

**“EFECTOS MORFOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS y
CARDIOVASCULARES DEL ACEITE ESENCIAL y DE
TERPENOS HIDROCARBUROS DE *SCHINUS AREIRA*
(ANACARDIACEAE) EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN
ANIMALES”**

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

VÍCTOR LUIS ROSSETTI



**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
2014**

COMISIÓN DE TESIS

Director:

Prof. Dr. med. Andrés Alberto Ponce

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO

Prof. Dra. Patricia Adriana Paglini

Prof. Dr. Alberto Jorge Eraso

Resol. Decanal: 1146

LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CÓRDOBA NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES VERTIDAS EN ESTA TESIS

Art. 25 del Reglamento para la Carrera de Doctorado

Agradecimientos

Muy poco de este trabajo se puede agradecer y atribuir al autor.

Si a los que hicieron posibles en forma directa es decir trabajando con los animales, los análisis, las mediciones, escrituras, lecturas, consejos, correcciones y alimentación y manejo diario y toda clase de apoyo.

A David Silva, Andrés Ponce, Marta Martin, Noelia Natale, Juan Ferrero, Noelia Rojas, Veronica Diaz.

A los que me permitieron, me cubrieron mis turnos y me impulsaron en forma indirecta: Andres Ebel, Javier Rodriguez, Claudio Quispe, Belén Rossetti, Guillermo Capretta, Agustin Rossetti, Fernanda Lorea.

A los que me sostuvieron emotivamente en primer lugar mi Sra Elena B. Grotti, a mis hijos Martin, Belén y Agustín y entendieron de mi necesidad de conocimientos restándole tiempo a los afectos y obligaciones y trabajo.

Una especial mención a la persona que sobrepaso sus obligaciones que fue riguroso, perseverante, maestro y terminó siendo un amigo Profesor Andrés Ponce.

A las empresa Feas electrónica, y a su propietario el ingeniero Feas quien no solamente confio en una idea de un veterinario, luego una hipótesis y que termino en varios trabajos y publicaciones en el país y el exterior.

A alguien sin importancia que me descarto, hace unos 10 años, por no tener el doctorado cuando en el país casi no existían Doctorados y me dejo de lado en la

creación de la carrera de especialidad de Pequeños Animales de la Facultad de Esperanza, hoy ya perdone, pero gracias al fin por impulsarme a empezar a edad madura mi doctorado.

Por ultimo a Goethe: cuando muy joven lei en la portada de un libro la escritura que marco y justifico mi inquietud de vida.....

El hombre debe persistir en la creencia de explicar lo inexplicable; de lo contrario no investigaría

Goethe.

Por sus aportes, a la Comisión de seguimiento de la Tesis, Profesores Eraso y Paglini.

Falta agradecer al laboratorio y Cátedra de Física Biomédica, bajo la dirección de la Prof. Dra Patricia A. Paglini, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba y a su equipo; a la Cátedra de Fisiología Humana, bajo la dirección de la Prof. Dra. Graciela Stutz, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba y a su equipo; a la Dra Elissa Caballier de Anatomía Patológica y a su equipo, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba y al Prof. Dr. Julio Zygadlo y a su equipo, Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Antecedentes Históricos	7
1.2. Impacto Socio-Económico	8
1.3. Las Plantas Medicinales	9
1.4. Los Aceites Esenciales	11
1.5. <i>Schinus areira</i> (Aguaribay)	15
1.6. Fisiología de la Presión Arterial	16
1.7. La Enfermedad Cardiovascular	19
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivos generales	22
3.2. Objetivos específicos	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	24
4.1. Material vegetal	24
4.2. Obtención del aceite esencial de <i>Schinus areira</i>	24
4.3. Identificación y cuantificación de los terpenos del aceite esencial	24
4.4. Obtención de la Fracción Hidrocarbonada por	

cromatografía en capa delgada del AE de	
<i>Schinus areira</i>	25
4.5. Animales	25
4.6. Diseño Experimental	26
4.7. La observación clínica y el consumo de alimento	
e hidratación	27
4.8. Medición de la presión arterial en conejos	
despiertos normotensos	28
4.9. Determinaciones hematológicas, bioquímicas e	
histopatológicas en conejos despiertos	
normotensos y tratados con el AE de <i>Schinus</i>	
<i>areira</i>	29
4.10. Contractilidad miocárdica en corazón de ratón	
ex vivo tratados con el AE de <i>Schinus areira</i>	31
4.11. Análisis estadístico de los resultados	31
5. RESULTADOS	32
5.1. Composición química del aceite esencial de	
<i>Schinus areira</i>	32
5.2. Signos clínicos	34
5.3. Efectos del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> en	
parámetros Hematológicos y Bioquímicos	34

5.3.1. Valores Hematológicos: Serie roja.....	35
5.3.2. Valores Hematológicos: Serie blanca.....	36
5.3.3. Valores Bioquímicos.....	37
5.4. Efectos del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> en parámetros Histopatológicos	38
5.5. Efectos del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> en parámetros Hemodinámicos	41
5.5.1. Efectos del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> sobre la presión arterial: Tratamiento agudo	41
5.5.2. Efectos del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> sobre la presión arterial: Tratamiento crónico de 10 días	43
5.5.3. Efectos del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> de la Fracción Hidrocarbonada I sobre la presión arterial	44
5.5.4. Efectos del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> de la Fracción Hidrocarbonada II sobre la presión arterial	45
5.5.5. Efectos del aceite esencial de <i>Schinus areira</i> sobre la contractilidad miocárdica	46
6. DISCUSIÓN	48
7. BIBLIOGRAFÍA	62
8. ANEXOS	74
9. PUBLICACIONES	77

Título abreviado: Efectos hemodinámicos del aceite esencial de *S. areira*

RESUMEN

Introducción: *Schinus areira* L., comúnmente conocido como "Aguaribay", "Guaaleguay" o "Molle", pertenece a la familia Anacardiaceae, en donde se incluyen árboles ornamentales, arbustos y lianas, frutos y nueces comercialmente valiosas como el cajú o el pistacho.

Objetivo: Obtener el aceite esencial de *Schinus areira* y su fracción en terpenos hidrocarburos para determinar sus efectos sobre la actividad cardiovascular y su acción en parámetros histopatológicos, bioquímicos y hematológicos en animales de experimentación.

Materiales y Métodos: a) Se aisló el aceite esencial (AE) del *Schinus areira* por arrastre de vapor de agua y posteriormente a través de cromatografía de capa delgada, su fracción en terpenos hidrocarburos (FH); b) se cuantificó mediante cromatografía de masa la composición química del AE y de la FH; c) se determinó el efecto de ambos compuestos en parámetros histopatológicos, bioquímicos, hematológicos y la actividad cardiovascular en conejos despiertos normotensos con un tratamiento agudo y crónico y d) se evaluó el efecto a dosis crecientes de noradrenalina, el corazón *ex vivo* de ratón, previamente tratado con el AE de *S. areira*.

Resultados y conclusiones: El perfil cromatográfico del AE *S. areira* L. mostró que está compuesto principalmente por monoterpenos hidrocarburos (65,65%). Esta composición es diferente a la mencionada por otros autores. Dicha variación podría atribuirse a la composición del suelo, temperatura ambiente, etc.

Los compuestos sesquiterpenos hidrocarburos obtenidos mediante cromatografía de capa delgada a partir del AE de *S. areira*, mostraron diferentes porcentajes de terpenos.

