^5 -avenasterol).

Los ensayos de reactividad vascular se realizaron en anillos aislados de arteria aorta de rata. Se valoró la actividad vasodilatadora directa mediante la construcción de curvas concentración-respuesta y se investigó su mecanismo de acción incubando con diferentes bloqueantes. Además, se valoró su capacidad antioxidante sobre radicales DPPH y radicales superóxido generados por pirogalol y NADPH.

Los resultados muestran que todos los extractos presentan un efecto vasodilatador dependiente fundamentalmente del endotelio y que el mecanismo de acción está relacionado con la vía del óxido nítrico. Además, demostramos que todos los extractos ensayados tienen la capacidad para neutralizar de radicales libres excepto la decocción del marco vegetal.

Abstract

Cardiovascular diseases are the main cause of death globally. Alteration of vascular endothelium and increased oxidative stress are related with the development of some cardiovascular diseases, so the incorporation of antioxidant to diet can be a good alternative therapy.

Despite its large use in the traditional medicine and the fact that it is a waste product that can be purchased in large quantity, there are few studies about cherry stalks. In previous studies, several polyphenolic compounds were identified in this matrix and the beneficial activity on cardiovascular health of this kind of compounds is already described, so we decided to study the antioxidant effect and the vascular activity of polyphenolic cherry tail extracts.

Fractionation was performed with dried and crushed cherry stalks using different polarity solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, methanol and water and a decoction of vegetable frame. In addition, there have been done two aqueous preparations at a rate of 0.5%, infusion and decoction, representing the formulations traditionally used by the general population. More apolar extracts were analyzed by GC-MS technique and the results were compared with spectra databases and publications, in order to identify the compounds present.

In total, 13 compounds were identified in the apolar extracts of *P. avium*: palmitic acid, 7 linear hydrocarbons (n-pentacosane, n-hexacosane, n-heptacosane, n-octacosane, n-nonacosane, n-triacontane and n-hentriacontano) and the profile of phytosterols (campesterol, stigmasterol, clerosterol, β -sitosterol and Δ^5 -avenasterol).

Vascular reactivity tests were performed on isolated rat aorta rings. Direct vasodilator activity was assessed by constructing concentration-response curves and its mechanism of action incubating with different blockers was investigated. In addition, its antioxidant capacity on DPPH radical and superoxide radicals generated by pyrogallol and NADPH was assessed.

The results show that the extracts have a vasodilating effect dependent mainly on the endothelium and that the mechanism of action is related to the nitric oxide pathway. In addition, we show that all the tested extracts have free radical scavenging capacity except the vegetable frame decoction.

1. Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que en 2012 murieron 17,5 millones de personas por esta causa, es decir, causó el 31% de las muertes registradas en el mundo (OMS, 2016).

Según los últimos datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), referidos a 2014, en España las ECV son la primera causa de muerte seguido de los tumores y las enfermedades del sistema respiratorio. Si diferenciamos las muertes por sexos, las ECV son la primera causa de mortalidad femenina y la segunda masculina, con una tasa de 270,2 y de 234,6 por cada 100 000 habitantes respectivamente (Fig. 1).

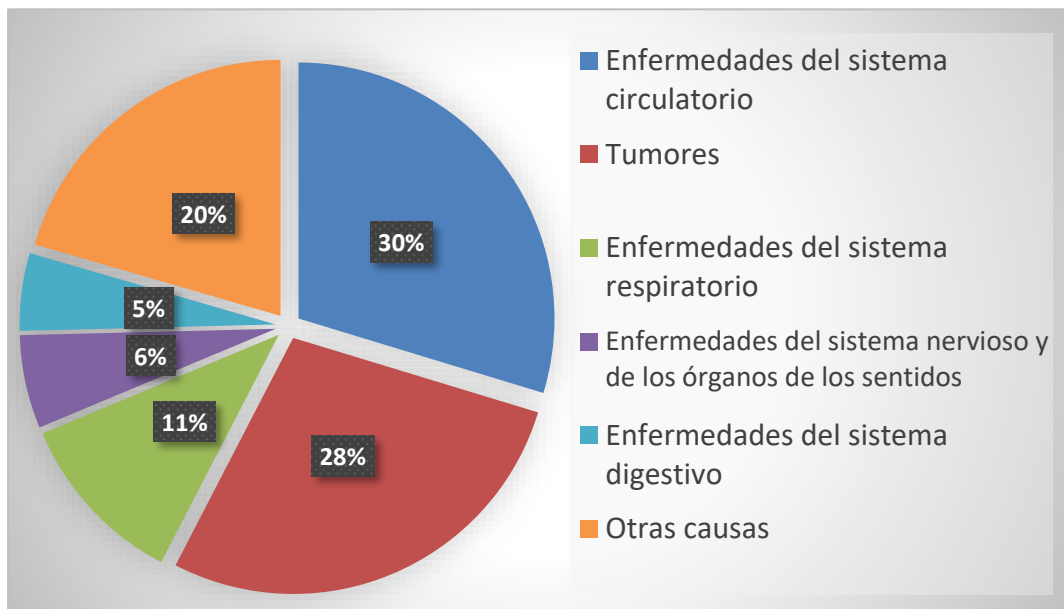


Figura 1. Principales causas de muerte en España en el 2014 (INE, 2016).

En los datos recogidos por Eurostat referentes al año 2013 (Fig. 2), puede observarse que, en España y en Portugal, las defunciones por ECV están por debajo de la media de la Unión Europea (Eurostat, 2016). Hay varios estudios que hablan sobre el efecto beneficioso de la dieta mediterránea en la salud cardiovascular. Dicha dieta está caracterizada por el alto consumo de grasas, principalmente en forma de aceite de oliva, el elevado consumo de cereales no refinados, frutas, verduras, legumbres y frutos secos, el consumo moderado-alto de pescado, el consumo moderado-bajo de carne blanca y productos lácteos en forma de yogur o queso fresco, el bajo consumo de carne roja y productos derivados de la carne y el consumo moderado de vino con las comidas (Arós

y Estruch, 2013). Diversos estudios estadísticos realizados en Europa verifican la relación inversa entre la tasa de muertes por ECV y el consumo de frutas y verduras.

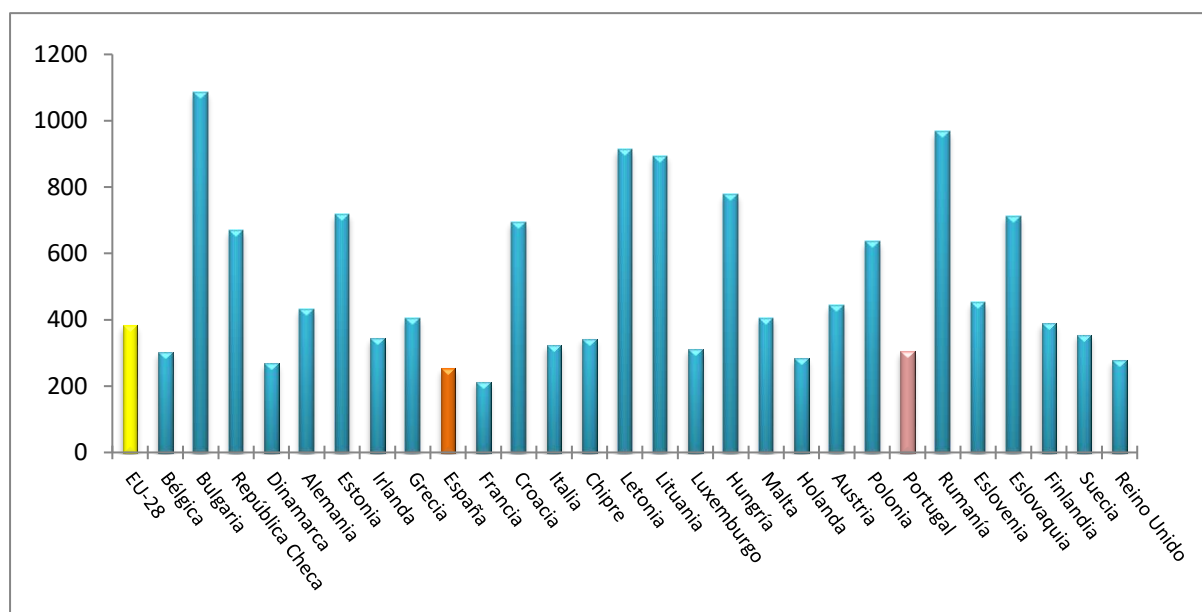


Figura 2. Defunciones por cada 100.000 habitantes debidas a ECV en Europa en el 2013 (Eurostat, 2016).

La mayoría de los casos de ECV pueden explicarse por la presencia de los principales factores de riesgo (hipertensión arterial, tabaquismo, sobrepeso y obesidad, diabetes mellitus e hipercolesterolemia), aunque también hay que tener en cuenta factores como el historial familiar, el sexo, la edad y la etnia (Appelman *et al.*, 2015; Lobos y Castellanos, 2006).

En algunas intervenciones se ha podido observar que la modificación de ciertos hábitos, como realizar ejercicio, dejar de fumar, la pérdida de peso, el uso de ciertos medicamentos y una dieta saludable, pueden reducir el riesgo de padecer ECV (Bondonno *et al.*, 2015).

Para evitar el desarrollo de factores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión, es importante el correcto funcionamiento del endotelio vascular. El endotelio está constituido por una monocapa de células que recubre la parte interna de los vasos sanguíneos (Fig. 3). A parte de la función de barrera mecánica entre el vaso y la sangre, tiene una actividad biológica muy compleja. Participa en distintos procesos tales como el mantenimiento del tono vascular, la coagulación, la inflamación y los procesos inmunitarios debido a las múltiples sustancias que es capaz de liberar, entre las

que se encuentran el óxido nítrico (NO), las prostaglandinas, el factor tisular, el factor von Willebrand y la trombomodulina (Sánchez, 2013).

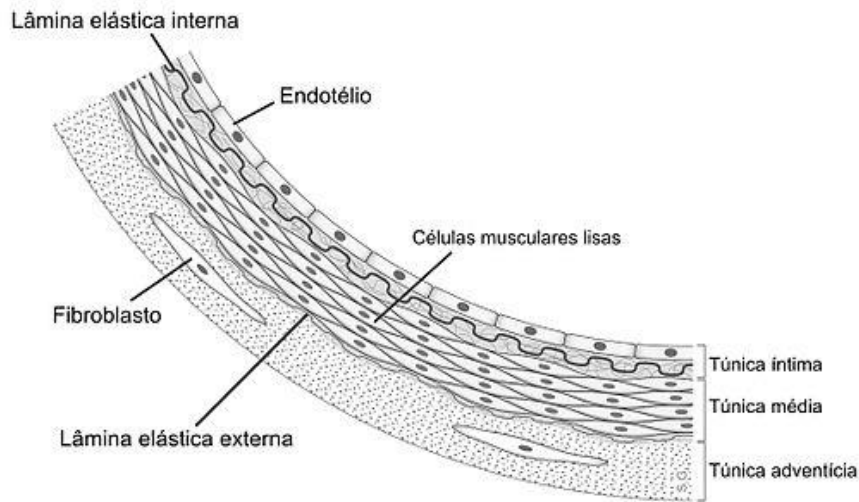


Figura 3. Esquema de la pared arterial.

La disfunción endotelial se utiliza para referirse a varias condiciones patológicas, como la alteración de las propiedades reguladoras del tono vascular, anticoagulantes y antiinflamatorias del endotelio, la alteración de la modulación del crecimiento vascular y la desregulación del remodelado vascular (Cai y Harrison, 2000). Puede ocurrir por la alteración de sus funciones, por un daño anatómico o incluso por una separación del endotelio de la túnica íntima. La obesidad, el tabaquismo, la edad, la hipercolesterolemia, la hipertensión, la hiperglucemia, las infecciones sistémicas y una historia familiar de la enfermedad de aterosclerosis temprana, todos factores de riesgo cardiovascular, tal y como hemos visto antes, están estrechamente asociados con la disfunción endotelial (Bondonno *et al.*, 2015; Sanchez, 2013).

Los mecanismos que están detrás de una correcta función endotelial y el desarrollo de la disfunción endotelial son complejos, pero la molécula de NO juega un papel central en ambos. El NO se genera a partir de la L-arginina endotelial por la acción de la NO-sintasa endotelial (eNOS), siendo esta la principal fuente de NO de la vasculatura. Como se puede ver en la figura 4, la eNOS cataliza la síntesis del NO mediante la oxidación de la L-arginina, utilizando como cosustratos la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y el oxígeno molecular y como cofactor redox la tetrahidrobiopterina (BH₄).

El NO es una molécula extremadamente lábil con un tiempo de semivida de 1-2 segundos. La mayoría del NO difunde a través de la membrana de las células endoteliales a las células del musculo liso vascular adyacentes donde activa la guanilato ciclasa, causando un aumento de la concentración de 3',5'-guanosina monofosfato cíclico (cGMP). La activación de la proteína cinasa G por el cGMP es responsable de muchos de los efectos biológicos del NO, entre ellos la dilatación de las arterias mediante la reducción de la concentración de calcio intracelular. Una proporción del NO que no traspasa la membrana de las células endoteliales reacciona rápidamente con el anión superóxido (O_2^-) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), reacción que puede ser responsable de los efectos patológicos asociados al NO (Bondonno *et al.*, 2015).

Gran parte de la literatura se refiere a la disfunción endotelial únicamente como el deterioro de la vasodilatación dependiente de NO causado por una pérdida del mismo. Esta pérdida puede ser debida a una disminución de la expresión de la eNOS, una falta de sustrato y cofactores de eNOS, una alteración de las señales celulares que no activan la eNOS apropiadamente y, finalmente una degradación acelerada de NO mediante las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Cai y Harrison, 2000).

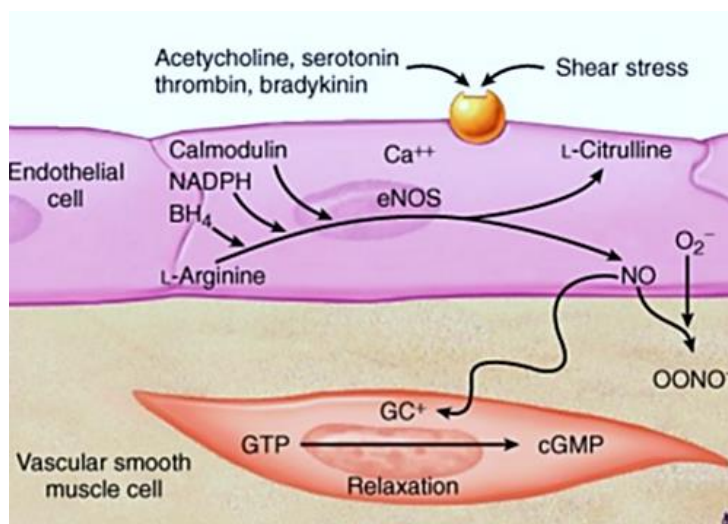


Figura 4. Síntesis y mecanismo de acción de NO (Braunwald, 2006).

La disfunción endotelial está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo. Este se produce cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de las células, es decir, como consecuencia del desequilibrio entre su producción y su neutralización. Las ERO son una familia de moléculas que

incluyen el oxígeno molecular y los derivados producidos por células aeróbicas. Muchas ERO son radicales libres, como el $O_2^{\cdot-}$, el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el NO y los lipoperóxidos, pero también hay otras moléculas que, sin ser radicales, contribuyen al estrés oxidativo mediante sus efectos oxidantes, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el $ONOO^-$ y el ácido hipocloroso ($HOCl$) (Avelló y Suwalsky, 2006; Cai y Harrison, 2000).

El organismo dispone de un sistema de defensa antioxidante, constituido por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En el primer grupo se encuentran la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD). La SOD cataliza la reacción del radical superóxido a oxígeno y dismuta el oxígeno para formar peróxido de hidrógeno; la CAT convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular; la GPx se encarga de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno y los lipoperóxidos a agua y oxígeno molecular. (Gutiérrez, 2002).

En las células de mamíferos hay varias fuentes productoras de ERO, pero en el caso del sistema cardiovascular las que más se han estudiado han sido la Xantina Oxidasa, la NAD(P)H oxidasa y la eNOS desacoplada. Como podemos observar en la figura 5, los tres mecanismos dan lugar a la formación de $O_2^{\cdot-}$, lo que disminuye la biodisponibilidad del NO y causa disfunción endotelial (Cai y Harrison, 2000).

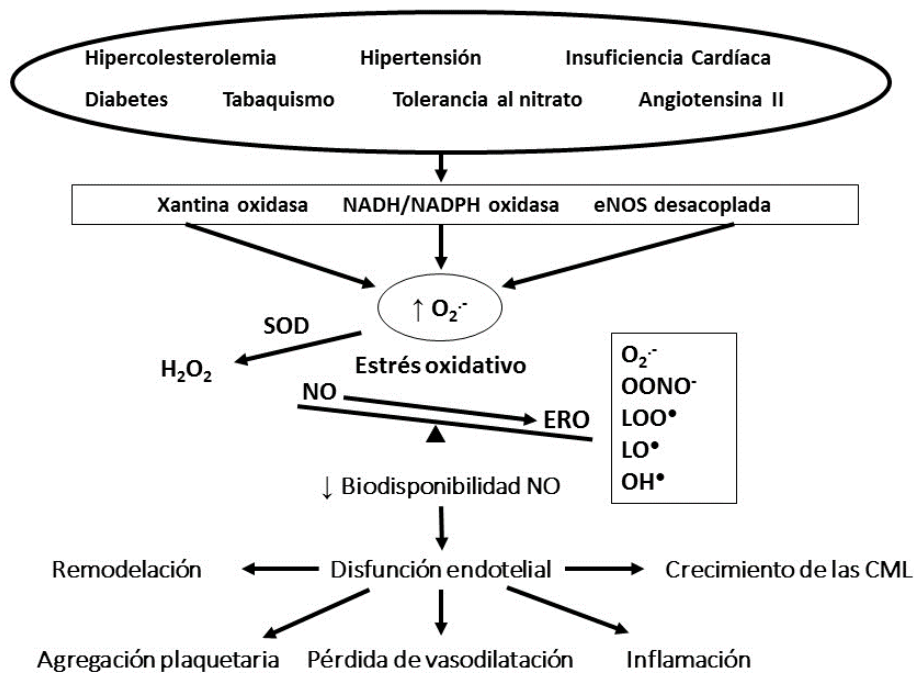


Figura 5. Mecanismos de disfunción endotelial inducidos por el estrés oxidativo. Modificado de Cai y Harrison (2000).

Prunus avium L.

El cerezo pertenece a la familia Rosaceae, a la subfamilia Amygdaloideae, al género *Prunus* y a la especie *Prunus avium* L. Crece en bosques caducifolios y húmedos, en barrancos y en los bordes de los ríos, es decir, en lugares frescos y con suelos profundos, principalmente en las montañas. Se puede encontrar en casi toda Europa, en el oeste de Asia y en el noroeste de África, aunque algunos autores lo consideran nativo del oeste de Asia. En la Península Ibérica se puede encontrar como silvestre o asilvestrado en la mitad norte, y como cultivado en casi todas las regiones. También se cultiva como frutal en vegas, huertos y regadíos (Muñoz y Navarro, 1998). Los principales países productores de cereza son Italia, Estados Unidos, Irán y Turquía. Es uno de los frutos de clima templado más popular (Di Cagno *et al.*, 2011).

Es un árbol de hasta 20 a 30 m, caducifolio e inerte. Tiene un tronco grueso y bien definido. Las ramas son de corteza grisácea, casi lisa, que se resquebraja y ennegrece con el tiempo. Tiene ramillas glabras, lisas, de color pardo rojizo cuya corteza se descompone a menudo en laminillas papiráceas.

Las hojas miden 6-15x3-8 cm y son obovadas, oblanceoladas o largamente elípticas, acuminadas, con el margen crenado o aserrado y dientes glandulíferos, de haz verde mate y glabro y envés pubescente. El pecíolo, que mide de 1,5 a 4,5 cm, por lo general tiene dos gruesas glándulas rojizas o negruzcas, cercanas a la zona de unión con la lámina. Las estípulas son caducas, lineares u oblongas y con cilios glandulíferos.

Tiene de 2 a 6 flores, largamente pediceladas, olorosas, coetáneas respecto a las hojas nuevas, en fascículos umbeliformes y sésiles, rodeadas en la base por una corona de brácteas cocleariformes. Los pedicelos fructíferos o rabos miden de 20 a 50 mm y son glabros. El receptáculo mide de 4 a 7 mm y es urceolado y glabro. Los sépalos, de 4 a 6,5 mm, son reflejos, oblongos, enteros, obtusos o subagudos y glabros. Los pétalos miden de 8 a 17 mm y son patentes o erecto-patentes, obovados, obtusos o emarginados y blancos. El ovario es glabro.



FÄGELBÄR, PRUNUS AVIUM L.

Figura 6. *Prunus avium* in Carl Axel Magnus Lindman, Bilder ur Nordens Flora, 1917-1926 (Wikipedia, 2016).

El fruto, que mide de 9 a 17 mm, es globoso o cordiforme, glabro, de color rojo más o menos oscuro y sin pruina. Tiene un mesocarpo carnoso, dulce o algo amargo, y un endocarpo subgloboso, casi liso (Fig. 6) (Muñoz y Navarro, 1998).

Sus frutos, las cerezas, son algo laxantes y muy digestivos. Las variedades más conocidas son las llamadas “moras de Verona”, “starking hard giant” y “precoz de Bourlat”. Con ellas se preparan mermeladas y, por fermentación, el vino de cerezas. Con un vino hecho con el fruto del cerezo silvestre se prepara, por destilación, el kirsch. Con los rabillos de las cerezas, y también con los de las guindas, se prepara en la medicina popular una tisana de propiedades diuréticas. La madera del cerezo, dura, pesada, de textura fina y color castaño o pardo rojizo, es muy apreciada en ebanistería para muebles y revestimientos, aunque tiene el inconveniente de su tendencia a alabearse.

Composición y bioactividad de los frutos de *Prunus avium* L.

Los frutos de *P. avium* L., a los que llamamos cerezas, han sido muy estudiados debido a su alto contenido en compuestos fenólicos antioxidantes, teniendo especial importancia su contenido en antocianos (Pacífico *et al.*, 2014). El consumo de extractos de cerezas se ha asociado a efectos beneficiosos en la salud, como el alivio de la artritis y el dolor relacionado con la gota. También se ha descrito para su consumo una reducción de la proliferación de las células de cáncer de colon humanas, un efecto protector sobre células neuronales, que ayudan en la prevención ECV y que retrasan el proceso de envejecimiento (Serra *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos se encuentran en muchas frutas, vegetales y otros alimentos y contribuyen a su color y a las propiedades sensoriales como el amargor y la astringencia. El interés en los antocianos, cuyas cualidades principales son su atractivo color brillante, su solubilidad en agua y su incorporación fácil a un sistema acuoso, ha aumentado últimamente debido a sus efectos beneficiosos en la salud. Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de alimentos ricos en antocianos está relacionado con la reducción de la incidencia de ECV (Mozetic *et al.*, 2002).

En las cerezas también se han encontrado diversos compuestos fenólicos que contribuyen a sus propiedades beneficiosas: ácidos fenólicos y flavonoides. Los flavonoides son un amplio grupo de metabolitos secundarios presentes en muchos alimentos, que se caracterizan por tener un núcleo de fenilcromenona (Nijveldt *et al.*, 2001). Se divide en distintas subclases dependiendo del patrón de este núcleo y tres de estas se han identificado en las cerezas: antocianos, flavonoles y flavan-3-oles. Hay que decir que, dependiendo del tipo de cultivo que se estudie, la proporción de cada uno de los compuestos puede variar, afectando a la bioactividad de los mismos (Tabla 1).

Tabla 1: Caracterización fenólica de variedades de cereza (Serra *et al.*, 2011).

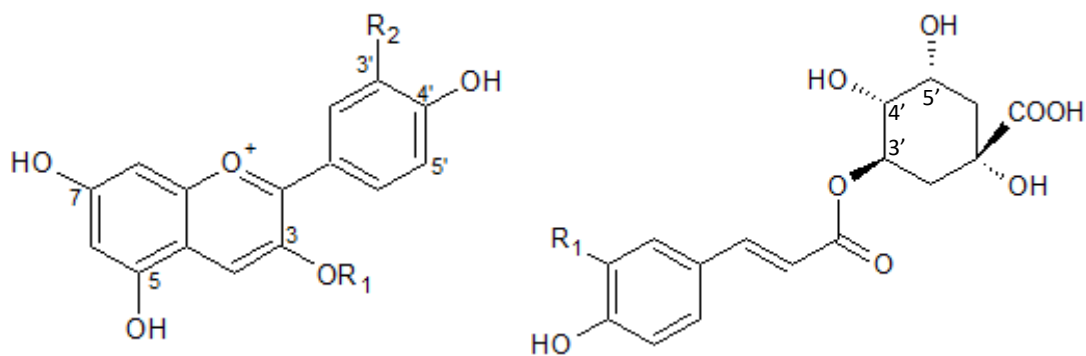
Cherry cultivars	TPC	TAC	TED	Flavan-3-ols		Hydroxycinnamates			Flavonols		Anthocyanins			
				Cat	Ep	NcAc	pCqAc	CAC	Rut	Q3g	C3g	C3r	Pl3r + Pn3g	Pn3r
EVCompact	956 ± 23	224 ± 10	98.3	5.8	1.8	55.8	3.7	3.0	31.7	3.3	26.4	206	3.6	2.0
Garnet	653 ± 21	69 ± 1	82.4	2.7	0.3	26.0	2.3	2.9	18.7	1.3	3.7	68.8	<1.0	<1.0
Lapin	1309 ± 3	372 ± 5	156.3	8.6	10.6	85.5	6.1	8.9	23.4	3.9	70.3	162	4.5	5.4
Maring	833 ± 18	151 ± 2	98.8	8.3	1.5	65.7	3.7	4.6	32.9	2.1	34.7	142	<1.0	<1.0
Morangão	555 ± 14	5.6 ± 0.1	81.2	3.8	2.4	74.3	5.6	4.6	14.9	0.8	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0
Saco	1309 ± 12	296 ± 5	227.2	7.5	9.4	123	15.2	8.7	26.6	5.3	55.6	282	5.3	3.5
Summit	440 ± 42	28.8 ± 0.4	29.2	3.8	0.1	20.8	17.6	1.9	7.8	0.6	2.9	36.0	<1.0	<1.0
Ulster	1187 ± 21	292 ± 5	116.2	6.8	3.0	54.4	32.8	6.7	28.0	2.3	28.2	303	1.8	1.6
Van	999 ± 22	251 ± 4	114.0	7.4	2.6	61.9	4.6	5.3	34.2	3.5	70.1	253	1.8	2.5

TPC, total polyphenolic content (expressed as mg of gallic acid equivalents/100 g dw); TAC, total anthocyanin content (expressed as mg of cyanidin-3-glucoside equivalents/100 g dw); TED, total area of chromatogram obtained with electrochemical detection; Cat, catechin; Ep, epicatechin; NcAc, neochlorogenic acid; pCqAc, *p*-coumaroylquinic acid; CAC, chlorogenic acid; Rut, rutin; Q3g, quercetin-3-glucoside; C3g, cyanidin-3-glucoside; C3r, cyanidin-3-rutinoside; Pl3r, pelargonidin-3-rutinoside; Pn3g, peonidin-3-glucoside; and Pn3r, peonidin-3-rutinoside.

^a Results are expressed in mg/100 g of dry weight except for TED which corresponds to total area of chromatogram obtained by electrochemical detection. Coefficients of variation of the HPLC quantifications were <5%.

Entre los ácidos fenólicos se han identificado el ácido clorogénico, su isómero en posición 5', el ácido neoclorogénico, y el ácido 3'-*p*-cumaroilquínico (Ballistreri *et al.*, 2013; Bastos *et al.*, 2015; Gao y Mazza, 1995; Mozetic *et al.*, 2002; Picariello *et al.*, 2016; Serra *et al.*, 2011).

Como antocianinósidos mayoritarios se han identificado la cianidina-3-glucósido y 3-rutinósido y los mismos glicósidos de peonidina como minoritarios (Bastos *et al.*, 2015; Gao y Mazza, 1995; Pacifico *et al.*, 2014; Serra *et al.*, 2011). Gao y Mazza (1995) describieron por primera vez la presencia la pelargonidina-3-rutinósido en cerezas y un estudio más reciente ha identificado la cianidina-3-*O*-glucosilrutinósido en extractos de cereza (Picariello *et al.*, 2016). Otros estudios sugieren la presencia de antocianos acilados con ácido *p*-cumárico y malónico, pero no se ha podido confirmar mediante la comparación del orden de elución con el descrito en la literatura (Mozetic *et al.*, 2002) (Fig.7).

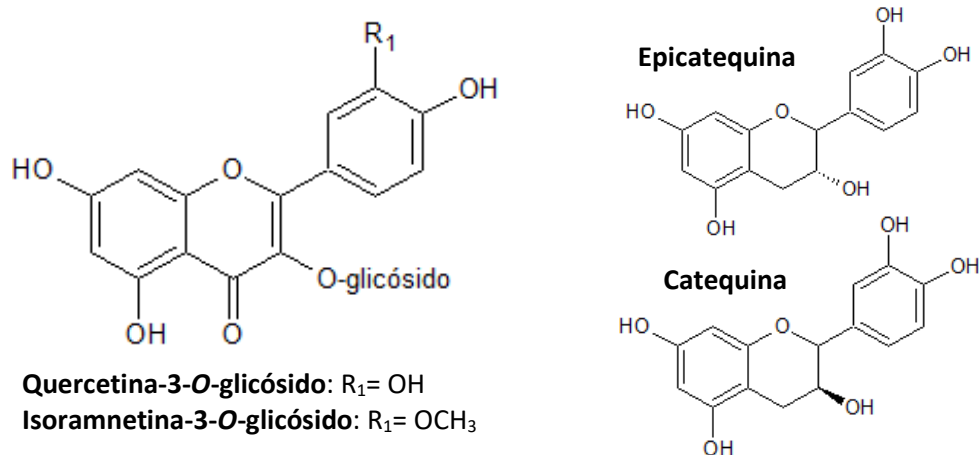


Cianidina-3-glucósido: R₁= glucosa, R₂= OH;
 Cianidina-3-rutinósido: R₁= rutinosa, R₂= OH;
 Peonidina-3-glucósido: R₁= glucosa, R₂= OCH₃
 Peonidina-3-rutinósido: R₁= rutinosa, R₂=OCH₃
 Pelargonidina-3-rutinósido: R₁= rutinosa, R₂= H

Ácido 3'-*p*-cumaroilquínico: R₁= H
 Ácido 3'-cafeoilquínico = Ácido clorogénico: R₁= OH

Figura 7. Estructura química de algunos antocianos (izquierda) y ácidos fenólicos (derecha) identificados en cerezas.

Los derivados de la quercetina son los flavonoles dominantes, en particular la quercetina-3-*O*-rutinósido, aunque también se aprecia la presencia de la quercetina-3-*O*-glucosilrutinósido. Los rutinósidos derivados de la isoramnetina también son relativamente abundantes, sobre todo la isoramnetina-3-*O*-rutinósido. La isoramnetina-3-*O*-glucósido y la quercetina-3-*O*-ramnósido han sido halladas como trazas. Respecto a los flavan-3-oles, como la catequina y la epicatequina, hay que decir que se detectaron en cantidades bajas (Fig. 8) (Bastos *et al.*, 2015; Picariello *et al.*, 2016; Serra *et al.*, 2011).



Quercetina-3-*O*-glicósido: R₁= OH
 Isoramnetina-3-*O*-glicósido: R₁= OCH₃

Figura 8. Estructura química de los flavonoles (izquierda) y flavan-3-oles (derecha) identificados en cerezas.

Respecto a la bioactividad, hay varios estudios que ponen de manifiesto la actividad antioxidante de los frutos, utilizando métodos directos e indirectos (Ballistreri *et al.*, 2013; Ferretti *et al.*, 2010; Pacifico *et al.*, 2014; Picariello *et al.*, 2016; Serra *et al.*, 2011). En el estudio realizado por Serra *et al.* (2011), se observó que hay una relación entre la concentración total de ácidos fenólicos y antocianos y la capacidad antioxidante, y se ha demostrado que la mejor combinación de estos es la del ácido clorogénico y la quercetina-3-glucósido. La peonidina-3-rutinósido también muestra un importante efecto sobre la prevención de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad y el ácido *p*-cumaroilquínico se ha identificado como el único responsable de la capacidad captadora de radicales en las cerezas. Los antocianos totales, y en particular los glicósidos de cianidina, son los compuestos con mayor capacidad de inhibición del crecimiento de células humanas de cáncer de colon y de cáncer gástrico.

Como se recoge en la tabla 2, en otro ensayo de actividad antitumoral donde se utilizaron distintas líneas celulares, el extracto de frutos tuvo una acción selectiva sobre las células de carcinoma de colon humano (HCT-15) y, además, ni preparados de frutos ni de rabos mostraron hepatotoxicidad frente a células primarias de hígado de cerdo (PLP-2) (Bastos *et al.*, 2015; Ferretti *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Pacifico *et al.* (2014), la variedad *Prunus avium* cv. Della Recca presentó una considerable inhibición del crecimiento de las células de la línea celular HeLa (cáncer cervical), que la otra variedad que se ensayó en este mismo estudio, *Prunus avium* cv. Del Monte no presentó. Estos autores sugieren que la presencia masiva de compuestos con esqueleto hidroxicinámico en la variedad Della Recca lo convierten en un agente quimiopreventivo potencial.

También hay estudios que demuestran que la ingesta de cerezas inhibe las respuestas inflamatorias, mediante la disminución de los niveles en sangre de la proteína C-reactiva y del NO, cuyos niveles altos en sangre también son un factor de riesgo de ECV. Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que esta actividad antiinflamatoria puede deberse a que los compuestos polifenólicos de las cerezas pueden inhibir la ciclooxigenasa-2. Esta actividad podría explicar que el consumo de cerezas alivie los síntomas de la artritis y la gota (Ferretti *et al.*, 2010).

Composición y bioactividad de los rabos de cereza

En la literatura solo se han encontrado 2 estudios sobre los rabos de cereza: un ensayo clínico realizado en Irán y un estudio realizado en Portugal sobre su composición y su actividad antioxidante y antitumoral.