El β -cariofileno fue el sesquiterpeno bicíclico de mayor porcentaje de los terpenos hidrocarbonados (37.6%) obtenido de la FH.

No hubo modificaciones en tratamiento del AE (300 mg/kg) y FH-I (5 mg/Kg) y FH-II (2.5 mg/kg) en el análisis de los valores hematológicos de la serie roja, mientras que en la serie blanca hubo un incremento de eosinófilos en conejos controles, compatible con los análisis hallados de las muestras de los órganos en la histopatología, tales como edema, infiltrado y congestión pulmonar y en menor medida en riñón e hígado y sin modificaciones histopatológicas en el corazón.

En el tratamiento crónico con el AE de *S. areira* durante 10 días (300 mg/kg), se encontró una disminución en la concentración de L-citrulina y PMN. Si bien este descenso no fue significativo, podría estar indicando que el AE de *S. areira* podría ejercer una modulación sobre mecanismos inflamatorios.

El AE de *S. areira* y la FH-II disminuyeron significativamente la presión arterial sistólica (PAS) mientras que no se detectó ningún efecto sobre la frecuencia cardíaca en conejos despiertos normotensos a los 5-10 y 15 min y luego de 10 días de tratamiento. El AE de *S. areira* (300 mg/kg) produjo un efecto inotrópico negativo en corazón aislado de ratón.

Cuando se evaluaron el efecto de la FH-I, la PAS disminuyó significativamente después del tratamiento en conejos normotensos *in vivo* a los 5, 10, 15 y 30 min. Esta acción hipotensora, se podría correlacionar con el aumento del porcentaje de β -cariofileno atribuido al mecanismo anteriormente descrito.

Está bien establecido que el sistema nervioso parasimpático juega un papel importante en el control de la actividad cardíaca y en la presión arterial (PA), sugerimos que la respuesta hipotensora es probablemente debido a una disminución en la resistencia vascular periférica asociada con una estimulación parasimpática cardíaca (directa y/o indirecta), lo que podría a su vez reducir el gasto cardíaco y en

consecuencia disminuir la PA por mecanismos a corto plazo o a través del sistema renina angiotensina a largo plazo.

Como conclusión final, los resultados de esta tesis señalan que el AE aislado de *Schinus areira* L y su FH podrían participar en los mecanismos moduladores de la inflamación, poseer efectos alergénicos inespecíficos e inducir hipotensión en conejos *in vivo* normotensos y ejercer un efecto inotrópico negativo en ratones *ex vivo* tratados con el AE de *S. areira*.

Por lo anteriormente descrito, son necesarios estudios complementarios para el uso correcto y efectivo del AE de *S. areira* para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tal como es la hipertensión arterial.

Palabras claves: *Schinus areira*, terpenos, presión arterial, cardiovascular

Running title: Hemodynamic effects of essential oils of *S. areira*

ABSTRACT

Introduction: *Schinus areira* L., commonly known as "Aguaribay", "Guaaleguay" or "Molle", belongs to the Anacardiaceae family, where trees, shrubs and vines, fruits and nuts commercially valuable as cashews or pistachios are included.

The research of active compounds present in plants for the treatment of cardiovascular diseases has increased significantly worldwide and because of these trends, many reports have evaluated the effects of various plants and their components in the cardiovascular system in order to provide a scientific basis for therapeutic applications target. The EO of *Schinus areira* and hydrocarbon fraction were obtained to determine their effects on cardiovascular activity and its action on histopathological, biochemical and hematological parameters in experimental animals.

Materials and Methods: a) The essential oil (EO) of *Schinus areira* stripping water and subsequently through thin layer chromatography, the hydrocarbon fraction (HF) were isolated, b) were quantified by chromatography mass chemistry EO and HF, c) the effect of both oils on histopathological, biochemical, hematological and cardiovascular activity in conscious normotensive rabbits d) was determined the effects of increasing doses of noradrenaline were evaluated, the heart ex vivo mouse pretreated EO of *S. areira*.

Results and conclusions: The EO chromatography profile of *S. areira* L. are showed that it is composed mainly of monoterpene hydrocarbons (65.65 %). This composition is different from that mentioned by other authors. This variation could be attributed to soil composition, ambient temperature, etc.

The percentages of hydrocarbon compounds obtained sesquiterpenes thin layer chromatography are different from the same EO obtained therefrom. The β -caryophyllene was bicyclic sesquiterpene larger percentage of the hydrocarbon terpene (37.6 %) obtained from *Schinus areira*. This terpene is present in many EO, such as clove (*Syzygium aromaticum*), marijuana (*Cannabis sativa*), Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and hops (*Humulus lupulus*). It is usually found mixed with isocaryophyllene (isomer cis double bond) and is known for having a cyclobutane ring, which is a rarity in nature. The β -caryophyllene is a food additive and ingested with food daily so it is the first dietary cannabinoid approved by the FDA and is one of the chemicals that contribute to the spiciness of black pepper (*Piper nigrum*).

No change in the analysis of the hematological values of the red series, whereas in the white series, there was an increase of polymorphonuclear neutrophils, lymphocytes and eosinophil's in rabbits treated with EO of *S. areira*, consistent with the analysis of samples found bodies on histopathology, such as edema, pulmonary infiltrates and congestion and to a lesser extent in kidney and liver without histopathological changes in the heart. In evaluating the biochemical values, a decrease in the concentration of L-citrulline in treated rabbits during 10 days with the EO of *S. areira*. Although this decrease was not significant, it could indicate that the EO of *S. areira* could exert a modulation of the enzyme nitric oxide synthase.

The EO of *S. areira* significantly decreased systolic blood pressure (SBP) in normotensive rabbits in vivo, at 5-10 and 15 min and after 10 days of treatment, and produced a negative inotropic effect in isolated mouse heart. It has been described that the cardiovascular activity of EO of *S. areira* could be attributed to the presence of β -caryophyllene, terpene identified as a blocker of Ca^{2+} channels. Channel blockers inhibit Ca^{2+} and Ca^{2+} entry into the cells and produce vascular smooth muscle relaxation, which is a basis for the treatment of hypertension. Despite the reduced influx

of Ca^{2+} in heart cells may be beneficial in certain diseases due to reduced Ca^{2+} loading, which always leads to a negative inotropic effect. When the effect of FH-I evaluated, SBP decreased significantly after treatment *in vivo* in normotensive rabbits at 5, 10, 15 and 30 min. This hypotensive action, it could be correlated with the increased percentage of β -caryophyllene attributed to the mechanism described above.

As a final conclusion, the results of this thesis show that the EO isolated from *Schinus areira* L and FH may have allergenic effects and present nonspecific side effects and induce hypotension in normotensive rabbits *in vivo*, exerting a negative inotropic effect in live mice treated with EO of *S. areira* described

Therefore complementary studies for the proper and effective use of EO of *S. areira* are necessary for treating cardiovascular diseases such as hypertension.

Keys words: *Schinus areira*, terpenes, blood pressure, cardiovascular

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes Históricos

A lo largo de los siglos, la humanidad ha dependido de la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas para la producción de los productos alimenticios, refugios, ropa, medios de transporte, fertilizantes, fragancias y no menos importante para su uso como agente terapéutico. Aunque algunas de las propiedades farmacológicas atribuidas a las plantas han demostrado ser erróneas, el uso de plantas como uso medicinal se basa en hallazgos empíricos de cientos y miles de años (Lawless, 2003; Martínez et al., 2008; Solomon et al., 2013).