El estudio clínico realizado en Irán trata sobre el efecto diurético de los rabos de cereza, en el que se observó que después de la administración de unas cápsulas que contenían aproximadamente 330 mg de rabos de cereza pulverizados, la media de los valores de concentración de calcio, sodio, cloruro y del volumen de la orina aumentan, pero la cantidad de potasio en la orina y la osmolaridad de ésta no cambian. El porcentaje promedio del incremento de calcio en la orina fue cinco veces mayor que los de excreción de sodio y cloruro y no se observaron reacciones adversas.

La administración durante un día de rabos de cereza causa un aumento del sodio y el cloruro urinario, aunque en menor cantidad que los diuréticos de asa. El aumento del calcio urinario puede ser debido a un mecanismo similar al de un diurético asa o de inhibidores de la anhidrasa carbónica. En la medicina tradicional iraní, estos rabos se administran para tratar los cálculos renales. Debido a la observación del incremento de la excreción urinaria del calcio, sodio y cloruro, los autores sugieren su uso con precaución en pacientes con cálculos renales, y también en pacientes con desórdenes asociados con la deficiencia de calcio, sodio o cloruro (Hooman *et al.*, 2009).

En el estudio llevado a cabo por Bastos *et al.* (2015), se realizaron ensayos de actividad antioxidante y antitumoral con el extracto hidrometanólico de frutos y con la infusión, la decocción y el extracto hidrometanólico de rabos de cereza. Pudieron observar que los rabos de cereza tienen una mayor capacidad antioxidante que los frutos y, particularmente, los extractos hidrometanólicos, seguidos de las decocciones y, por último, las infusiones. Respecto a la actividad antitumoral, en los ensayos realizados con cinco líneas de células tumorales humanas no obtuvieron ninguna respuesta con las distintas muestras de rabos de cereza, como se puede ver en la tabla 2.

Respecto al análisis de compuestos fenólicos, se realizó una identificación tentativa en la que se detectaron 26 compuestos. Siete de estos compuestos son derivados de ácidos fenólicos y, el resto, son flavonoides, como se recoge en la tabla 3 (Bastos *et al.*, 2015).

Tabla 2: Propiedades bioactivas de diferentes preparados de frutos y rabos de *P. avium* (Bastos *et al.*, 2015).

Samples	Stems		Fruits	
	Extracts	Infusions	Decoctions	Extracts
Antioxidant activity (EC ₅₀ , mg/mL)				
DPPH scavenging activity	0.36 ± 0.01 ^d	0.63 ± 0.01 ^c	0.54 ± 0.01 ^b	0.99 ± 0.01 ^a
Reducing power	0.18 ± 0.02 ^d	0.44 ± 0.03 ^b	0.31 ± 0.01 ^c	0.57 ± 0.01 ^a
β-Carotene bleaching inhibition	0.30 ± 0.01 ^d	0.42 ± 0.06 ^b	0.35 ± 0.04 ^c	1.80 ± 0.04 ^a
TBARS inhibition	0.07 ± 0.00 ^d	0.24 ± 0.01 ^b	0.13 ± 0.01 ^c	1.46 ± 0.09 ^a
Antitumor activity (GI ₅₀ values, µg/mL)				
HCT-15 (colon carcinoma)	>400	>400	>400	73.51 ± 6.37
Hepatotoxicity (GI ₅₀ value, µg/mL)				
PLP2	>400	>400	>400	>400

The antioxidant activity was expressed as EC₅₀ values (mean ± SD), what means that higher values correspond to lower reducing power or antioxidant potential. EC₅₀: extract concentration corresponding to 50% of antioxidant activity or 0.5 of absorbance in reducing power assay. Trolox EC₅₀ values: 41 µg/mL (reducing power), 42 µg/mL (DPPH scavenging activity), 18 µg/mL (β-carotene bleaching inhibition) and 23 µg/mL (TBARS inhibition). GI₅₀ values (Mean ± SD) correspond to the sample concentration achieving 50% of growth inhibition in human tumour cell lines or in liver primary culture PLP2. Ellipticine GI₅₀ values: 1.42 µg/mL (HCT-15) and 2.06 µg/mL (PLP2). In each row different letters mean significant differences between species ($p < 0.05$).

Tabla 3: Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en los extractos, infusiones y decocciones de rabos de *P. avium* (Modificada de Bastos *et al.*, 2015).

Tentative identification	Quantification (mg/g)		
	Extracts	Infusions	Decoctions
3- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	0.43 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01
<i>Cis</i> caffeic acid hexoside	0.17 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.02
Taxifolin-7- <i>O</i> -hexoside	0.79 ± 0.04	0.29 ± 0.01	0.19 ± 0.01
<i>p</i> -Coumaroylquinic acid	0.53 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
<i>Trans</i> caffeic acid hexoside	0.49 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Catechin	3.74 ± 0.01	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.05
Sinapic acid	0.29 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Aromadendrin-7- <i>O</i> -hexoside	2.66 ± 0.07	1.22 ± 0.04	0.86 ± 0.02
<i>p</i> -Coumaric acid hexoside	0.68 ± 0.04	0.32 ± 0.02	0.25 ± 0.01
Ferulic acid hexoside	0.30 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Quercetin- <i>O</i> -rutinoside- <i>O</i> -hexoside	0.44 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00
Kaempferol- <i>O</i> -rutinoside- <i>O</i> -hexoside	0.55 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01
Aromadendrin- <i>O</i> -hexoside	0.31 ± 0.04	tr	tr
Methyl-aromadendrin- <i>O</i> -hexoside	0.06 ± 0.01	tr	tr
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside	0.87 ± 0.02	nd	nd
Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	0.27 ± 0.02	nd	nd
Genistein-7- <i>O</i> -glucoside	0.55 ± 0.03	nd	nd
Naringenin-7- <i>O</i> -glucoside	2.96 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.08 ± 0.01
Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside	0.88 ± 0.03	nd	nd
Methyl quercetin- <i>O</i> -rutinoside	0.15 ± 0.01	nd	nd
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside	0.30 ± 0.01	nd	nd
Pinocembrin- <i>O</i> -pentosylhexoside	0.23 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.00
Dihydroxogonin/sakuranetin- <i>O</i> -pentosylhexoside	0.36 ± 0.01	tr	tr
Chrysin-7- <i>O</i> -glucoside	0.50 ± 0.01	tr	tr
Dihydroxogonin 7- <i>O</i> -glucoside/sakuranetin 5- <i>O</i> -glucoside	13.63 ± 0.05	8.49 ± 0.13	5.66 ± 0.05
Methyl genistein	0.31 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.03 ± 0.00
Phenolic acids	2.90 ± 0.07 ^a	1.04 ± 0.04 ^b	0.98 ± 0.07 ^c
Flavonoids	29.54 ± 0.10 ^a	10.83 ± 0.27 ^b	7.39 ± 0.12 ^c
Total phenolic compounds	32.44 ± 0.17 ^a	11.88 ± 0.30 ^b	8.37 ± 0.19 ^c

Muchos de los alimentos que contienen este tipo de compuestos eran conocidos por sus efectos beneficiosos para la salud antes de haberse aislado el primer flavonoide. Varios estudios muestran el papel protector de los flavonoides de la dieta en las ECV, que son una preocupación científica y pública, ya que causan el 31% de las muertes anuales, como se ha mencionado antes.

Los flavonoides poseen una amplia gama de actividades, tales como antiinflamatoria, antialérgica, antiviral, anticarcinogénica y cardiovascular, pero sobre todo se ha estudiado su efecto captador de radicales libres (Bondonno *et al.*, 2015; Lilamand *et al.*, 2014; Nijveldt *et al.*, 2001).

Los mecanismos descritos para su efecto cardiovascular en los distintos estudios pueden clasificarse como mecanismos específicos e inespecíficos, que a su vez pueden subdividirse en mecanismos relacionados con el NO y otros efectos (Tabla 4). Los

mecanismos inespecíficos dependen de la naturaleza antioxidante de los grupos fenólicos, mientras que los específicos dependen de la estructura particular del flavonoide (Bondonno *et al.*, 2015).

Tabla 4. Posibles mecanismos por los que los flavonoides ejercen efectos sobre la salud vascular. Modificada de Bondonno *et al.*, 2015.

Clasificación del mecanismo	Descripción: Posible mecanismo	Referencia
General/no específico: relacionados con el NO	Efecto antioxidante: reacciona con superóxido y otras especies reactivas de oxígeno que pueden prevenir la descomposición del NO y prostaciclina	Gryglewsky <i>et al.</i> , 1987
	Efecto antioxidante: protege la tetrahidrobiopterina mediante la captación de los radicales libres derivados del peroxinitrito, evitando de este modo el desacoplamiento del eNOS	MacCarty, 2008
	Inhibición de xantina oxidasa, lipoxigenasa y NADPH oxidasa, enzimas que producen especies reactivas de oxígeno: previenen la descomposición del NO	Mladenka <i>et al.</i> , 2010; Nijveldt <i>et al.</i> , 2001
General/no específico: otros	Efecto antioxidante: inhiben la peroxidación lipídica	Fraga <i>et al.</i> , 2010
	Inhibición de xantina oxidasa, lipoxigenasa y NADPH oxidasa, enzimas que producen especies reactivas de oxígeno: otros efectos	Mladenka <i>et al.</i> , 2010; Nijveldt <i>et al.</i> , 2001
	Capacidad de formar quelatos con iones metálicos: previenen la formación de radicales libres que provienen de reacciones catalizadas por metales	Morel <i>et al.</i> , 1993
	Interacción con los lípidos de las membranas: puede afectar a la actividad de las enzimas asociadas con las membranas, a la interacción ligando-receptor, a la transducción de la señal, y/o a los flujos de iones/metabolitos.	Fraga <i>et al.</i> , 2010
Específico: relacionado con el NO	Aumentan la actividad de la eNOS: aumenta la producción de NO	Stoclet <i>et al.</i> , 2004
	Aumentan la expresión de la eNOS: aumenta la producción de NO	Stoclet <i>et al.</i> , 2004
	Aumentan el nitrito en circulación: contribuye a la reserva de NO en circulación y puede ser convertido en NO cuando se requiere	Schroeter <i>et al.</i> , 2006; Balzer <i>et al.</i> , 2008; Heiss <i>et al.</i> , 2003
	Bioconversión del nitrito en NO: ocurre en el estómago; el NO puede difundirse a través de la pared estomacal, induciendo la relajación del músculo liso; no se sabe si ocurre lo mismo en la circulación	Peri <i>et al.</i> , 2005; Takahama <i>et al.</i> , 2002; Takahama <i>et al.</i> , 2010; Volk <i>et al.</i> , 2009
	Inhibición de la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA): envuelto en la regulación del sistema renina-angiotensina, que puede controlar la producción del NO	Actis-Goretta <i>et al.</i> , 2006
Específico: otros	Aumentan la producción de prostaciclina: vasodilatación	Stoclet <i>et al.</i> , 2004
	Aumentan la producción del factor de hiperpolarización derivado del endotelio: vasodilatación	Stoclet <i>et al.</i> , 2004
	Inhiben la síntesis de endotelina-1: vasodilatación	Loke <i>et al.</i> , 2008

Debido a los pocos estudios realizados con los rabos de cereza, pese a su gran uso en la medicina tradicional y a ser un producto de desecho que podemos adquirir en gran cantidad, se ha decidido realizar un estudio que pueda complementar los ya existentes, para ampliar el conocimiento sobre sus componentes y su bioactividad.

2. Objetivos

Los objetivos planteados para este trabajo son:

1. Caracterizar los componentes químicos de los extractos obtenidos a partir de los rabos de cereza.
2. Determinar la actividad vascular y antioxidante de los distintos extractos de *P. avium*.

Para lograr estos objetivos se fijaron los siguientes objetivos particulares:

1. Hacer un fraccionamiento con disolventes de distintas polaridades utilizando los rabos de cereza.
2. Identificar los compuestos mayoritarios presentes en las fracciones más apolares (extractos de hexano y de diclorometano) mediante la técnica GC-MS.
3. Estudiar los efectos de las diferentes fracciones sobre la reactividad vascular en arteria aorta de rata.
4. Investigar sus efectos antioxidantes utilizando ensayos *in vitro* en los que se induce la producción de radicales libres tanto por vías enzimáticas como no enzimáticas.

3. Materiales y métodos

Reactivos y disolventes

Extracción

Hexano, diclorometano, acetato de etilo, *n*-butanol y metanol (Carlo Erba Reagents Group) son los disolventes utilizados en la extracción, todos ellos de grado analítico, excepto el hexano que se purifica en el laboratorio. El agua desionizada se obtiene en un sistema de purificación de agua Millipore Direct-Q (TGI Water Systems, EUA).

Soluciones nutricias

Para los experimentos de actividad farmacológica se utilizan distintas soluciones nutricias:

1. Solución Krebs. Su composición es la siguiente (mM): NaCl, 118,7; KCl, 4,7; CaCl₂, 2,5; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 25,0; MgSO₄·7H₂O, 1,2; Glucosa, 11,1. Una vez gaseada con carbógeno se ajusta el pH a 7,4.
2. Solución K-PSS. Su composición es la siguiente (mM): KCl, 123,7; CaCl₂, 2,5; MgSO₄·7H₂O, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 25,0; glucosa, 11,1.
3. Solución ROS: Su composición es la siguiente (mM): KH₂PO₄, 50; EGTA, 1; sacarosa, 150. Una vez gaseada con carbógeno se ajusta el pH a 7,4.

Para la preparación de estas disoluciones se utilizan componentes de calidad de análisis (Sigma-Aldrich, Merck o Panreac) y se disuelven en agua ultrapura (Labconco-Water Pro, P.S.).

Sustancias utilizadas

- 1, 2 ,3-trihidroxibenceno (**pirogalol**), cloruro de **acetilcolina**, dinitrato de *N,N'*-dimetil-9,9'-biacridinio (**lucigenina**), hidrocloreuro de **fenilefrina**, hidrocloreuro del ester metílico de *N*-nitro-*L*-arginina (**L-NAME**), **indometacina**, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (**NADPH**), *N,N'*-dietilditiocarbamato de amonio (**DDC**) y 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (**DPPH**).

Todas las sustancias utilizadas se han suministrado por Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Se preparan disoluciones patrón de acetilcolina, fenilefrina, pirogalol y L-NAME a una concentración de 10^{-1} M y 10^{-2} M de indometacina en agua ultrapura y se mantienen a -20 °C hasta el momento del ensayo, en el que se realizan las diluciones necesarias.

La lucigenina se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 5 mM. NADPH y DDC se disuelven en solución ROS a una concentración de 0,01 M y 1 M, respectivamente. Estos compuestos se mantienen a -80 °C hasta el momento del ensayo, en el que se realizan las diluciones necesarias.

En el caso de los extractos utilizados en los ensayos, el de butanol y el de acetato de etilo se disuelven en DMSO y el resto en agua ultrapura. Para cada uno de los extractos se prepara una disolución de 50 mg/ml, a partir de la cual se realizan las diluciones necesarias para cada uno de los ensayos.

Tratamiento del material vegetal

Recolección y preparación del material vegetal

La recolección se realizó en el mes de mayo del 2015 en un cultivo local de Navaconcejo en el Valle del Jerte (Extremadura).

El secado se realizó al aire libre a la sombra. Una vez secos, los rabos se trituraron (Fig. 9) con una trituradora doméstica Braun, modelo JB-5050. El material vegetal que no se utilizó en la extracción se guardó protegido de la luz.



Figura 9. Rabos de cereza secos (izq.) y triturados (der.).

Fraccionamiento fitoquímico



Figura 10. Filtrado con embudo con placa de microporos.

En este proyecto se han realizado cuatro extractos por maceración secuencial, mediante extracciones dobles de entre 20 a 24 horas con 2 litros de cada disolvente, que se filtraron mediante un embudo con filtro microporoso ($n^{\circ}3 \rightarrow 16-40 \mu\text{m}$) (Fig. 10): extracto de hexano (Hex.), extracto de diclorometano (DCM), extracto de acetato de etilo (AcOEt), y extracto de metanol/agua en una proporción de 80:20 (MeOH/H₂O). El cuarto extracto, el de MeOH/H₂O, una vez evaporado el MeOH, se pasó a un embudo de decantación al que se añadió butanol (BuOH) para realizar una extracción líquido-líquido por triplicado (200 ml; 100 ml; 100 ml). Por

último, se realizó una decocción del marco vegetal durante 30 minutos en 2 litros de agua (Fig. 11) (Lourenço *et al.*, 2006). También se realizaron una infusión y una decocción con rabos de cereza que no fueron sometidos a la maceración secuencial, sino que simulan el consumo directo mediante infusiones y decocciones. Para la decocción se utilizó 1,00 g de rabos de cereza sin triturar y se hirvió en 200 ml de agua durante 5 minutos, dejándolo en reposo otros 5 minutos; para la infusión, se utilizó también 1,00 g de rabos de cereza sin triturar y se añadieron 200 ml de agua hirviendo, dejándolo en reposo durante 5 minutos (Bastos *et al.*, 2015).

Tras la extracción, se evaporó el disolvente de los extractos para pesarlos y poder calcular el rendimiento de la extracción. Los extractos en disolventes orgánicos se evaporaron a presión reducida con un rotavapor Buchi R-210, en un baño calefactor, modelo B-491 de la misma marca, a 40 °C, hasta llegar a una pesada constante. El agua de los extractos acuosos, tras congelarla, se eliminó en un liofilizador, modelo Lyoquest, de marca Telstar (Lourenço *et al.*, 2006). En el proceso de concentración de la fracción de DCM se observó que aparecía un precipitado si se dejaba enfriar la disolución, por tanto, se mantuvo el extracto a -20 °C durante 24 horas y se filtró, separando la parte soluble en frío de la insoluble, con un embudo Büchner.

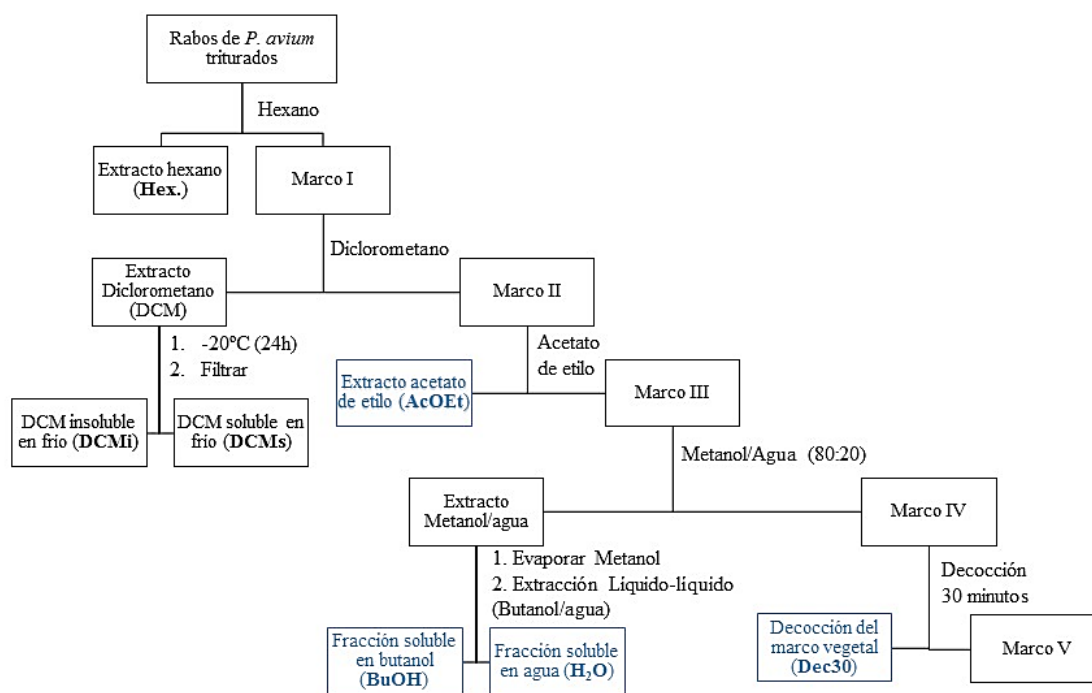


Figura 11. Diagrama de extracción. Los extractos en azul se han utilizado en los ensayos de actividad farmacológica.

Identificación primaria

En los extractos de hexano, diclorometano insoluble en frío y diclorometano soluble en frío se realizaron ensayos de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Para esto, se utilizó como disolvente el DCM. El programa de temperatura del horno fue el siguiente: T inicial 70 °C durante 3 min; seguidamente se aumentó la temperatura 20 °C/min hasta 325 °C, que se mantuvo durante 5,5 min.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II, acoplado a un detector de masas MSD Hewlett Packard 5972, con una columna cromatográfica de composición (5 %-fenil)-metilpolisiloxano HP-5ms de Agilent (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) utilizando helio (1 ml/min) como gas portador. La identificación se realizó mediante la comparación de los espectros de masas de los compuestos con la biblioteca Wiley W9N08 de espectros de masas del National Institute of Standards and Technology (NIST), la comparación de los tiempos de retención obtenidos con los de distintos estudios realizados con anterioridad en condiciones similares (Burger, 2016) y la comparación del orden de elución con el estudio realizado por Bernardo-Gil *et al.* (2001).

Ensayos *in vitro* en arteria aorta de rata

Se utilizaron ratas Wistar machos de 200-300 g suministradas por el Servicio de Experimentación animal de la Universidad de Salamanca (P.A.E-SA001).

Los ensayos se han realizado teniendo en cuenta las disposiciones legales existentes referidas a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos: Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero; Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del consejo, de 22 de septiembre de 2010.

Inmediatamente después de sacrificar la rata por decapitación, se extrae la arteria aorta y se mantiene en solución Krebs fría. Tras limpiar la arteria, eliminando el tejido conectivo y graso circundante, se corta en anillos de 3 mm y se colocan en baños de órganos entre dos alambres finos, uno que está fijo en el baño y otro conectado al transductor isométrico (UF-1, Harvard Apparatus Inc., USA). Para mantener el tejido viable, los baños contienen 5 ml de solución Krebs aireada con carbógeno (95% O₂, 5% CO₂, Air Liquide S.A.) y se mantienen a 37°C mediante una bomba termostática (TECTRON 4373200 Selecta, España) y sometidos a una tensión de 2 g (Fig. 12). Tras la estabilización del tejido durante un período de 60 minutos, en el que se cambia el medio cada 30 minutos, se procede a la realización de los diferentes ensayos.

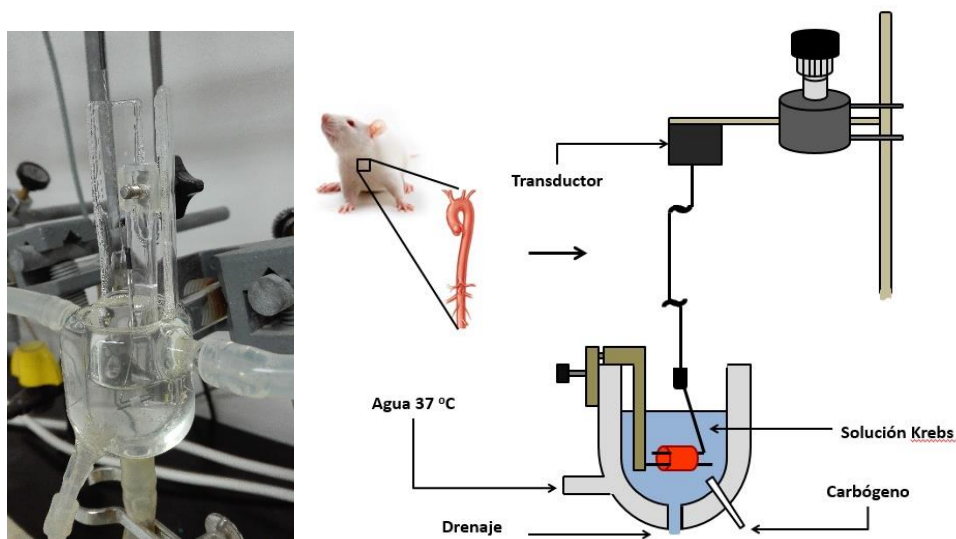


Figura 12. Baño para órgano aislado y detalle del montaje de los anillos de arteria aorta.

Antes de realizar los diferentes protocolos, en todos los anillos, se comprueba la reactividad del músculo liso y la presencia o ausencia del endotelio. Para ello, tras el período de estabilización se añade fenilefrina (FE, 10^{-6} M), y cuando la contracción alcanza una meseta estable, se realiza una curva concentración-respuesta acumulativa a acetilcolina (ACh, 10^{-8} - 10^{-4} M) (Fig. 13).

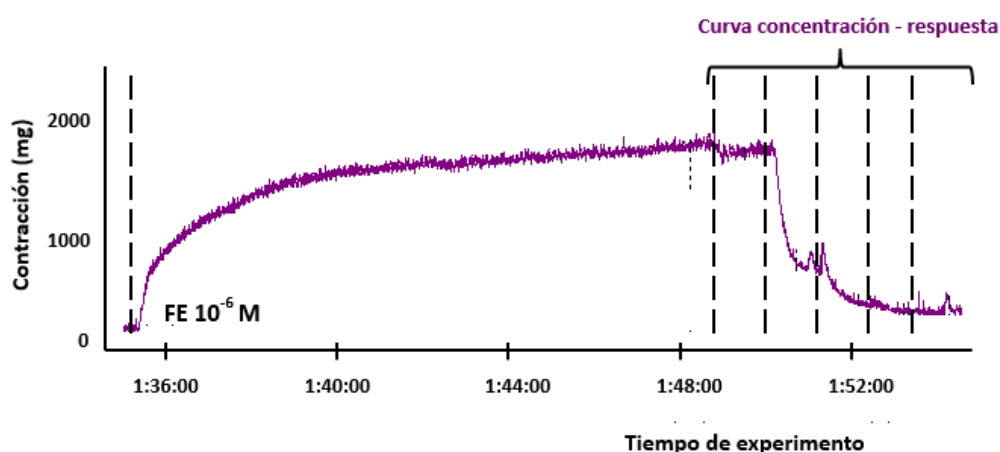


Figura 13. Registro original de una curva de relajación a acetilcolina en anillos de arteria aorta de rata.

En algunos experimentos, se elimina el endotelio raspando la luz del vaso con una aguja rugosa. Se comprueba la ausencia de endotelio si la relajación con ACh es inferior al 20% frente a la contracción de FE.

Evaluación del efecto vasodilatador

Para evaluar si los extractos tienen una acción vasodilatadora, se contraen los anillos con FE (10^{-6} M) y se realiza una curva concentración-respuesta acumulativa añadiendo al baño concentraciones crecientes de los distintos extractos de rabos de cereza a intervalos de 10-15 minutos una vez que se alcanza una respuesta estable. El rango de concentraciones utilizados para cada extracto se recoge en la tabla 5. En el caso de los extractos de BuOH y AcOEt, que se disuelven en DMSO, algunos anillos se utilizan para la realización del control con el disolvente. El efecto provocado por los distintos extractos se expresa como % de relajación frente a la respuesta contráctil obtenida con FE.

En todas las curvas concentración-respuesta se obtiene el valor del efecto máximo (E_{max}) y de la concentración del extracto que provoca el 50 % del efecto máximo (CE_{50}),

mediante el ajuste a un modelo logarítmico no lineal utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad software Inc., USA).

Tabla 5. Rango de concentraciones utilizado para los distintos extractos de *P. avium*.

Extractos	AcOEt	BuOH	H ₂ O	Decocción 30	Infusión	Decocción 5
Concentración (µg/ml)	50-250	1-50	1-25	1-50	1-50	1-50

Para determinar si el efecto vasodilatador de cada uno de los extractos es independiente o no del endotelio, se utiliza el mismo protocolo con anillos de aorta a los que previamente se les ha retirado el endotelio.

En otro grupo de experimentos, los anillos con endotelio se incuban durante 30 minutos con L-NAME (10^{-4} M), un inhibidor de la NO-sintasa, o con indometacina (10^{-5} M), un inhibidor no selectivo de la enzima ciclooxigenasa, antes de realizar las curvas de relajación en anillos precontraídos con FE (10^{-6} M).

Curva concentración-respuesta a fenilefrina

Para evaluar el efecto de los extractos sobre la respuesta vasoconstrictora se realizan curvas concentración-respuesta a FE (10^{-8} - 3×10^{-4} M) sola (Fig. 14), o después de 20 minutos de incubación con 50 µg/ml de todos los extractos, excepto para el de AcOEt que se utiliza una concentración de 100 µg/ml, o DMSO.

Al finalizar el experimento añadimos a todos los anillos una disolución hiperpotásica (K-PSS) para obtener una contracción que utilizamos como referencia. Las respuestas a FE se expresan como % de contracción frente a esta respuesta.

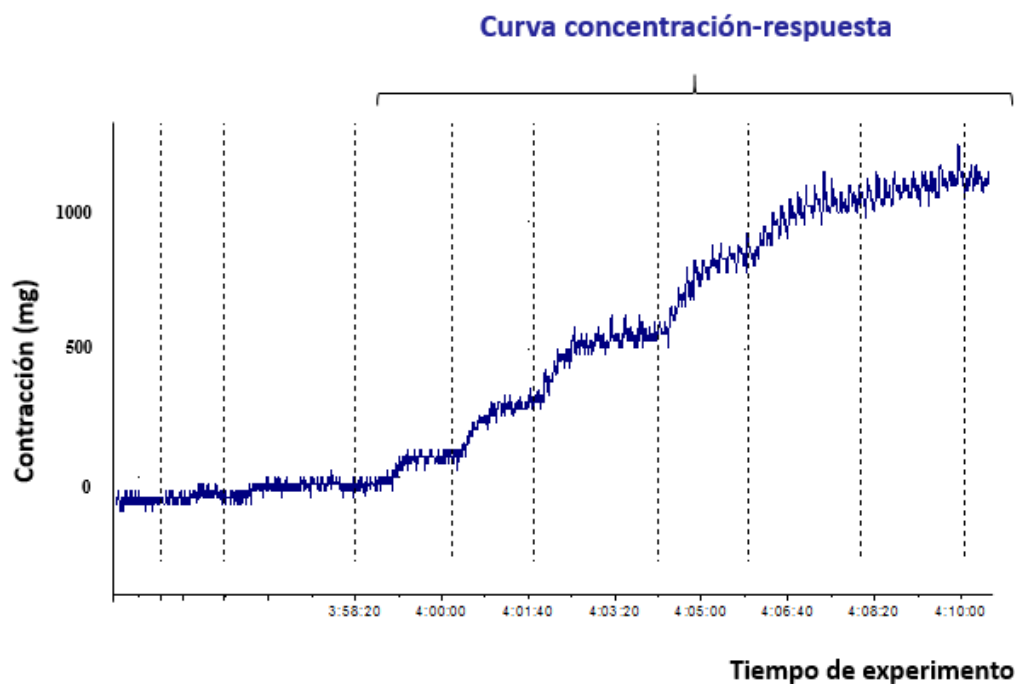


Figura 14. Registro original de una curva de contracción a fenilefrina en anillos de arteria aorta de rata.

Disfunción endotelial por pirogalol

Mediante la autooxidación espontánea del pirogalol, se forman radicales libres de $O_2^{\cdot-}$. Este radical produce efectos negativos sobre la reactividad vascular que puede valorarse *in vitro* estudiando las modificaciones en las respuestas de diversos agonistas.

En estudios previos hemos comprobado que 15 minutos de incubación con pirogalol (10^{-5} M) provocan un deterioro significativo de la función endotelial que se manifiesta por pérdida de la capacidad relajante a ACh (Aparicio *et al.*, 2015).

Para llevar a cabo este ensayo, se realizan dos curvas de relajación a ACh (10^{-8} - 10^{-4} M) en cada anillo, una antes de la incubación con pirogalol y otra después. Los extractos se incorporan 15 minutos antes que el pirogalol.

Ensayo de biodisponibilidad del óxido nítrico

Tras comprobar que el endotelio no esté dañado, y esperar una hora de estabilización, los anillos se incuban durante 20 minutos con los extractos y se contraen con FE (10^{-7} M). Se espera hasta alcanzar una meseta estable, se añade al baño L-NAME (10^{-4} M) y se espera hasta que alcance una meseta. La respuesta del L-NAME

en los distintos grupos nos indica la biodisponibilidad del NO, expresada como porcentaje de incremento sobre la respuesta de contracción de FE.

Actividad antioxidante

Ensayo de actividad captadora de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

El DPPH es uno de los pocos radicales libres orgánicos nitrogenados estables. Sus disoluciones metanólicas tienen una coloración morada. Este método se basa en el cambio de color de morado a amarillo que se produce cuando un compuesto antioxidante reduce el DPPH.

Para la realización de este ensayo se utilizó un lector de microplacas ASYS UVM 340. La mezcla de la reacción, en cada uno de los 96 pocillos de la microplaca, consiste en 10 μl de las distintas disoluciones de los extractos, con el rango de concentraciones que aparece en la tabla 6 y 190 μl de una disolución metanólica de DPPH (250 μM). Algunos de los pocillos se utilizan para realizar los blancos de vehículos (190 μl de metanol+10 μl del vehículo de los extractos), de muestras (190 μl de metanol+10 μl de los extractos en cada una de sus concentraciones) y para la realización del control (190 μl de DPPH+10 μl del vehículo) (Fig. 15).

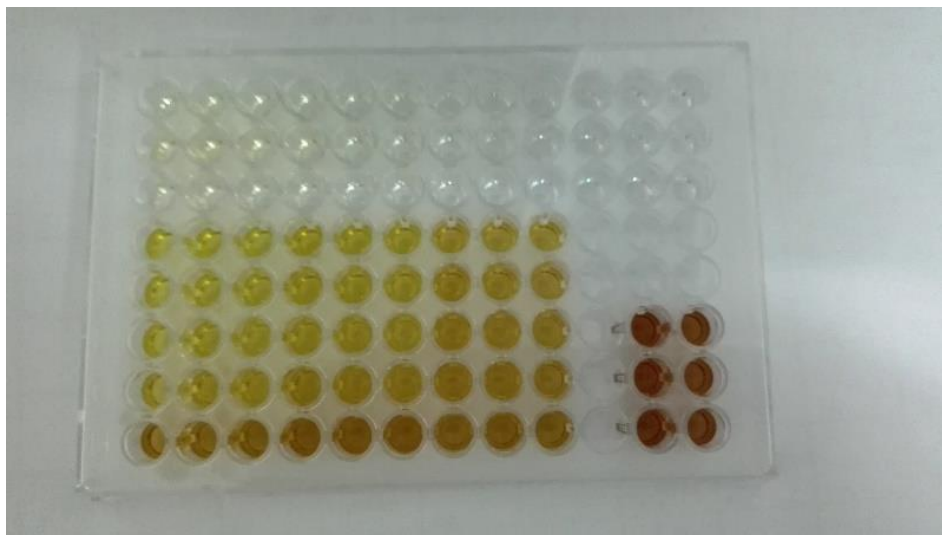


Figura 15. Microplaca tras el ensayo.