Es probable que el profundo conocimiento de las hierbas medicinales en las culturas tradicionales se hayan desarrollado a través de ensayo y error durante muchos siglos y que lo más importante, las curaciones fueron cuidadosamente transmitidos oralmente de una generación a otra (Chrubasik et al., 2001). Los primeros registros escritos en tablillas de arcilla en escritura cuneiforme, son de la Mesopotamia con fecha a partir de alrededor de 2.600 AC, entre las sustancias que se utilizaron fueron los aceites de *Cedrus* especies (cedro) y *Cupressus sempervirens* (ciprés), *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), *Commiphora* (mirra) y *Papaver somniferum* (jugo de amapola), todos los cuales están todavía en uso hoy en día para el tratamiento de dolencias que van desde la tos, los resfriados infecciones y procesos inflamatorios. Medicamentos egipcios informan sobre el uso de hierbas (*Ammi majus*) para el tratamiento del vitíligo (Lawless, 2003; Solomon et al., 2013).

La historia de la farmacia fue durante siglos idénticos con la historia de farmacognosia o el estudio de la materia médica, que se obtiene a partir de fuentes naturales en su mayoría de plantas, pero también de minerales, animales y hongos.

Establecida su importancia, en la década del 1900, en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, se dictaba la asignatura obligatoria para los estudiantes de Medicina, Botánica Médica (Revista UNC, 1915).

El interés en la naturaleza como una fuente de agentes quimioterapéuticos potenciales es constante. Se estima que alrededor del 25 al 30 % del total de los medicamentos disponibles en el mercado tienen un origen natural y en los últimos 40 años, al menos una docena de potentes fármacos se han derivado de las plantas, incluyendo a la *Dioscorea* spp diosgenina, del que se han derivado todos los agentes anticonceptivos anovulatorios, la reserpina y otros tranquilizantes (Solomon et al., 2013) anti-hipertensivos y alcaloides de la especie *Rauwolfia*; pilocarpina para tratar el glaucoma derivado de un grupo de árboles de América del Sur (*Pilocarpus* spp.). La familia del Citrus, dos potentes agentes anti-cáncer de la vinca rosa (*Catharanthus roseus*); agentes laxantes derivados de la *Cassia* sp. (Clardy y Walsh 2004; Koehn, 2008; Koehn y Carter, 2005). Más recientemente, un fármaco (β -metoxipsoraleno) se ha producido a partir de esta planta para tratar la psoriasis y otros trastornos de la piel, así como linfoma de células T (Singh et al., 2010).

1.2. Impacto Socio-Económico

Desde el punto de vista del impacto económico, en términos globales, se estima que cada año la comunidad del mundo gasta alrededor de US\$ 12 billones en fitomedicinas (remedios basados en plantas en forma de té de hierbas, extractos, aceites y cápsulas). Los productos más vendidos son sedantes, tónicos y tratamientos para desórdenes cardiovasculares, respiratorios y digestivos. El mercado internacional de los aceites esenciales (AE) es de alrededor de 1.300 millones de dólares anuales, siendo los mayores exportadores Estados Unidos, Francia, Reino Unido, Brasil, China y Argentina (Korocho et al., 2007). En menor magnitud, los AE se utilizan en: a) Industria Química,

como lubricantes para maquinaria, disolventes biodegradables, bases para pesticidas, aromatizantes de pinturas y plásticos; b) Industria Alimenticia, como conservantes naturales, en la producción de confitería, licores, productos lácteos y carnes; c) Industria Cosmética, para la preparación de perfumes, aguas de colonia, cremas, jabones, champús, talcos, entre otros, d) Industria Tabacalera, como aromatizante de sus productos y, f) Industria Farmacológica, para enmascarar los sabores de los medicamentos (Biocomercio Sostenible, 2003).

1.3. Las Plantas Medicinales

Aunque descubierto a través de la observación casual de laboratorio, tres de los mayores fuentes de medicamentos contra el cáncer en el mercado o que completen los ensayos clínicos han sido derivados de las plantas de América del Norte que se usan medicinalmente por los americanos nativos: la Papaw (*Asimina* spp), el Tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), eficaz contra cáncer de ovario y la Mayapple (*Podophyllum peltatum*) utilizados para combatir leucemia, linfoma y el cáncer testicular (Chin et. al., 2006).

La gran mayoría de personas en este planeta todavía dependen de sus medicamentos tradicionales (plantas medicinales y otros materiales) para sus necesidades de atención médica de todos los días. También es un hecho que una cuarta parte de todas las recetas médicas se basan formulaciones sobre las sustancias derivadas de plantas o análogos sintéticos derivados de las plantas y de acuerdo la OMS, el 80% de la población mundial, sobre todo los de los países en desarrollo, se basan en medicamentos derivados de plantas para su atención médica (Bigliani et al., 2010; Mwangi et al., 2010; World Health Organization, 2007).

En la actualidad, el uso comercial de medicamentos tradicionales a base de plantas ha aumentado, llevando preocupación por la falta de evidencia científica sobre la

eficacia y seguridad de los productos a base de plantas, aunque algunos han sido verificados por los ensayos clínicos (Seeff, 2007; Tang et al., 2008).

La medicina alopática moderna tiene sus raíces en la medicina antigua, y es probable que muchos de los nuevos remedios importantes sean descubiertos y comercializados en el futuro, como lo ha sido hasta ahora, siguiendo las pistas proporcionadas por el conocimiento tradicional y experiencias previas (Bhat y Jacobs, 1995). En algunos países, el uso de las plantas medicinales se asocia a menudo con la brujería y la superstición, porque la gente no tenía el conocimiento científico para explicar y predecir la acción curativa de las plantas (Gurib-Fakim et al., 2006). Un ejemplo se basa en que las plantas pueden dar pistas sobre sus propiedades medicinales. El extracto de color rojo (obtenido de las flores) y la savia obtenidos de las plantas, por ejemplo, se asocian con la sangre menstrual y alimento, las flores de color amarillo con la bilis y la ictericia, la forma de ciertas raíces con la forma femenina de la fertilidad y así sucesivamente. A veces este concepto funcionó: *Chelidonium majus*, contiene flores amarillas y un alcaloide amarilla que contiene látex, y ha sido utilizado con éxito para tratar la ictericia (Novais et al., 2004).

Las plantas medicinales contienen típicamente mezclas de diferentes compuestos químicos que puede actuar de forma individual, de forma aditiva o sinérgicamente para mejorar la salud. Hoy se acepta que las plantas medicinales de uso tradicional contienen compuestos con potencial terapéutico. Dado estas razones, existe un creciente interés por la identificación de especies vegetales con propiedades terapéuticas y preventivas. Una sola planta, por ejemplo, puede contener *sustancias amargas* que estimulan la digestión y otros compuestos que reduzcan un hematoma y el dolor. *Compuestos fenólicos* que pueden actuar como antioxidantes, venotónicos, antibacteriano y anti-fúngico; *taninos* que actúan como antibióticos, *sustancias diuréticas* que mejoran la

eliminación de productos de desecho y las toxinas y *sustancias con alcaloides* que mejoran el estado de ánimo y dan una sensación de bienestar (Calixto, 2005; Gilani, 2005; Gonzalez-Muñoz et al., 2013; Perez y Anesin 1994; Yáñez, et al., 2011).