Se incuban las microplacas durante 30 minutos protegidas de la luz y, a continuación, se mide la absorbancia a 517 nm. La actividad captadora de radicales se calcula como porcentaje de inhibición, usando la siguiente ecuación:

$$\frac{(A \text{ vehículo} - A \text{ blanco vehículo}) - (A \text{ muestra} - A \text{ blanco muestra})}{(A \text{ vehículo} - A \text{ blanco vehículo})} \times 100$$

Tabla 6. Rango de concentraciones utilizadas de los distintos extractos de *P. avium*.

Extractos	AcOEt	BuOH	H ₂ O	Decocción 30	Infusión	Decocción 5
Concentración final (mg/ml)	0,025-1	0,025-1	0,025-1	0,1-1	0,1-1	0,1-1

Determinación del anión superóxido

Evaluando la influencia de los extractos sobre la producción de O₂⁻ también es posible determinar si dichos extractos presentan actividad antioxidante. Los O₂⁻ pueden cuantificarse mediante quimioluminiscencia con lucigenina.

Este método se basa en la reducción inicial de un electrón de la lucigenina dicatiónica dando lugar a un radical monocatiónico. El radical formado reacciona con O₂⁻ produciendo dioxetano, un compuesto inestable que se descompone originando *N*-metilacridona (NMA). NMA se encuentra electrónicamente excitada y vuelve al estado de equilibrio mediante la emisión de luz, que se puede detectar con un fotodetector (Li *et al.*, 1998) (Fig. 16).

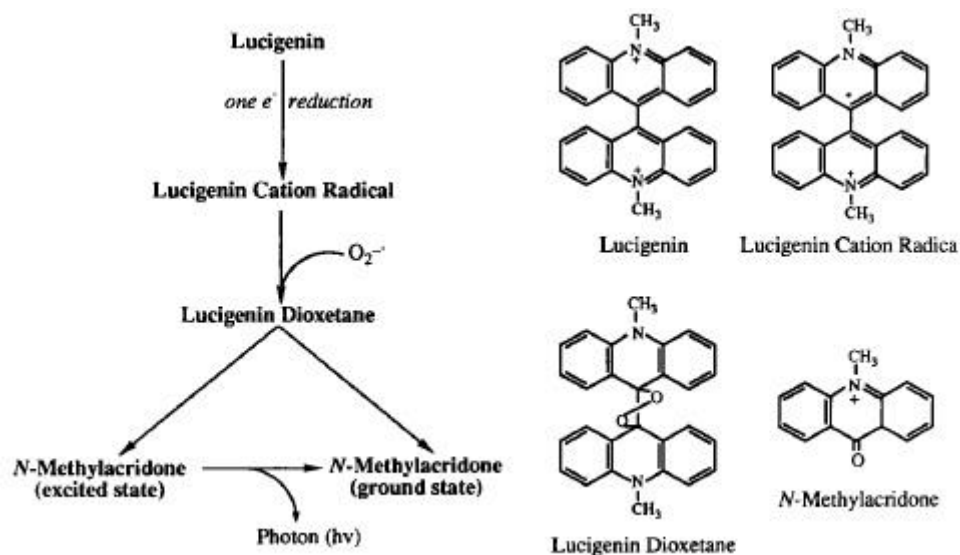


Figura 16. Reacción de lucigenina con los aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Li *et al.*, 1998).

- $O_2^{\cdot-}$ producido por pirogalol

En este ensayo valoramos la capacidad de los extractos para reducir la producción de $O_2^{\cdot-}$ producido por la autooxidación espontánea de pirogalol, como hemos comentado anteriormente.

Para ello, en los tubos de análisis se añaden 940 μ l de solución Krebs, 5 μ l de pirogalol 2×10^{-3} M y 5 μ l del extracto a estudiar o del vehículo (Tabla 7). Se incuban durante 20 minutos y se añaden 50 μ l de lucigenina 0,1 mM. A continuación, se mide la señal de luminiscencia en un luminómetro (LB-9507 LUMAT, Berthold Technologies, Alemania), cada 10 segundos durante 300 segundos. Los resultados se expresan en unidades relativas de luminiscencia por minuto (URL/min).

Tabla 7. Concentraciones en el tubo para luminómetro de los extractos utilizados.

Extractos	AcOEt	BuOH	H ₂ O	Decocción 30	Infusión	Decocción 5
Concentración (μg/ml)	15 y 100	10 y 50	5	50	15 y 150	50

- $O_2^{\cdot-}$ producido por NADPH-oxidasa:

También se puede determinar el efecto antioxidante de los extractos evaluando su influencia en la producción de $O_2^{\cdot-}$ mediada por la estimulación de NADPH oxidasa.

Para la realización de este ensayo se necesitan anillos de aorta de rata. Los anillos se incuban en tubos para luminómetro con solución ROS durante 15 minutos, a 37°C y con oxigenación continua, en presencia de los extractos (Tabla 8) y el inhibidor de la SOD, dietilditiocarbamato de amonio (DDC, 10^{-2} M). Tras el periodo de incubación, se añaden al tubo lucigenina (5 μ M) y NADPH (10^{-4} M) y se mide la luminiscencia como se indicó anteriormente. Los anillos se pesaron tras el ensayo para poder expresar los resultados por mg de tejido (URL/min/mg).

Tabla 8. Concentraciones en el tubo para luminómetro de los distintos extractos.

Extractos	AcOEt	BuOH	Infusión
Concentración (μg/ml)	100	50	150

Expresión y análisis estadístico de los resultados

Todos los resultados obtenidos se expresan como media aritmética \pm el error estándar de la media de un mínimo de 4 experimentos. Para comparar los valores obtenidos entre los diferentes grupos se realiza el test *t* de Student o el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías, según corresponda, seguido del test Tukey, considerándose diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

4. Resultados y discusión

Extractos obtenidos de *P. avium* y sus rendimientos

En la tabla 9 se muestran la masa y los rendimientos de extracción obtenidos de la extracción biodirigida, de la infusión y de la decocción de los rabos de *P. avium*.

Tabla 9. Masa (g) y rendimiento (%) de los extractos obtenidos a partir de 200 g de rabos de cereza.

EXTRACTO	Hex.	DCMi	DCMs	AcOEt	BuOH	H ₂ O	Dec30	Infu	Dec5
Masa (g)	1,079	0,850	0,984	1,442	11,698	20,666	2,508	0,084	0,144
Rendimiento	0,54%	0,43%	0,49%	0,72%	5,85%	10,33%	1,25%	8,40%	14,40%

En la extracción biodirigida el mayor rendimiento se obtuvo con la maceración en MeOH/H₂O, la suma de los extractos BuOH y H₂O en los que se fraccionó posteriormente, por tanto, podemos decir que la mayoría de los compuestos son polares.

El rendimiento de la decocción fue superior al de la infusión, que se justifica porque el uso de un método más agresivo hidrolizaría más compuestos extraíbles en el agua, como pueden ser los monosacáridos o los lignanos de los polímeros estructurales de las partes leñosas de los rabos de cereza (celulosas y ligninas respectivamente).

Identificación de los compuestos volátiles de los extractos de hexano y diclorometano

Extracto de hexano

Tras la realización de la cromatografía de gases del extracto de hexano, mediante la comparación de los espectros obtenidos y los tiempos de retención (t_r) de cada pico con la base de datos de referencia y la bibliografía (Burger, 2016), se pudieron identificar siete compuestos de naturaleza lineal (Tabla 10). También se detectó la presencia de un compuesto desconocido con un $t_r=12,23$ min, un ion molecular $[M]^+$ a $256 m/z$ y la formación del ion $212 m/z$ por la pérdida de una molécula de CO₂ (Fig. 17).

Tabla 10. Listado de compuestos identificados en el extracto de hexano de rabos de cereza.

Nº	t _r (min)	Compuesto (nº carbonos)
1	14,18	<i>n</i> -pentacosano (25)
2	14,54	<i>n</i> -hexacosano (26)
3	14,94	<i>n</i> -heptacosano (27)
4	15,30	<i>n</i> -octacosano (28)
5	15,65	<i>n</i> -nonacosano (29)
6	16,00	<i>n</i> -triacontano (30)
7	16,35	<i>n</i> -hentriacontano (31)

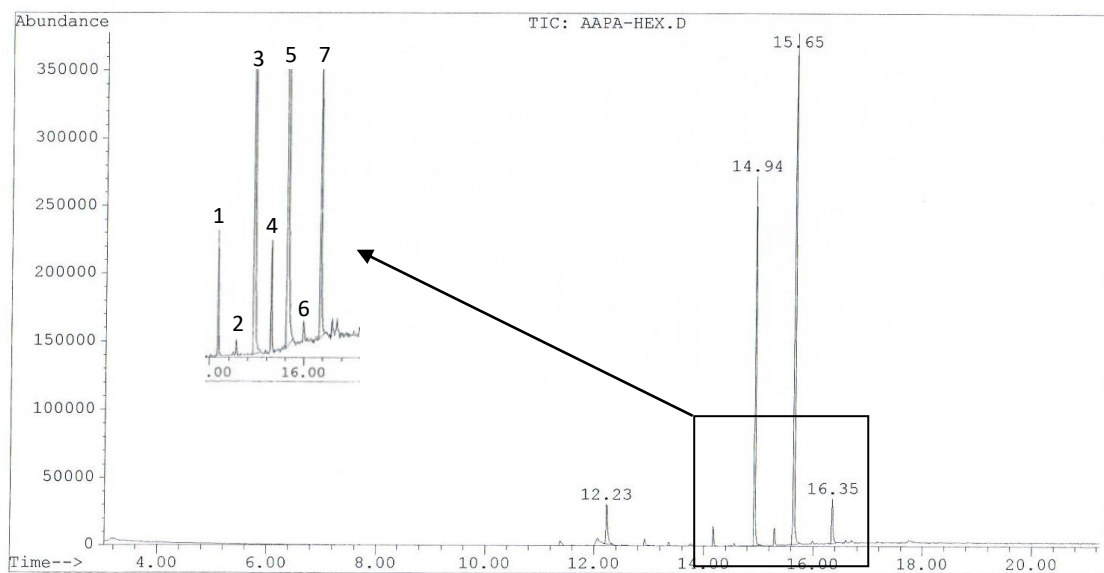


Figura 17. Cromatograma GC-MS del extracto de hexano de rabos de cereza.

Extractos de diclorometano

Tabla 11. Listado de los compuestos identificados en el extracto de diclorometano de rabos de cereza.

Nº	t _r (min)	Nombre común	Fracción
8	11,91	ácido palmítico	DCM _i
3	14,91	<i>n</i> -heptacosano	DCM _i
4	15,26	<i>n</i> -octacosano	DCM _i
5	15,62	<i>n</i> -nonacosano	DCM _i
9	15,74	campesterol	DCM _i
10	16,41	estigmasterol	DCM _s
11	16,54	clerosterol	DCM _i y DCM _s
12	16,63	β-sitosterol	DCM _i y DCM _s
13 ^a	17,69	Δ ⁵ -avenasterol	DCM _s

^a identificación tentativa

Los compuestos **8**, **3**, **4** y **5**, que únicamente aparecen en la fracción insoluble en frío de DCM (DCM_i), se identificaron mediante la comparación de los espectros de masas y los t_r obtenidos con la base de datos de referencia y la bibliografía (Burger, 2016). En esta misma fracción también se detectó la presencia de un compuesto desconocido con un t_r=17,69 min y un ion molecular [M]⁺ a 282 *m/z* (Fig. 18).

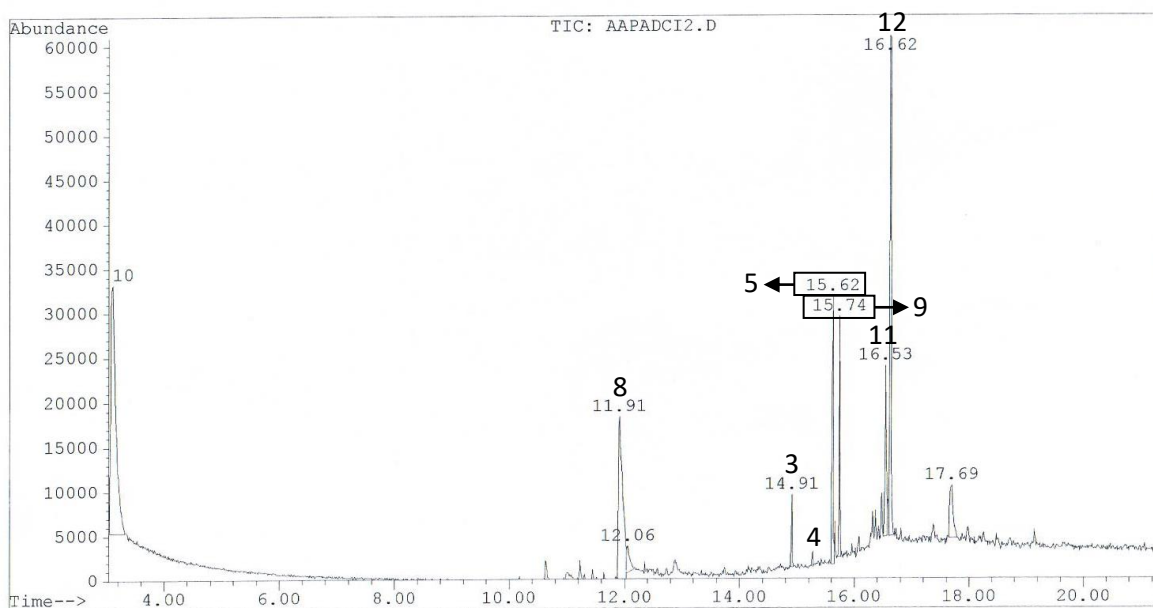


Figura 18. Cromatograma GC-MS de la fracción insoluble en frío del extracto de diclorometano.

El compuesto **12**, cuya señal aparece en ambas fracciones (Fig 18 y 21), se identificó mediante la comparación del espectro obtenido con la base de datos de referencia. El espectro obtenido mostraba un ion a 396 m/z , que correspondería con el $[M-H_2O]^+$ del β -sitosterol o bien con el ion molecular del dieno derivado de su deshidratación (estigmasta-3,5-dieno). Para determinar si el compuesto identificado era el alcohol o el dieno, se realizó una segunda cromatografía en un equipo GC-MS cuyo detector tenía un analizador de masas distinto (trampa iónica). En el espectro obtenido está presente el ion molecular del fitosterol, $[M]^+$ a 414 m/z , por lo que se identificó el compuesto como β -sitosterol (Fig. 19).

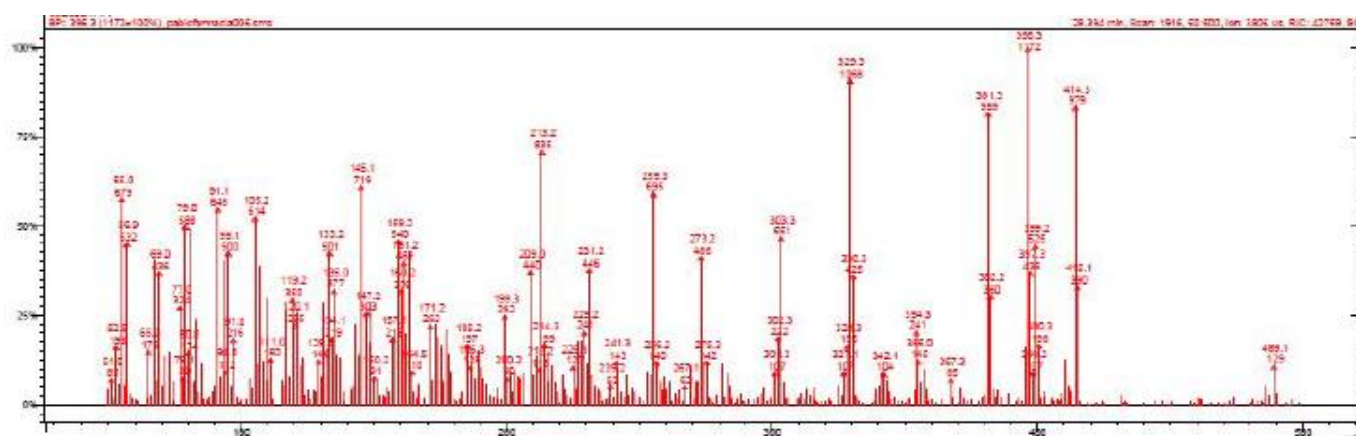


Figura 19. Espectro de masas del β -sitosterol.

Los compuestos **9**, **10**, **11** y **13** mostraban espectros similares al del β -sitosterol, pero no se pudieron identificar mediante la comparación con la base de datos de referencia. Una vez identificado el β -sitosterol, comparando el orden de elución de los fitosteroles con los identificados por Bernardo-Gil *et al.* (2001) en el aceite de semillas de cereza y el ion molecular que mostraban los espectros de masas de cada una de las señales, se identificaron los compuestos **9**, **10** y **11**. El compuesto número **13** se ha identificado como Δ^5 -avenasterol, a pesar de que el $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol y el Δ^7 -avenasterol comparten su masa molecular y aparecen después de la señal del β -sitosterol, porque en el estudio realizado por Bernardo-Gil *et al.* (2001) estos dos últimos compuestos aparecen a modo de trazas (Fig. 20).