Es de amplio conocimiento que las plantas han jugado un papel fundamental en el tratamiento y la prevención de enfermedades a lo largo de la historia de la civilización humana. Propiedades anti-hipertensivas, anti-inflamatorias, anti-fúngicas, anti-virales, anti-bacterianas, antioxidantes, analgésicas, insecticidas, entre otras; se les han atribuido a un gran número de especies vegetales (Esquivel-Gutiérrez et al., 2013; Fernandes et al., 2007; Fernández et al., 2013; Light et al., 2005; Saika et al., 2006).

Durante su evolución, las plantas han desarrollado un sistema químico de defensa, con el fin de combatir el estrés del medio ambiente utilizando sus *metabolitos secundarios*. Estos metabolitos son una gran variedad de compuestos orgánicos que no están directamente involucrados en los procesos metabólicos de crecimiento y desarrollo, sino que son de gran importancia para la adaptación al medio ambiente en continuo cambio y proporcionan ventajas reproductivas tales como ser atractivos para los polinizadores y dispersores de semillas (Korkina, 2007). Hay tres grandes categorías de *metabolitos secundarios* de plantas como productos naturales: terpenos y terpenoides (25.000 variedades) alcaloides (12.000 variedades) y los compuestos fenólicos (8.000 variedades) (Ahad et al., 2011; Grassmann, 2005; Wagner et al., 2003).

1.4. Los aceites esenciales

De todos los productos químicos sintetizados, los que han contribuido significativamente al desarrollo de nuevos compuestos son los aceites esenciales (AE). Estas sustancias volátiles se encuentran comúnmente en las plantas aromáticas y su

potencial terapéutico ha sido evaluado últimamente (da Silva et al., 2013; Deng et al., 2009; Zygadlo, 2000).

Los AE están ampliamente extendidos en la naturaleza y son un componente importante de las resinas de las plantas, constituyendo uno de los grupos más amplios de fitonutrientes (Wang et al., 2005, 2009; Zunino et al., 2003). Los AE son líquidos oleosos muy aromáticos, productos del metabolismo secundario de diferentes especies vegetales. Generalmente, presentan un color ligeramente amarillo, con densidades menores a la del agua pero con mayor viscosidad que esta, con índices de refracción elevados y presentan degradación química en presencia de luz solar, aire, calor, ácidos y álcalis fuertes (Castañeda et al., 2007). Se componen de mezclas de compuestos volátiles en su gran mayoría hidrocarburos tipo terpenos, y sus derivados oxigenados; los cuales son responsables del aroma característico del aceite (Stashenko et al., 2003).

De todos los productos químicos sintetizados por las plantas, los terpenos han contribuido significativamente al desarrollo de nuevos compuestos. Después de la modificación química de los terpenos, los compuestos resultantes se conocen como terpenoides y son la clase más grande y generalizada de metabolitos secundarios que provienen de los productos naturales. Los terpenos están ampliamente extendidos en la naturaleza y son producidos por una gran variedad de plantas, algunos animales (insectos y organismos marinos) y microorganismos. (Tholl, 2006; Figura 1).

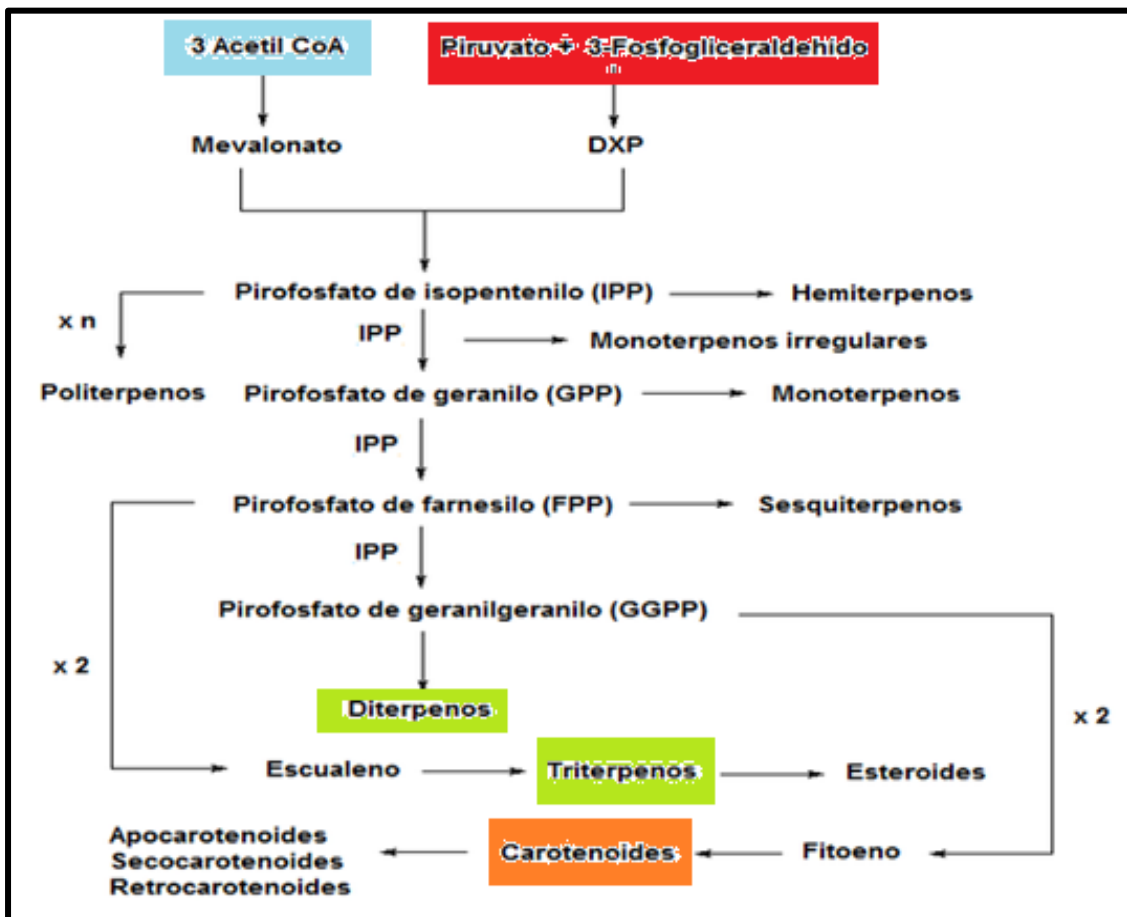


Figura 1: Resumen biosintético de los terpenos (Tholl, 2006)

Son abundantes en frutas, cereales, verduras y flores, en musgos, algas y líquenes y son un componente importante de las resinas de las plantas, constituyendo uno de los grupos más amplios de fitonutrientes (Phillips et al., 2006; Zunino et al., 2003, 2005). Los AE se pueden extraer de distintas partes de la plantas según la especie, como son: flores, hojas, tallos, semillas, cortezas, frutos, raíces, resina y madera (Burt, 2004). A estos, se les han atribuido diferentes funciones en las plantas como son: agentes antimicrobianos, insecticidas, defensa contra los herbívoros; y en algunas especies, como sustancias que atraen los polinizadores a las flores (Bakkali et al., 2008; Chirino et al., 2001; Dordevic et al., 2011).

Los terpenos, cuya función es la de proteger a las plantas contra la acción depredadora de insectos y parásitos, son componentes de las esencias volátiles de las

flores y son parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, en los que ellos forman parte de hasta el 5% en peso de la planta seca y dependen del número de estructuras de isopreno. Son llamados así porque fueron los primeros terpenos aislados del aguarrás en el año 1850 y considerados la unidad base a partir de la cual se hizo el resto de la nomenclatura y se pueden clasificar como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos, y politerpenos; los monoterpenos constan por ej. de 2 unidades de isopreno (10 carbonos).