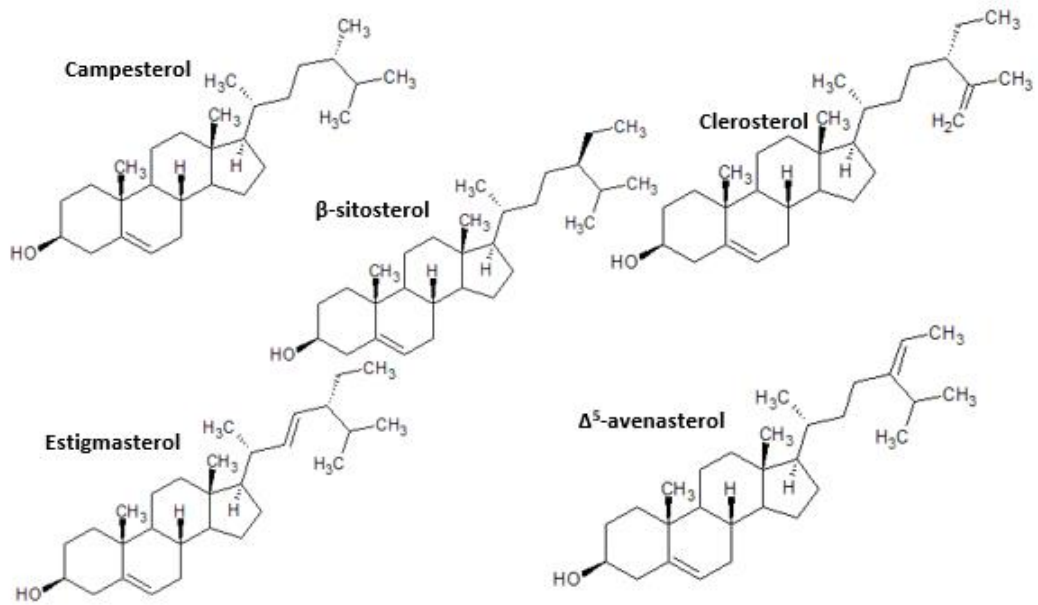


Figura 20. Estructura química de los fitosteroles identificados en el extracto de diclorometano de rabos de cereza.

Por último, en el cromatograma de la fracción soluble en frío de DCM (DCM_s) se detectó la presencia de un compuesto desconocido con un $t_r=16,49$ min y un ion molecular $[M]^+$ a $396 m/z$ (Fig. 21).

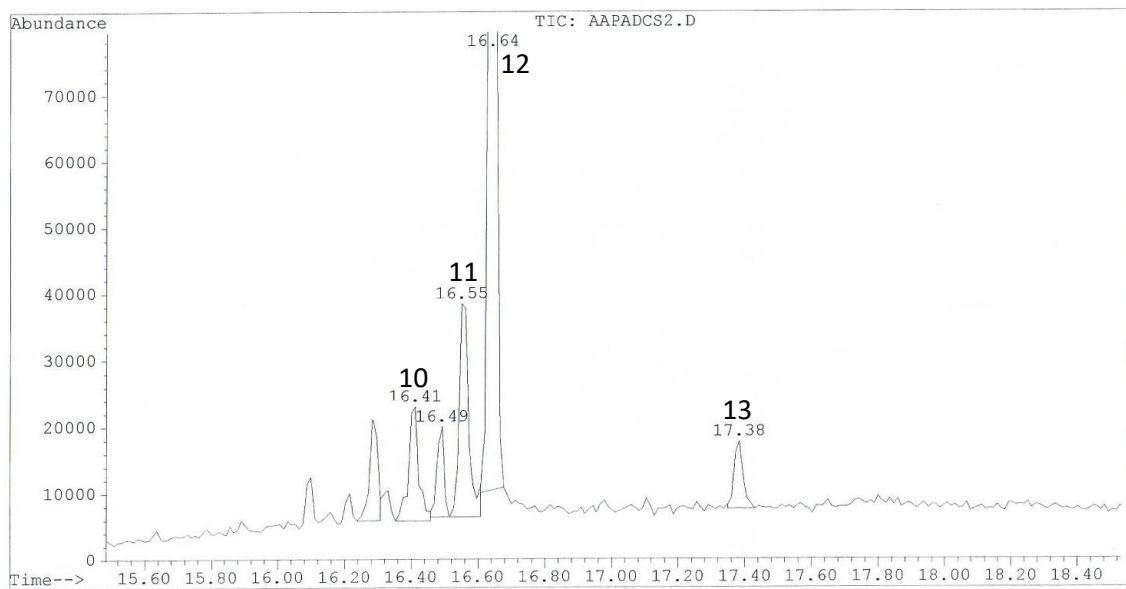


Figura 21. Cromatograma GC-MS de la fracción soluble en frío del extracto de diclorometano de rabos de cereza.

Ensayos *in vitro* en arteria aorta de rata

Evaluación del efecto vasodilatador

En este estudio, lo primero que se estudió fue la actividad vasodilatadora de los extractos más polares de *P. avium* en anillos de aorta de rata.

En la figura 22 se muestran las curvas concentración-respuesta de los seis extractos evaluados, tanto en anillos con endotelio como en anillos sin endotelio. En el caso de los extractos AcOEt y BuOH, las curvas control se realizaron en presencia de DMSO para comprobar que el vehículo no provocaba ningún efecto en la respuesta estudiada. Se puede observar que todos los extractos presentaron efecto relajante frente a la contracción con FE en aortas con endotelio, pero el efecto máximo y la CE₅₀ varía para cada uno de ellos (Tabla 12). Los extractos más activos fueron el BuOH y el H₂O, que presentaron valores de CE₅₀ de 5 y 1 µg/ml respectivamente. El extracto AcOEt, que presentó un E_{max} ligeramente superior, sin embargo, tuvo un valor de CE₅₀ muy superior. La diferencia de polaridad del AcOEt hace que los compuestos extraídos en este extracto sean menos polares que los obtenidos en los extractos BuOH y H₂O y es posible que esto influya en la capacidad relajante del extracto. La infusión y la decocción 5 alcanzaron valores de E_{max} similares, aunque la infusión fue ligeramente más activa, con un CE₅₀ cuatro veces inferior. En el caso de la Dec. 30 no se pudo calcular la CE₅₀, ya que la respuesta relajante que se obtuvo con la concentración más alta no alcanzó el 50%.

Tabla 12. Rango de concentraciones utilizado para cada extracto y Concentración eficaz 50 (CE₅₀) y efecto máximo (E_{max}) obtenido con los extractos y fracciones de rabos de cereza.

Extractos	AcOEt	BuOH	H ₂ O	Dec. 30	Infusión	Dec. 5
Concentración (µg/ml)	50-250	1-50	1-25	1-50	1-50	1-50
CE₅₀ (µg/ml)	167±4	5±1	1±2	-	13±2	49±2
E_{max} (%)	84±8	70±3	68±5	49±6	69±5	61±3

En los ensayos realizados en las aortas sin endotelio se observó que la capacidad relajante de todos los extractos desaparece casi por completo, lo que indica que la presencia del endotelio es necesaria para que se manifieste la acción relajante.

Al igual que en el caso anterior, el comportamiento del extracto de AcOEt fue diferente, ya que la ausencia del endotelio no consiguió anular el efecto relajante (Fig. 22 A), pues se alcanzó un 36 % de relajación. Esto indica, de nuevo, que debe haber compuestos diferentes en este extracto.

Para conocer más acerca del mecanismo de acción se estudió la influencia de la NOS y de la COX en la respuesta de los extractos que mostraron mayor actividad vasodilatadora, el extracto H₂O y BuOH.

En la figura 23, se observa que la incubación con L-NAME inhibió completamente la vasodilatación inducida por ambos extractos. En el caso de la indometacina, no modificó la relajación inducida por el extracto H₂O, pero sí disminuyó la relajación inducida por la fracción BuOH de forma significativa. Estos resultados confirman que el mecanismo de acción de los distintos extractos de *P. avium* está relacionado con la generación de NO o con su ruta de señalización. Que la respuesta del extracto BuOH se modificara con indometacina indica que la vía de la COX también influye en la respuesta vasodilatadora. Son numerosos los estudios que atribuyen a los compuestos polifenólicos acciones beneficiosas para reducir la hipertensión y el riesgo de ECV por mejorar la función endotelial (Hügel *et al.*, 2016). En la revisión realizada por Bondonno *et al.* (2015), se puede observar que la mayoría de los mecanismos descritos para el efecto vascular de los flavonoides tiene que ver con el NO, por lo que los resultados obtenidos concuerdan con los datos obtenidos en estudios anteriores.

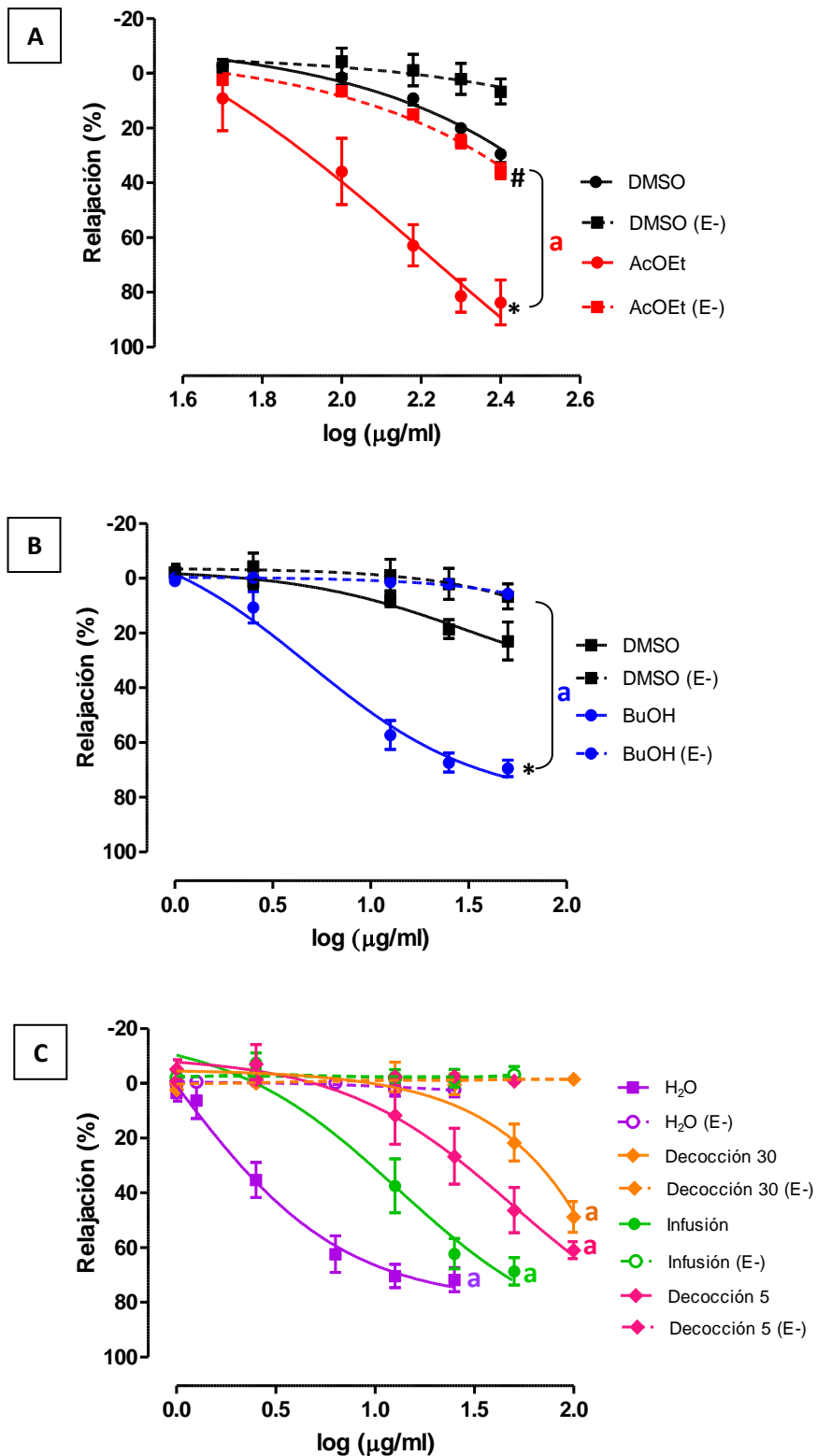


Figura 22. Curvas concentración-respuesta de dimetilsulfóxido (DMSO) y de los distintos extractos obtenidos a partir de los rabos de cereza en arteria aorta con endotelio y sin endotelio (E-) precontraídas con fenilefrina (10^{-6} M) de ratas Wistar. **A:** acetato de etilo (AcOEt, 50-250 $\mu\text{g/ml}$). **B:** fracción butanólica del extracto hidrometanólico (BuOH, 1-50 $\mu\text{g/ml}$). **C:** fracción acuosa del extracto hidrometanólico (H_2O , 1-25 $\mu\text{g/ml}$), decocción del marco vegetal (Decocción 30, 1-50 $\mu\text{g/ml}$), infusión (1-50 $\mu\text{g/ml}$) y decocción (Decocción 5, 1-50 $\mu\text{g/ml}$). * $p < 0,05$ vs DMSO; # $p < 0,05$ vs DMSO (E-); a $p < 0,05$ anillos con endotelio vs anillos sin endotelio.

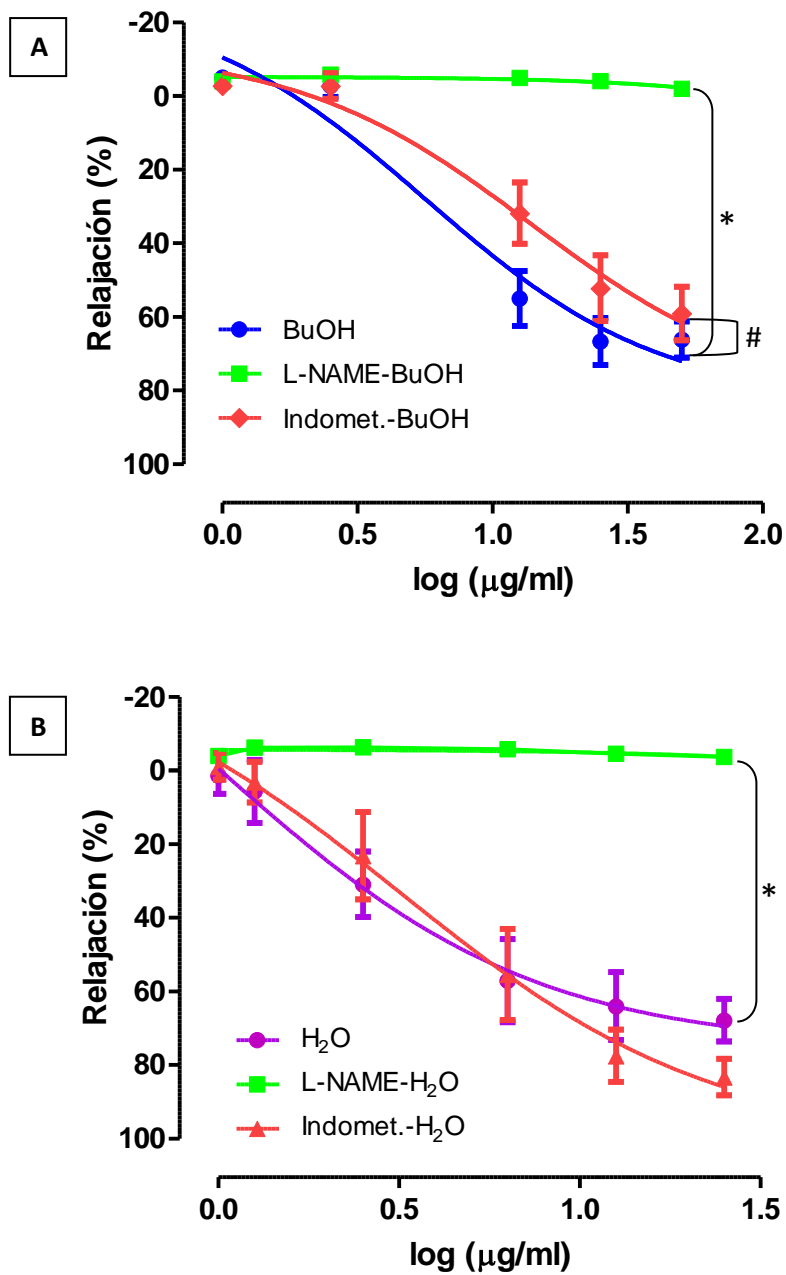


Figura 23. Curvas concentración-respuesta de la fracción butanólica del extracto hidrometanólico (BuOH, 1-50 µg/ml) (A) y de la fracción acuosa del extracto hidrometanólico (H₂O, 1-25 µg/ml) (B) en arteria aorta con endotelio de ratas Wistar precontraídas con fenilefrina (10⁻⁶ M) en presencia o ausencia de L-NAME (10⁻⁴ M) o indometacina (indomet., 10⁻⁵ M). * p<0,05 vs L-NAME; # p<0,05 vs indometacina.