Los monoterpenos se pueden dividir en tres subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (α -terpineol y terpinoleno) y bicíclicos (α -pineno, tuyona, alcanfor, fenchona). En cada uno de estos subgrupos, hay otras clasificaciones: hidrocarburos insaturados (limoneno), alcoholes (mentolados), aldehídos y cetonas (mirtenal, carvona), lactonas; iridoides (ex. nepetalactona) y tropolonas (γ -thujaplicin) (Bakkali et al., 2008; Sangwan et al., 2001).

Los terpenoides son estructuras cíclicas o acíclicas presentes que resultan de cambios de las reacciones en cadena de los isoprenoides, como son las reducciones, oxidaciones, ciclaciones (que implican la formación de carbocationes), cuando el anillo se rompe, o se producen reordenamientos. Debido a esto, los terpenoides son los más numerosos y estructuralmente diversos productos naturales de las plantas (Zwenger y Basu, 2008).

Además están directamente implicados en la estabilización de las membranas celulares y son reguladores de la permeabilidad celular y la actividad enzimática. En el cuerpo humano actúan como antioxidantes protegiendo los lípidos, la sangre y demás fluidos corporales del ataque de radicales libres de especies de oxígeno, como el oxígeno singlete y radicales hidroxilo, peróxido y superóxido (Wang et al., 2005). Por otra parte, las altas concentraciones de terpenos pueden ser tóxicas y por tanto son un arma importante contra herbívoros y patógenos (Ordóñez et al., 2011).

Los AE no son exclusivos de un grupo de plantas. Por el contrario, estos se pueden encontrar en una gran número de familias vegetales emparentadas o no entre sí; aunque las familias Mirtaceae, Laureaceae, Rutaceae, Labiatae, Compositae, Umbelliferae, Pinaceae, Poaceae, Verbenácea, Zingiberaceae y Piperaceae, sobresalen por la amplia presencia de estos aceites (Bakkali et al., 2008).

1.5. *Schinus areira* L. (Aguaribay)



Figura 2: Fotografía obtenida por Rossetti VL de hojas y fruto del *Schinus areira* de la Ciudad de Córdoba, Argentina

Schinus areira L., pertenece a la familia Anacardiaceae. Este árbol cuyo nombre tradicional es conocido en nuestro país como "aguaribay", "molle" o falso pimentero es una especie nativa de América del Sur (Kramer, 1957; Zunino et al., 2003) (Figura 2). Presenta una importante acción biológica y la planta se ha utilizado en la medicina tradicional en las regiones donde se pueden encontrar. En Perú, la infusión y decocción de las hojas se utiliza como digestivo y en las heridas. La

oleorresina se utiliza para calmar el dolor de muelas. En Argentina y Uruguay, el té de hoja se utiliza para tratar trastornos menstruales y en las infecciones respiratorias y urinarias. En Chile, el té de corteza se toma como estimulante, antidepresivo, astringente y anti-reumático. En México, sus hojas se emplean como diurético y en enfermedades de los ojos. En Brasil, se utiliza en casos de bronquitis, tos, fiebre y la gripe (Alonso, 2004; Mendelson y Balick et al., 1995). En los últimos años, se han realizado estudios con esta planta encontrándose efectos biológicos tales como: repelente (Guardiola et al., 1990), antibacteriano, antiviral, diurético antiséptico (Duke,

1985), hipotensión (Bello et al., 1998), antitumoral (Ruffa et al., 2002), analgésico (Barrachina et al., 1997), antioxidante (Guala et al., 2009) y anti-inflamatorios (Yuequin et al., 2003). Otro estudio más reciente demostró que las hojas de esta planta produce un efecto antidepresivo (Machado et al., 2007, 2008). Ferrero et al., (2007) observaron que la exposición aguda y subaguda de los extractos etanólicos de las frutas de *Schinus molle* var. *areira* en ratas no produjo toxicidad en ninguno de los animales evaluados.

Otros trabajos demostraron que *Schinus areira* posee la propiedad de inhibir la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Olafsson et al., 1997), de acción hipotensiva (Bello et al., 1998) y antiinflamatorio, entre otras (Bigliani et al., 2010; Davicino et al., 2010; Yuequin et al., 2003). Durante muchos años, la ECA ha sido reconocida como la clave en la regulación del sistema renina-angiotensina (SRA). El principal lugar de expresión de la ECA y de la generación de angiotensina II (Ang II) sistémica ocurre principalmente en el pulmón (Bernstein y Berk, 1993).

1.6. Fisiología de la Presión Arterial

La presión arterial (PA) está regulada por tres variables que se interrelacionan: el gradiente de presión (ΔP), el caudal o flujo de sangre (Q) y la resistencia vascular periférica (RVP) (Duhau et al., 2000). El *gradiente de presión* o presión de perfusión es la PA menos la presión venosa (en un vaso individual es la diferencia entre dos puntos particulares del mismo). *La resistencia vascular periférica* (RVP) al flujo en un vaso sanguíneo y de acuerdo a la ecuación de Poiseuille está determinada por tres factores: a) el largo del vaso (L); b) el radio de la luz del vaso elevado a la cuarta potencia (r^4) y c) la viscosidad de la sangre (η) ($R = 8 \eta \times L / \pi r^4$). De ellos el radio es el más importante, teniendo en cuenta que se considera su dimensión pero elevada a la cuarta potencia; así una disminución del radio a la mitad de su valor original implica un aumento de dieciséis veces de la resistencia. Un vaso sanguíneo con el doble de longitud pero

idéntico radio tendrá el doble de resistencia. La viscosidad (η) puede variar significativamente cuando existan cambios en el hematocrito: si el hematocrito normal del 40% es llevado al 60%, el valor de la viscosidad llegará a más o menos el doble; también la disminución de la velocidad del flujo provoca aumento de la viscosidad en varias veces.

El *caudal Q* es directamente proporcional al gradiente de presión multiplicado por el radio del vaso elevado a la cuarta potencia, e inversamente proporcional al largo del vaso y a la viscosidad.

La contracción periódica de los ventrículos produce una presión que, del lado arterial, oscila entre un valor máximo (sistólico) y mínimo (diastólico), siendo la diferencia entre ambos valores la presión del pulso (PP) o diferencial. Los gradientes de presión se infieren por medio de un valor estable representativo, denominado presión arterial media (PAM), que en el adulto normal es ~ 95 mm de Hg. No debe considerarse a la PAM como el promedio entre presión arterial sistólica y presión arterial diastólica; es la integración de la onda pulsátil de la PA y representa la interacción de volumen minuto cardíaco (VMC) y la RVP en el ciclo cardíaco. Clínicamente se la estima como la presión diastólica más un tercio de la PP, aunque en altas frecuencias cardíacas se aproxima más al promedio aritmético de las presiones sistólica y diastólica. La PAM está determinada por el volumen minuto cardíaco (VMC), la RVP y la presión venosa central (PVC), o sea $PAM = (VMC \times RVP) + PVC$. Esas variables están sujetas a cambios constantes y se influyen recíprocamente: por ejemplo el aumento de RVP por vasoconstricción arteriolar producirá, al aumentar la postcarga ventricular, disminución de la contractilidad (disminuye el acortamiento) y por ende del VMC y concomitantemente aumento de la PAM. Es que la PAM se relaciona estrechamente con la RVP (Duhau et al., 2000).

La RVP está regulada por el tono muscular de las arteriolas. Es necesario recordar que cuando en un mismo vaso aparecen estrecheces sucesivas se generaran sendas resistencias, resultando la resistencia total de ese vaso la suma total de ellas. Pero la resistencia total de una red de vasos ubicados en forma paralela es menor que la resistencia de aquel vaso que aisladamente presente la menor resistencia. Si la red consta de muchas arterias, al cambiar la resistencia de un número reducido de las mismas no se observarán modificaciones mayores de la resistencia total. También hay que saber qué cambios en la resistencia de las grandes arterias tienen pocos efectos sobre la resistencia total mientras que esta es importantemente afectada por cambios en la resistencia arteriolar.

La RVP se incrementa cuando hay vasoconstricción generalizada, mientras que disminuye cuando se produce vasodilatación; o sea que la RVP se vincula primariamente a cambios en el diámetro de la luz vascular, aunque cambios en la viscosidad sanguínea pueden a su vez alterar la resistencia. La RVP normal es 900 a 1.400 dinas.seg.cm⁻⁵. Hay que tener en cuenta además que los vasos sanguíneos están tapizados interiormente por endotelio, el cual como se verá más adelante es productor de metabolitos vasodilatadores y vasoconstrictores. Muchos de ellos son liberados como consecuencia del “shear-stress” producido en la célula endotelial por el aumento de flujo sanguíneo. De esta forma, por ejemplo, un aumento del caudal Q en un territorio vascular podría llevar a la liberación de óxido nítrico, el cual por su efecto vasodilatador llevaría a un valor de resistencia (R) que sería inferior al calculado matemáticamente a partir de la relación $R = P/Q$ (Leiva et al., 2000).

La regulación del tono muscular arteriolar es mediado en el *corto plazo* por mecanismos extrínsecos e intrínsecos: Los mecanismos extrínsecos son: 1) la regulación nerviosa (simpática, parasimpática); 2) la humoral y 3) la hormonal.

Los factores intrínsecos son autocrinos, paracrinos e intracrinos, tales como los derivados del endotelio y del metabolismo celular; entre ellos debe también tenerse en cuenta a la autorregulación, denominado “reflejo miogénico”.

En la *regulación a largo plazo* se produce regulación neurohumoral, además del tono vascular del volumen sanguíneo y de factores renales, participando en ese momento activamente el SRA.

1.7. La enfermedad cardiovascular

La enfermedad cardiovascular es una de las principales causas de muerte en los países desarrollados y en desarrollo (Anderson et al., 2013; American Heart Association, 2008; Sociedade Brasileira de Cardiología, 2007) causando un gran impacto no sólo en la salud humana, sino también en áreas sociales y económicas (Lefkowitz y Willerson, 2001).

La hipertensión es una de las enfermedades cardiovasculares más comunes y se extiende rápidamente. Es causa importante de morbilidad y mortalidad en la humanidad y un factor de riesgo importante para el desarrollo de otras enfermedades cardiovasculares (Mac Mahon et al., 1990). La base fisiopatológicas para más de 90 por ciento de la enfermedad sigue siendo inexplicable, y por lo tanto, la afección se denomina hipertensión primaria o esencial (Campana et al., 2009).

La heredabilidad de la hipertensión esencial se estima que alrededor del 30%. Entre 5-10 por ciento puede ser debido a una serie de causas conocidas, tales como la estenosis de la arteria renal, la coartación aórtica, el Síndrome de Cushing, el feocromocitoma, llamado hipertensión secundaria (Di-Palma, 1990). La hipertensión es una afección grave que a menudo es asintomática. Con el tiempo, conduce a una variedad de problemas de salud incluyendo enfermedad prematura, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedad

vascular periférica, retinopatía, demencia, disfunción renal, daño cerebrovascular, discapacidad y muerte en la población adulta (Flack et al., 2003).

La morbilidad y la mortalidad relacionada con la hipertensión están directamente relacionadas con el nivel de la PA. La incidencia de la morbilidad y la mortalidad disminuye significativamente cuando la hipertensión se diagnostica y se trata adecuadamente, mientras que la hipertensión no tratada es conocido como el “asesino silencioso”. El riesgo de desarrollar una complicación cardiovascular es más alta cuando el individuo combina la hipertensión con otros factores de riesgo, como la hipercolesterolemia, la diabetes y una historia familiar de enfermedades cardiovasculares (Mancia et al., 2004). La terapia convencional para la hipertensión no es siempre segura, eficaz y gran parte de la población mundial busca medidas terapéuticas complementarias (Ghayur y Janssen, 2010; Khayyal et al., 2002; Kitic et al., 2012). En un intento de reducir este efecto, varios grupos de investigación en las últimas décadas han trabajado intensamente para buscar avances en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, entre ellos el descubrimiento de nuevas terapias (Lefkowitz y Willerson, 2001; Joukar et al., 2013; Moreira et al., 2010; Munglue et al., 2013).

En la última década, el óxido nítrico (ON) ha cobrado relevancia por la participación en varios procesos fisiológicos. Se sintetiza mediante la conversión del aminoácido L-arginina a L-citrulina, siendo un subproducto de esta reacción el ON. El ON es una molécula de señalización de los tejidos en los seres vivos, participando en procesos patológicos y en el mantenimiento de la homeostasis: relajación del músculo liso, lisis de células tumorales, destrucción de microorganismos (Vokurka et al., 2013). El ON reacciona rápidamente con el O₂ y forma peroxinitrito (ONOO⁻) que es una especie muy reactiva (Schellekens et al., 1998).

Esta reacción es catalizada por un sistema enzimático denominado óxido nítrico sintasa, con las isoformas inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). La L-citrulina se forma estequiométricamente con el ON siendo este compuesto más accesible de medir (Serrano et al., 2010). Lagerwerf et al., (1998) demostraron que la determinación de L-citrulina obtenido del plasma es una herramienta útil para la evaluación *in vivo* de la producción del ON.

Los estudios en animales han demostrado propiedades beneficiosas de los AE en el sistema cardiovascular, tales como antitrombótico, antiagregante plaquetario, actividades protección endoteliales, vasodilatadores hipotensor (Lahlou et al., 2005; Shiina et al., 2008). Los informes recientes han demostrado que los efectos cardiovasculares de los AE también se observan en los seres humanos tales como la mejora en el flujo coronario (Shiina et al., 2008), los efectos hipotensores y bradicardia (Santos et al., 2013). Han demostrado además que los terpenos poseen propiedades farmacológicas tales como antifúngico, antibacteriano, antioxidantes, anticancerígenas, antiespasmódico, hipotensivos (Lima et al., 2012; Lima et al., 2010; Menezes et al., 2010; Singh et al., 2010).

En base a lo descripto anteriormente y conociendo que los terpenos son los principales constituyentes de varios AE de las plantas aromáticas medicinales, en conjunto con las observaciones descriptas anteriormente, se postula la siguiente hipótesis:

2. HIPÓTESIS

La actividad biológica del aceite esencial de *Schinus areira* L. disminuye la presión arterial y no produce alteraciones en los parámetros morfométricos y/o estructurales valorados por marcadores histopatológicos y bioquímicos en animales de experimentación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Obtener el aceite esencial de *Schinus areira*, la fracción en terpenos hidrocarburos y determinar la actividad cardiovascular y su acción en parámetros histopatológicos, bioquímicos y hematológicos en animales de experimentación.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Obtener el AE a partir de hojas de *S. areira*.