Curvas concentración-respuesta a fenilefrina

Para la realización de este ensayo se utilizaron las concentraciones máximas del ensayo de vasodilatación, excepto en los casos de la fracción H₂O, en el que se dobló esta concentración, y el extracto AcOEt, en el que se utilizó una dosis más baja. Como se ve en la figura 24, los extractos AcOEt, BuOH y H₂O redujeron la respuesta contracturante mediada por FE. Sin embargo, la incubación con la infusión y las dos decocciones no afectó esta respuesta. Hay que decir que el comportamiento del extracto de AcOEt fue de nuevo diferente en este ensayo, obteniéndose mayor efecto pese a utilizar una concentración menor que la CE₅₀. La identificación de los componentes de los diferentes extractos podría aclarar estas diferencias.

Los efectos vasculares de los extractos fenólicos de *P. avium* (acción vasodilatadora y reducción de la respuesta contráctil) podrían justificar los resultados obtenidos en distintos estudios epidemiológicos y ensayos clínicos controlados aleatorios, en los que se estudian los beneficios cardiovasculares de la ingesta de flavonoides (Hügel *et al.*, 2016).

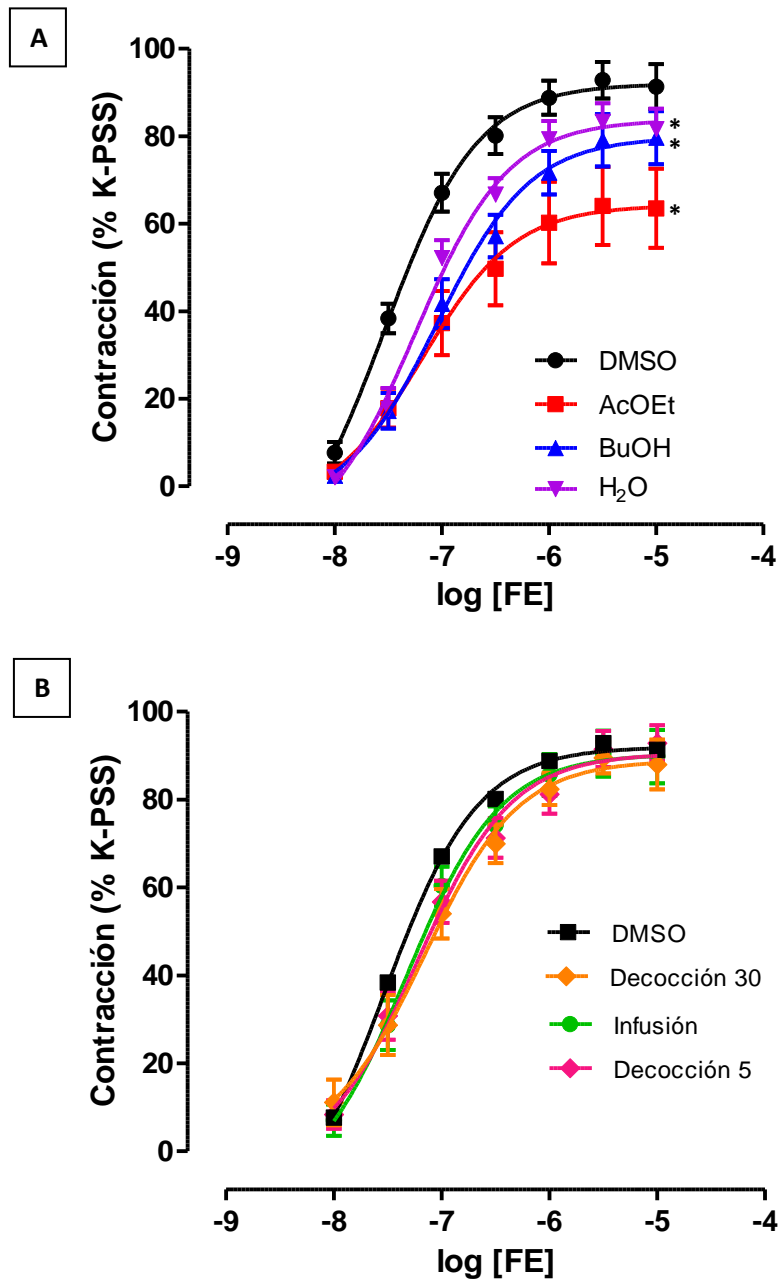


Figura 24. Curvas concentración-respuesta a fenilefrina (FE, 10^{-8} - 10^{-5} M) en arteria aorta de ratas Wistar incubadas con dimetilsulfóxido (DMSO) y con los distintos extractos de rabos de cereza. **A:** acetato de etilo (AcOEt, 100 μ g/ml), fracción butanólica del extracto hidrometanólico (BuOH, 50 μ g/ml) y fracción acuosa del extracto hidrometanólico (H₂O, 50 μ g/ml). **B:** decocción del marco vegetal (Decocción 30, 50 μ g/ml), infusión (50 μ g/ml) y decocción (Decocción 5, 50 μ g/ml). * $p < 0,05$ vs DMSO.

Ensayo de biodisponibilidad de óxido nítrico

Como se ha indicado en la metodología, una manera de valorar la biodisponibilidad del NO es cuantificar la respuesta contracturante de L-NAME sobre la meseta de contracción de FE (10^{-7} M) tras la incubación con los extractos. Las concentraciones utilizadas para los extractos se seleccionaron teniendo en cuenta las respuestas obtenidas para cada uno en el ensayo anterior (Tabla 13). En el caso de la infusión, triplicamos la concentración debido a que con la concentración utilizada en dicho ensayo no se observó ninguna respuesta.

Tabla 13. Concentración en el baño utilizada en la incubación.

Extractos	AcOEt	BuOH	BuOH	Infusión
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	100	50	150	150

En la figura 25 se puede ver un incremento significativo de esta respuesta en los anillos incubados previamente con los extractos, lo que indica que la vía de actuación de los tres extractos está relacionada con el NO. No se ha observado una relación dosis-dependiente en este ensayo para el extracto BuOH, puesto que no hay diferencias significativas entre el efecto obtenido con las 2 concentraciones utilizadas.

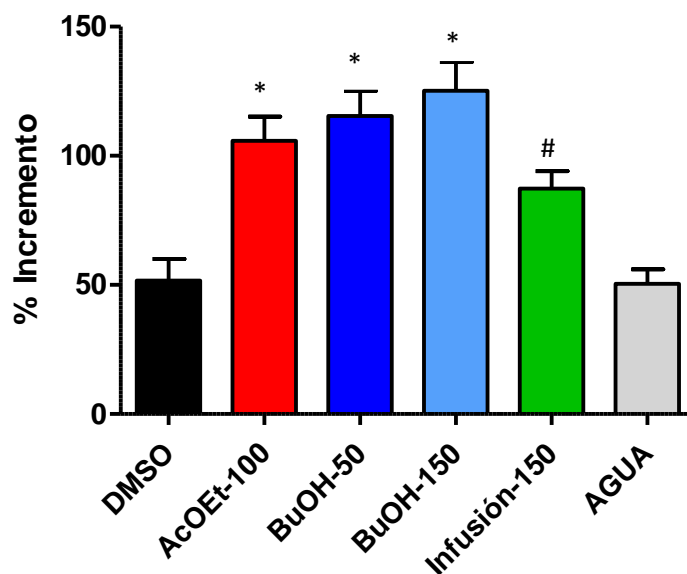


Figura 25. Biodisponibilidad del óxido nítrico en arteria aorta de ratas Wistar precontraídas con fenilefrina (10^{-7} M) e incubadas con dimetilsulfóxido (DMSO), con el extracto de acetato de etilo (AcOEt, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), con la fracción butanólica del extracto hidrometanólico (BuOH, 50 y 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$), con la infusión (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). * $p < 0,05$ vs DMSO; # $p < 0,05$ vs AGUA.

Actividad antioxidante

El estrés oxidativo tiene una gran importancia en la disfunción endotelial, debido a que la biodisponibilidad de NO se ve afectada por un aumento de la producción de ERO mediante distintas vías. Tal y como se ha comentado anteriormente, en los vasos, la NADPH oxidasa es una de las principales vías de producción de estos radicales. Debido a esto y a que un estudio previo describe para extractos de *P. avium* capacidad antioxidante (Bastos *et al.*, 2015), se incluyó en los objetivos el estudio de esta actividad.

Ensayo de actividad captadora de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

Los resultados de la actividad captadora de radicales DPPH de los distintos extractos de *P. avium* se muestran en la figura 26. Se puede observar que los extractos de AcOEt, BuOH y H₂O mostraron buena actividad antioxidante en este ensayo.

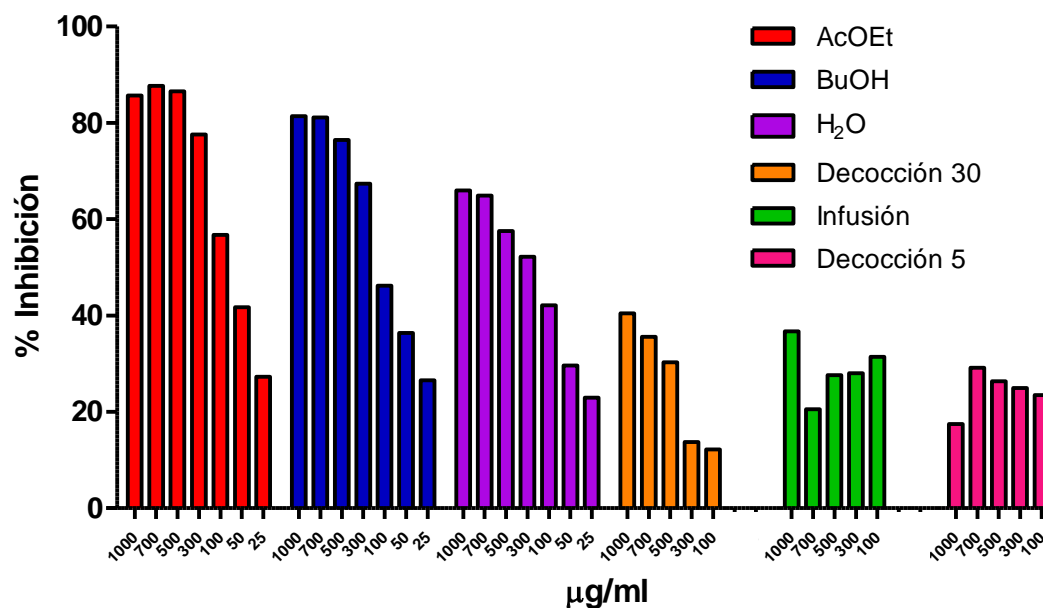


Figura 26. Porcentaje de inhibición de la señal de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, 250 µM) del extracto de acetato de etilo (AcOEt, 0,025-1 mg/ml), de la fracción butanólica del extracto hidrometanólico (BuOH, 0,025-1 mg/ml), de la fracción acuosa del extracto hidrometanólico (H₂O, 0,025-1 mg/ml), de la decocción del marco vegetal (Decocción 30, 0,1-1 mg/ml), de la infusión (0,1-1 mg/ml) y de la decocción (Decocción 5, 0,1-1 mg/ml).

Como se puede ver en la tabla 14, el valor de la CE₅₀ nos indica que el orden de potencia es: AcOEt > BuOH > H₂O. En los otros tres extractos ensayados no se pudo calcular la CE₅₀, dado que con las concentraciones utilizadas no se alcanzó el 50% de la actividad antioxidante. En este estudio, los extractos (AcOEt, BuOH y H₂O) mostraron una mayor capacidad antioxidante que los preparados tradicionales con agua (infusión y decocción), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Bastos *et al.* (2015). En dicho trabajo ensayaron un extracto que mostró un valor de CE₅₀ similar al obtenido en este estudio para la fracción acuosa del extracto hidrometanólico. Aunque no se han podido determinar los componentes de este extracto, puede ser que tenga una composición similar al obtenido por estos autores, lo que justificaría su actividad. El fraccionamiento llevado a cabo en nuestro estudio nos ha proporcionado otros extractos (AcOEt y BuOH) con mayor actividad. En el caso de la infusión y la decocción, nuestros resultados indican una menor potencia. En este sentido, un estudio realizado por Ballistreri *et al.* (2013) reportó que los frutos de distintos genotipos de cereza contienen cantidades distintas de compuestos fenólicos. Es posible que la razón de la

diferencia entre los datos obtenidos en este estudio y los resultados obtenidos por Bastos *et al.* (2015) sea la diferencia en el genotipo de *P. avium* utilizado en cada estudio.

Tabla 14. Concentración eficaz 50 (CE₅₀) obtenida con los extractos y fracciones de rabos de cereza en el ensayo con DPPH

Extracto	AcOEt	BuOH	H₂O
CE₅₀ (µg/ml)	103±9	160±13	312±14

Determinación del radical superóxido

- O₂⁻ producido por NADPH-oxidasas:

Se decidió realizar este ensayo con los extractos de AcOEt y BuOH, ya que mostraron mayor capacidad antioxidante en el ensayo de captación de radicales DPPH, y con la infusión, porque entre los dos extractos que simulan el consumo directo, fue el que mayor efecto vasodilatador mostró.

En la figura 27, se puede ver que tanto el extracto BuOH como el extracto AcOEt mostraron diferencias significativas respecto a su control (DMSO), pero no así la infusión. Esto significa que estos dos extractos son capaces de reducir la generación de radicales O₂⁻ estimulada por NADPH.

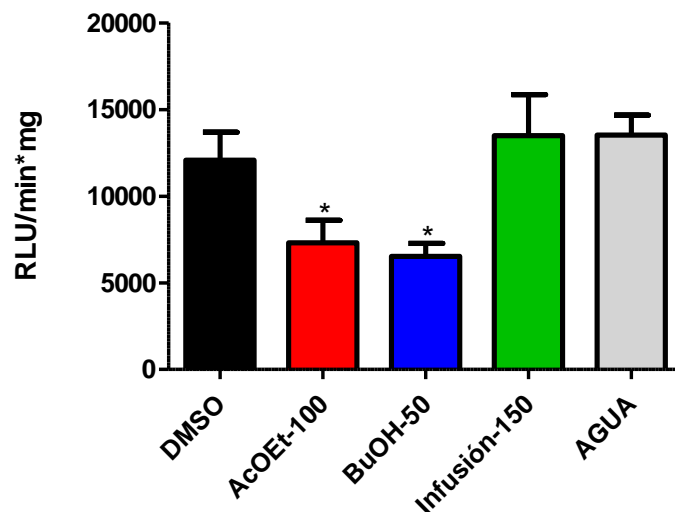


Figura 27. Captación del anión superóxido producido por NADPH en arteria aorta de ratas Wistar del dimetilsulfóxido (DMSO), del extracto de acetato de etilo (AcOEt, 100 µg/ml), de la fracción butanólica del extracto hidrometanólico (BuOH, 50 µg/ml) y de la infusión (Infu, 150 µg/ml). * p<0,05 vs DMSO.

- O_2^- producido por pirogalol:

Para la realización de este ensayo se utilizaron los extractos y concentraciones utilizados en el ensayo descrito previamente y una concentración similar a la CE_{50} obtenida en el ensayo del efecto vasodilatador de todos los extractos, excepto del extracto de AcOEt, que se probó con una concentración parecida a la de la fracción BuOH debido a que este es un ensayo de capacidad antioxidante y previamente se ha visto que ambos tienen una actividad antioxidante similar.

En la figura 28, se puede observar que todos los extractos, menos Dec. 30, poseen capacidad neutralizante de O_2^- . El aumento de la concentración del extracto BuOH y la infusión incrementó significativamente este efecto antioxidante.

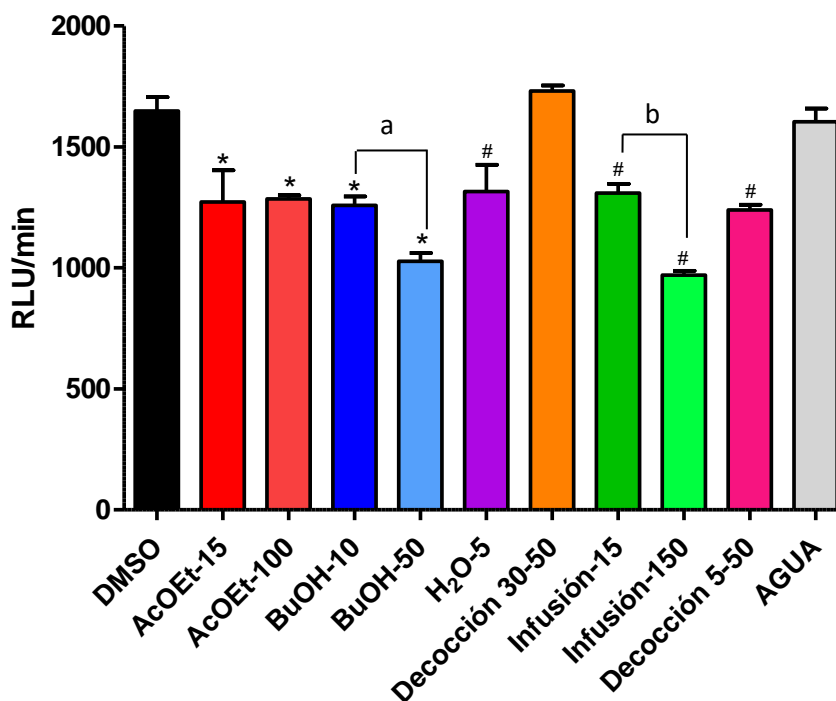


Figura 28. Captación del anión superóxido producido por pirogalol (10^{-5} M) del dimetilsulfóxido (DMSO), del extracto de acetato de etilo (AcOEt, 15 y 100 $\mu\text{g/ml}$), de la fracción butanólica del extracto hidrometanólico (BuOH, 10 y 50 $\mu\text{g/ml}$), de la fracción acuosa del extracto hidrometanólico (H_2O , 5 $\mu\text{g/ml}$), de la decocción del marco vegetal (Decocción 30, 50 $\mu\text{g/ml}$), de la infusión (15 y 150 $\mu\text{g/ml}$) y de la decocción (Decocción 5, 50 $\mu\text{g/ml}$). * $p < 0,05$ vs DMSO; # $p < 0,05$ vs AGUA; a $p < 0,05$ vs BuOH-50; b $p < 0,05$ vs Infu-150.

Estos resultados nos indican que las fracciones menos polares manifestarían una actividad antioxidante consecuencia tanto de su capacidad captadora de O_2^- como inhibidora de la NADPH oxidasa. La capacidad de los flavonoides para inhibir la NADPH oxidasa ya ha sido descrita con anterioridad, si bien, la potencia o la capacidad para inhibir esta enzima depende de la estructura (Mladenka *et al.*, 2010; Nijveldt *et al.*, 2001). La infusión, sin embargo, mostró capacidad de neutralización de O_2^- , al igual que la mayoría de los extractos acuosos, pero no presentó actividad en el ensayo realizado con NADPH oxidasa. Esto podría deberse a que la proporción de los compuestos inhibidores de esta enzima no es suficiente para observar dicha actividad.

Disfunción endotelial por pirogalol:

Teniendo en cuenta que la acción de los extractos está relacionada con la vía del NO y el efecto captador de radicales que mostraron en los ensayos de actividad antioxidante, se realizó un ensayo en el que se indujo una disfunción endotelial como

consecuencia del incremento de $O_2^{\cdot -}$ generados por autooxidación del pirogalol. Las concentraciones utilizadas, que podemos observar en la tabla 15, se seleccionaron teniendo en cuenta las respuestas obtenidas tanto en los ensayos de actividad antioxidante como en los ensayos de reactividad vascular.

Tabla 15. Concentración en el baño utilizada en la incubación.

Extractos	AcOEt	AcOEt	BuOH	BuOH	H ₂ O
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	15	100	10	50	5

Como se observa en la figura 29, la relajación a ACh se pierde casi por completo después de la incubación con pirogalol. En presencia de los extractos, en contra de lo que cabría esperar teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de captación de radicales, la relajación solo se recupera ligeramente. Es posible que con las dosis utilizadas los extractos no tengan efecto cuando el tejido vascular está presente.

Se hicieron ensayos con concentraciones superiores de los extractos AcOEt y BuOH, pero los resultados preliminares obtenidos no mostraron una mejora de la disfunción endotelial provocada por pirogalol.

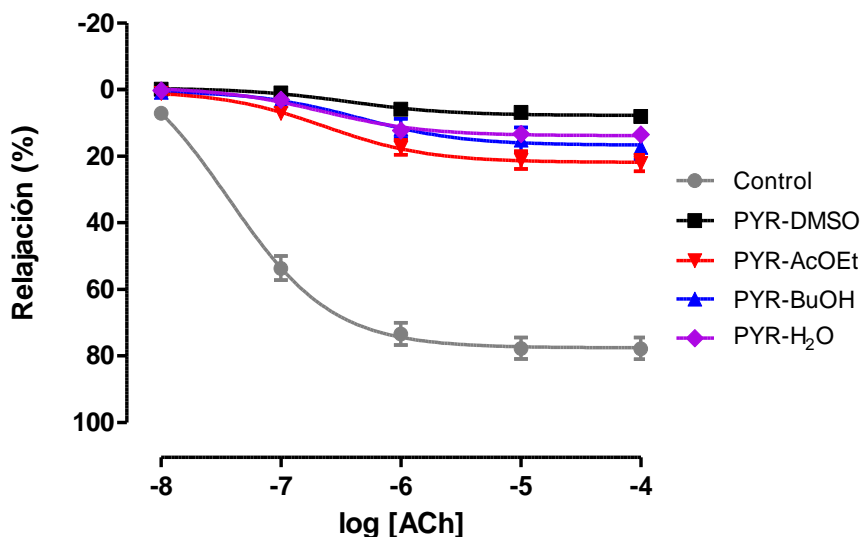


Figura 29. Curvas concentración-respuesta a acetilcolina (ACh, 10^{-8} - 10^{-4} M) en arteria aorta de ratas Wistar precontraídas con fenilefrina (10^{-6} M) e incubadas con pirogalol (PYR, 10^{-5} M) y con dimetilsulfóxido (DMSO), con el extracto de acetato de etilo (AcOEt, 15 $\mu\text{g/ml}$), con la fracción butanólica del extracto hidrometanólico (BuOH, 10 $\mu\text{g/ml}$) y con la fracción acuosa del extracto hidrometanólico (H₂O, 5 $\mu\text{g/ml}$).

Conclusiones y perspectivas futuras

En este trabajo se ha llevado a cabo el fraccionamiento y la caracterización química de algunos extractos de los rabos de cerezas y la determinación de la actividad farmacológica en aorta de rata, así como su capacidad antioxidante. Las conclusiones obtenidas en este trabajo se resumen en los siguientes puntos:

1. Se han obtenido 7 extractos y el de mayor rendimiento ha sido el hidrometanólico con un 16%. Esto indica que la mayor parte de los componentes extraídos son compuestos polares.
2. Los extractos más apolares de *P. avium* presentaron en su composición 13 compuestos: 7 hidrocarburos lineales, 1 ácido graso y 5 fitosteroles.
3. Todos los extractos presentan una acción vasodilatadora con el siguiente orden de potencia: H₂O > BuOH > Infu > Dec. 5 > AcOEt > Dec. 30. En todos los casos el efecto relajante se pierde cuando se elimina el endotelio o se incuba con L-NAME, lo que indica que es un mecanismo relacionado con la vía del NO.
4. La incubación previa con indometacina reduce ligeramente la relajación del extracto BuOH, lo que hace pensar en una pequeña participación de las prostaglandinas en su efecto.
5. Todos los extractos presentan actividad captadora de radicales DPPH, siendo el más potente el de AcOEt y, a excepción de la Dec. 30, muestran una actividad neutralizante de los radicales O₂⁻ formados por autooxidación de pirogalol. Además, los extractos de BuOH y AcOEt presentan capacidad para inhibir la NADPH-oxidasa.

Como futuro trabajo sería interesante realizar la caracterización química de los extractos de *P. avium* L. utilizados en los ensayos de actividad farmacológica, lo que nos permitiría conocer los compuestos responsables de su actividad y profundizar en los mecanismos de acción. También sería interesante realizar ensayos de toxicidad de los extractos.

5. Referencias

- Actis-Goretta, L.; Ottaviani, J. I.; Fraga, C. G. (2006). Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 229-234.
- Aparicio, R.; Santos, P.; Montero, M. J.; Carrón, R.; Sevilla, M. A. (2015). Does astaxanthin have superoxide anion scavenging action? *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 117, 771-774.
- Appelman, Y.; van Rijn, B.B.; ten Haff, M. E.; Boersma, E.; Peters, S. A. E. (2015). Sex differences in cardiovascular risk factors and disease prevention. *Atherosclerosis*, 241, 211-218.
- Arós, F.; Estruch, R. (2013). Dieta mediterránea y prevención de la enfermedad cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*, 66, 771-774.
- Avelló, M.; Suwalsky, M. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes Naturales y Mecanismos de Protección. *Atenea*, 494, 161-172.
- Ballistreri, G.; Continella, A.; Gentile, A.; Amenta, M.; Fabroni, S.; Rapisarda, P. (2013). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chemistry*, 140, 630–638.
- Balzer, J.; Rassaf, T.; Heiss, C.; Kleinbongard, P.; Lauer, T.; Merx, M.; Heussen, N.; Gross, H. B.; Keen, C. L.; Schroeter, H.; Kelm, M. (2008). Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients: a double-masked, randomized, controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 51, 2141-2149.
- Bastos, C.; Barros, L.; Dueñas, M.; Calhelha, R. C.; R.P. Queiroz, M. J.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I. C. F. R. (2015). Chemical Characterisation and Bioactive Properties of *Prunus avium* L.: The Widely Studied Fruits and the Unexplored Stems. *Food Chemistry*, 173, 1045-1053.

- Bernardo-Gil, G.; Oneto, C.; Antunes, P.; Rodrigues, M. F.; Empis, J. M. (2001). Extraction of lipids from cherry seed oil using supercritical carbon dioxide. *European Food Research and Technology*, 212, 170-174.
- Bondonno, C. P.; Croft, K. D.; Ward, N.; Considine, M. J.; Hodgson, J. M. (2015). Dietary flavonoids and nitrate: effects on nitric oxide and vascular function. *Nutrition Reviews*, 73, 216–235.
- Braunwald, E. (2006). Tratado de Cardiología. *Elsevier España S.A.*, 7ª edición
- Burger, L. (2016). Investigaçã o e comparaçã o de metodologias de extraçã o de labdano obtido a partir de *Cistus ladanifer* L. Pendiente de aprobaci3n.
- Cai, H.; Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in Cardiovascular Diseases: the role of oxidant stress. *Circulation Research*, 87, 840-844.
- Di Cagno, R.; Surico, R. F.; Minervini, G.; Rizzello, C. G.; Lovino, R.; Servili, M.; Taticchi, A.; Urbani, S.; Gobbetti, M. (2011). Exploitation of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Puree Added of Stem Infusion through Fermentation by Selected Autochthonous Lactic Acid Bacteria. *Food Microbiology*, 28, 900-909.
- Eurostat. Causes of Death – standardised death rate, 2013. [Consulta el 25 de Julio del 2016] Disponible en: http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Causes_of_death_%E2%80%94_standardised_death_rate_2013.png
- Ferretti, G.; Bacchetti, T.; Belleggia, A.; Neri, D. (2010). Cherry Antioxidants: from Farm to Table. *Molecules*, 15, 6993-7005.
- Fraga, C. G.; Galleano, M.; Verstraeten, S. V.; Oteiza, P. I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits os polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 435-445.
- Gao, L.; Mazza, G. (1995). Characterization, Quantitation, and Distribution of Anthocyanins and Colorless Phenolics in Sweet Cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 343-346.

Gryglewski, R. J.; Korbut, R.; Robak, J. (1987). On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 36, 317-322

Gutiérrez, J. R. V. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31, 126-133.

Heiss, C.; Dejam, A.; Kleinbongard, P.; Schewe, T.; Sies, H.; Kelm, M. (2003). Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *The Journal of American Medical Association*, 290, 1030-1031.

Hooman, N.; Mojab, F.; Nickavar, B.; Pouryousefi-Kermani, P. (2009). Diuretic Effect of Powdered *Cerasus Avium* (Cherry) Tails on Healthy Volunteers. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22, 381-383.

Hügel, H. M.; Jackson, N.; May, B.; Zhang, A. L.; Xue, C. C. (2016). Polyphenol protection and treatment of hypertension. *Phytomedicine*, 23, 220-231.

INE. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la Causa de Muerte. Año 2014 [Consulta el 25 de Julio de 2016]. Disponible en: <http://www.ine.es/prensa/np963.pdf>

Li, Y.; Zhu, H.; Kuppusamy, P.; Roubaud, V.; Zweier, J. L.; Trush, M. A. (1998). Validation of lucigenin (Bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 2015-2023.

Lilamand, M.; Kelaiditi, E.; Guyonnet, S.; Incalzi, R. A.; Raynaud-Symond, A.; Vellas, B.; Cesari, M. (2014). Flavonoids and arterial stiffness: Promising perspectives. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24, 698-704.

Lobos, J. M.; Castellanos, A. (2006). Factores de riesgo cardiovascular. *Cardiología y Atención Primaria*, 3, 107-114.

Loke, W. M.; Hodgson, J. M.; Proudfoot, J. M.; McKinley, A. J.; Puddey, I. B.; Croft, K. D. (2008). Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 1018-1025.

Lourenço, A.; Lopes, L. C.; San Feliciano, A. (2006). Manual de Técnicas Experimentales Utilizadas en el Estudio Preclínico de Fármacos con Actividad Gastrointestinales. Proyecto X.10, CYTED, Camas (Sevilla, España), Capítulo 2.

McCarty, M. F. (2008). Scavenging of peroxynitrite-derived radicals by flavonoids may support endothelial NO synthase activity, contributing to the vascular protection associated with high fruit and vegetable intakes. *Medical Hypotheses*, 70, 170-181.

Mladenka, P.; Zatloukalova, L.; Filipsky, T.; Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 963-975.

Morel, I.; Lescoat, G.; Cogrel, P.; Sergent, O.; Padeloup, N.; Brissot, P.; Cillard, P.; Cillard, J. (1993). Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochemical Pharmacology*, 45, 13-19.

Mozetic, B.; Trebse, P.; Hribar, J. (2002). Determination and Quantitation of Anthocyanins and Hydroxycinnamic Acids in Different Cultivars of Sweet Cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia). *Food Technology and Biotechnology*, 40, 207–212.

Muñoz, F.; Navarro, C. (1998). Flora Ibérica. Vol. 6, 444-466.

Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoom, D. E. C.; Boelens, P. G.; van Norren, K. & van Leeuwen, P. A. M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418–25

OMS. Organización Mundial de la Salud. Centro de Prensa. Enfermedades Cardiovasculares. [Consulta el 25 de Julio de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>

Pacifico, S.; Di Maro, A.; Petriccione, M.; Galasso, S.; Piccolella, S.; Di Giuseppe, A. M. A.; Scortichini, M.; Monaco, P. (2014). Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of autochthonous *Prunus avium* cultivars from Campania Region. *Food Research International*, 64, 188–199.

Peri, L.; Pietraforte, D., Scorza, G.; Napolitano, A.; Fogliano, V.; Minetti, M. (2005). Apples increase nitric oxide production by human saliva at the acidic pH of the stomach: a new biological function for polyphenols with a catechol group? *Free Radical Biology and Medicine*, 39, 668-681.

Picariello, G.; De Vito, V.; Ferranti, P.; Paolucci, M.; Volpe, M. G. (2016). Species- and cultivar-dependent traits of *Prunus avium* and *Prunus cerasus* polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 50–57.

Reyes, G. C.; Sánchez, I. R.; Calzada-Mendoza, C. C.; Olivares-Corichi, I. M. (2006). Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 14, 233-236.

Sánchez, I. J. (2013) Marcadores inflamatorios y de disfunción endotelial en la insuficiencia cardíaca. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina, Tesis Doctoral.

Schroeter, H.; Heiss, C.; Balzer, J.; Kleinbongard, P.; Keen, C. L.; Hollenberg, N. K.; Sies, H.; Kwik-Urbe, C.; Schmitz, H. H.; Kelm, M. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Science U. S. A.*, 103, 1024-1029.

Serra, A. T.; Duarte, R. O.; Bronze, M. R.; Duarte, C. M. M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125, 318–325.

Stoclet, J. C.; Chataigneau, T.; Ndiaye, M.; Oak, M.; El Bedoui, J.; Chataigneau, M.; Schini-Kerth, V. B. (2004). Vascular protection by dietary polyphenols. *European Journal of Pharmacology*, 500, 299-313.

Takahama, U.; Oniki, T.; Hirota, S. (2002). Oxidation of quercetin by salivary components. Quercetin-dependent reduction of salivary nitrite under acidic conditions producing nitric oxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4317-4322.

Takahama, U.; Tanaka, M.; Hirota, S. (2010). Proanthocyanidins in buckwheat flour can reduce salivary nitrite to nitric oxide in the stomach. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 1-7.

Volk, J.; Gorelik, S.; Granit, R.; Kohen, R.; Kanner, J. (2009). The dual function of nitrite under stomach conditions is modulated by reducing compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, 47, 496-502.

Wikipedia. Prunus avium. [Consulta el 25 de febrero de 2016]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Prunus_avium

ANEXO I

Actividad antihelmíntica de los extractos de *Prunus avium* L.

Durante la realización de este trabajo, desde el Área de Parasitología de la Universidad de Salamanca, mostraron interés en el uso de distintos extractos naturales para la optimización de un método de análisis de actividad antihelmíntica en *Strongyloides venezuelensis*. Este proyecto fue realizado por Sergio Parejo, con la orientación del Dr. Julio López Abán.

Se ensayó la actividad antihelmíntica de los nueve extractos de *P. avium*, junto con otros extractos disponibles, contra las larvas L3 de *S. venezuelensis* mediante microscopía óptica y el ensayo colorimétrico MTT basado en la actividad de las mitocondrias. Se probaron dos concentraciones distintas para cada extracto (10 y 100 µg/ml). A estas concentraciones, los extractos procedentes de *Prunus avium* mostraron viabilidades mayores al 90% en cada uno de los extractos, por lo que no se encontró capacidad de inhibición significativa de la motilidad respecto a las larvas en PBS y por tanto no se encontró actividad antihelmíntica en estos extractos.