3.2.2 Identificar y cuantificar los terpenos presentes en el AE de *S. areira*.

3.2.3 Separar la fracción mayoritaria del AE (terpenos hidrocarbonados).

3.2.4 Detectar a nivel cardiovascular los posibles efectos hipotensores de la administración intravenosa (i.v.) del AE y la fracción de hidrocarburos obtenidos del AE de *S. areira* en un modelo experimental de conejos.

3.2.5 Se evaluará el efecto de la administración iv. de la fracción seleccionada y del AE de *S. areira* mediante técnicas histopatológicas y bioquímicas, y se cuantificarán para cada tratamiento los siguientes parámetros:

a) Valoración clínica (evaluación de conducta, ambulación, alopecia, piloerección, etc.) alimentación y defecación.

b) Detectar en plasma las: células eritrocitarias, leucocitarias totales: neutrófilos polimorfonucleares (PMN), linfocitos, eosinófilos, basófilos y monocitos.

c) Valores bioquímicos en plasma y suero: proteínas totales, albumina, uremia, creatina, GPT, FAL y L-citrulina.

d) Detectar en hígado, pulmón, riñón y corazón, la estructura histopatológica.

3.2.6 Evaluar la contractilidad miocárdica y la respuesta a concentraciones crecientes de noradrenalina en corazón *ex vivo* luego de la administración de la fracción del AE de *S. areira* en ratones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal

La especie *S. areira* (Anacardiaceae) fue recolectada en la localidad de Mendiolaza, Córdoba, en el mes de octubre de 2009 por la Dra. M. Paula Zunino. Un ejemplar de la misma (M.P. Zunino sn. COR 1341) fue depositado en el Museo Botánico de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba.

El procedimiento de obtención, identificación y cuantificación del material vegetal, fue realizado en colaboración con la Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.

4.2. Obtención del AE de *Schinus areira*

El material vegetal se dejó secar a la sombra. Posteriormente las hojas fueron guardadas en oscuridad y trituradas antes de la extracción de su aceite esencial. El AE del material vegetal fue obtenido por destilación por arrastre con vapor de agua durante 30 minutos en un equipo tipo Clevenger modificado y extraído del agua de destilación con hexano y luego secado con sulfato de sodio anhidro. El solvente fue removido usando un evaporador rotatorio y los aceites obtenidos se almacenaron a -18°C hasta su uso (Zunino et al., 1997). La destilación se llevó a cabo a una temperatura constante de 95°C para el agua en ebullición, mientras que los vapores obtenidos se mantuvieron a 92°C. La temperatura del agua de enfriamiento máxima fue de 6°C.

4.3. Identificación y cuantificación de los terpenos del AE de *Schinus areira*

Para la cuantificación de los terpenos se realizó un análisis por cromatografía gas-líquido-espectrometría de masas (GC-MS) empleando un equipo Perkin Elmer Q600 equipado con detector de ionización de llama, con una columna capilar Elite-wax

(Crossband-PEG) (60 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm df). La temperatura de la columna se programó de 60° a 240° C, con un incremento de 5° C/min. Se mantuvo durante 5 min al inicio y cuando llegó a 240 °C se mantuvo 10 min. La temperatura del inyector fue de 280 °C y el flujo de helio fue de 1 ml/min. La interpretación de los espectros de masas se realizó utilizando una biblioteca NIST y por comparación con espectros similares tomados de bibliografía (Adams, 2001, 2007; Zunino et al., 1997).

4.4. Obtención de la Fracción Hidrocarbonada por cromatografía en capa delgada del AE de *Schinus areira*

Una alícuota del AE de *Schinus areira* se diluyó en diclorometano para el análisis cromatográfico por capa delgada. Se utilizó una placa de vidrio de 20 x 20 cm sobre cuya superficie se depositó una capa uniforme muy delgada (0.5 mm) del adsorbente sílica gel (Silicagel Merk 0,063-0,200 mm; 70-230 MESH), en condiciones tales que resultó uniformemente extendida y suficientemente adherida. Se hizo una masa acuosa con el adsorbente (6 g/12ml de agua destilada por placa) que se depositó sobre la placa mediante un extensor. Las placas se secaron en estufa para activar la superficie del adsorbente y así efectuar la cromatografía. Las fracciones del AE (hidrocarbonada y oxigenada) fueron separadas utilizando n-hexano como solvente (fase móvil). Se utilizó limoneno y mentol como compuestos patrones de las fracciones hidrocarbonada y oxigenada, respectivamente. El revelado de las fracciones cromatográficas fue realizado utilizando vapores de yodo. Las muestras obtenidas fueron separadas en dos concentraciones: Fracción hidrocarbonada I: 5 mg/kg y Fracción hidrocarbonada II: 2.5 mg/kg.

4.5. Animales

Se utilizaron conejos (*Oryctolagus cuniculus*) machos y hembras adultos para la medición de la presión arterial, obtenidos de un criadero de la Ciudad de Córdoba,

mantenidos en un bioterio en condiciones de temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y ventilación constante, con un ciclo de luz - oscuridad (14/10 hs) y de acuerdo a la necesidad experimental, los animales fueron sacrificados en una cámara de CO_2 (75%) de acuerdo a las especificaciones de la Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH publicación N° 85-23, revisado en 1985).

Para la determinación de la contractilidad cardíaca, se utilizaron ratones machos de 3 a 4 meses (30-45 gr) de la cepa Albino Swiss, mantenidos en un bioterio en condiciones de temperatura y humedad controladas de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a 40-70%, y ventilación constante. Ciclo de luz-oscuridad (14/10 hs).

4.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Grupos Muestrales: Se realizó el siguiente esquema de dosis, administración y tratamiento. El tamaño de la muestra por grupo y por experimento fue de 10 conejos despiertos normotensos cada uno.

4.6.1. GRUPO I (Basal)

- Conejos despiertos normotensos: previo a la administración de los tratamientos se extrajeron muestras de sangre (plasma y suero) de los animales para la evaluación de los parámetros bioquímicos y se determinó los parámetros hemodinámicos basales (Pretratamiento).

4.6.2. GRUPO II (Tratamientos)

4.6.2.1. Tratamiento Agudo

- Conejos despiertos normotensos: mediante administración del AE de *S. areira* de 300 mg/kg (AE-300, i.v.) se evaluaron los parámetros hemodinámicos durante 5, 10, 15 y 30 min (Postratamiento).

- Conejos despiertos normotensos: mediante administración de una dosis aguda de la fracción hidrocarbonada de 5 mg/kg (FH-I; i.v.) se evaluaron los parámetros hemodinámicos durante 5, 10, 15 y 30 min (Postratamiento).
- Conejos despiertos normotensos: mediante administración de una dosis aguda de la fracción hidrocarbonada de 2.5 mg/kg (FH-II; i.v.) se evaluaron los parámetros hemodinámicos durante 5, 10, 15 y 30 min (Postratamiento).

4.6.2.2. Tratamiento Crónico

- Conejos despiertos normotensos: mediante administración de una administración crónica durante 10 días con una dosis cada 12hs de AE de 300 mg/kg (AE10-300) y se evaluaron los parámetros hemodinámicos durante 5, 10, 15 y 30 min posterior al tratamiento.

4.6.3. GRUPO III

- Se determinó la contractilidad cardíaca de ratones *ex vivo* luego de 3hs posterior a la administración del AE de *Schinus areira* (300 mg/Kg de peso corporal; i.p.). Se utilizaron entre 10 ratones para este grupo.

4.7. La observación clínica y el consumo de alimento e hidratación

En conejos despiertos normotensos, se observaron diariamente durante la administración del AE de *Schinus areira* para detectar signos de toxicidad y mortalidad en todo el periodo experimental de la dosis crónica (AE10-300).

Se evaluaron signos clínicos, como cambios en la piel, el pelo, ojos y las membranas mucosas, el estiércol y en los patrones fisiológicos y de comportamiento (grooming, reflejos posturales, etc.).

El peso corporal se midió en el tratamiento crónico al inicio y al final. Las cantidades de alimentos y agua se evaluaron objetivamente diariamente antes de que se suministrara a cada animal en cada jaula.

4.8. Medición de la presión arterial en conejos despiertos normotensos

Se utilizaron conejos despiertos y normotensos para evitar la acción de cirugías, anestias y sus posibles interacciones con la regulación de la PA (Mutolo et al., 2013). Entre los animales de laboratorio de uso habitual, el conejo es uno de los más voluminosos. Se lo sujeta tomándolo por el pliegue de piel del cuello y del tórax, casi a la altura de la cruz de la columna cervical y detrás de las orejas, rodeando el abdomen con la mano libre, evitando así las acciones defensivas con las patas. El mayor riesgo en el caso de este animal es el de los posibles rasguños con las uñas de las patas traseras.

El conejo presenta dos vasos accesibles en sus orejas que facilitan notablemente la



operación con muestras sanguíneas y para la determinación de la PA. La oreja del conejo tiene una arteria central y una arteria auricular, rama de la maxilar y de la carótida y una vena marginal.

Sin restricción en los conejos y con personal

Figura 3: Monitor de registro entrenado, las agujas se conectaron de forma multiparamétrica (Feas)

continua a la arteria de la oreja y a un transductor de presión Multipar Feas SA, No.

36851, Argentina (Figura 3) y se evaluó el efecto de los AE en los siguientes parámetros hemodinámicos: presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD), presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca.

Mediante la técnica de presión invasiva y después que los parámetros hemodinámicos se estabilizaron, se registraron durante 45 a 50 minutos, denominados estos como los valores basales (Pre-tratamiento) y posteriormente se le administró por vía endovenosa el AE o la FH de *S. areira* (Post-tratamiento), mientras que únicamente se administró por vía oral para AE10-300. Los animales fueron monitoreados durante todos los ensayos (Bobrovskaya et al., 2013; Redfors, Shao, and Omerovic, 2014).

Para verificar que el método utilizado para detectar variaciones en la PA en conejos despiertos normotensos es el correcto, se utilizó como control positivo, a la droga antihipertensiva de uso humano, nifedipina, una sola dosis de 10 mg (Adalat retard, Bayer Argentina).

4.9. Determinaciones Hematológicas, Bioquímicas e Histopatológicas en conejos despiertos normotensos y tratados con el AE de *Schinus areira*

Las muestras de sangre fueron obtenidas de todos los animales antes del tratamiento y posterior al tratamiento con el AE de *S. areira* y las fracciones hidrocarbonadas. Las muestras de sangre se recogieron en dos tubos: (1) tubos heparinizados y (2) tubos para centrifugar no heparinizados.

La sangre heparinizada se utilizó para la determinación hematológica. La sangre no heparinizada se dejó coagular antes de ser centrifugada y se separó el suero. El suero se analizó para cambios bioquímicos usando un analizador bioquímico automático standart (Metrolab 330). Se midieron todos los parámetros siguiendo los protocolos de los kits.

Una vez que se extrajeron muestras se cuantificaron los siguientes parámetros:

- 4.9.1. Fórmula blanca y roja en plasma y se determinó: recuento celular de eritrocitos, el hematocrito y células blancas (leucocitos: neutrófilos, macrófagos, linfocitos y monocitos).
- 4.9.2. En plasma y suero se analizó urea, creatinina, proteínas totales, albúmina, GPT y FAL.
- 4.9.3. En plasma se analizó L-citrulina: El ensayo se realizó basado según el método de Ogura y col. (1994) con modificaciones de Marini et al., (2004).
- 4.9.4. Todos los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche antes de necropsias programadas. A la necropsia completa se llevó a cabo en todos los animales y consistió en un examen externo y un examen detallado interno.

Después de la disección para extraer el tejido adiposo y conectivo, los siguientes órganos fueron cuidadosamente disecados y fijados al 10 % en formal neutro: pulmones, riñones, hígado y corazón.

Los órganos fijos del grupo de control del vehículo y de tratamiento fueron sometidos a un examen histopatológico y procesados de la siguiente manera: Los Pulmones: ambos pulmones fueron cortados longitudinalmente y se obtuvieron 1 ó 2 secciones de cada animal; hígado y corazón: se realizaron cortes longitudinales y se obtuvieron 1 ó 2 secciones por cada animal; riñones: cada uno se cortó transversalmente y otro longitudinalmente y se obtuvieron 2 secciones por cada animal. Una vez realizados los cortes fueron fijados en formol neutro al 10% se embebieron en parafina. Se realizaron secciones seriadas de 3 a 4 μ m y se colorearon usando una técnica de Hematoxilina–Eosina para la observación de los cortes histológicos se usó un microscopio de luz Olympus BH2-DO.

El procedimiento histológico fue realizado en colaboración con la Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

4.10. Contractilidad miocárdica en corazón de ratón *ex vivo* tratados con el AE de *Schinus areira*

Para determinar la contractilidad cardíaca se utilizó la dosis de 300 mg/Kg de peso corporal, i.p., administrada 3hs antes de la extracción de los ventrículos de los animales del grupo en estudio, colocados posteriormente en una cámara de vidrio conteniendo medio de Krebs Ringer Bicarbonato gaseado con 95% O₂ y 5% CO₂ (32° C, pH 7,4) y fueron unidos a un transductor de fuerza (Statam Universal Cell). Una tensión de reposo de 7,5 mN fue aplicada. Antes de comenzar las mediciones, los corazones se dejaron equilibrar en este medio por 30 min sin ser estimulados, seguidos por 30 min en los que un estimulador otorgó estímulos de 15 V a una frecuencia de 30 pulsos/min y 12 msec cada uno. Al término de estos 30 min se comenzó con las mediciones. Durante todo el periodo del experimento, el medio se cambió cada 15 min. La información fue amplificada y transferida a una PC. El efecto de noradrenalina (0.01 – 10 µM) fue estudiado por medio de curvas dosis-respuestas. Este efecto se consideró como la diferencia entre la contractilidad basal y la respuesta alcanzada en presencia de la droga (Lo Presti et al., 2010).

4.11. Análisis estadístico de los resultados

Se utilizó el software estadístico InfoStat (versión 2013). Los resultados se expresan como término medio ± ESM según lo adecuado. Se aplicó el test estadístico ANAVA, valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos y en caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos a posteriori se aplicó un test Tuckey.

5. RESULTADOS

5.1 Composición química del aceite esencial de *Schinus areira*

Los resultados obtenidos en la determinación de compuestos del material vegetal de *S. areira*, indican que la destilación por arrastre con vapor de agua es un método efectivo para la obtención del AE de *S. areira*, el que posteriormente fue analizado por GC-MS (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de terpenos en la composición del aceite esencial de *S. areira* L. obtenido por arrastre por vapor de H₂O y determinado por cromatografía de gas-líquido-espectrometría de masas (GC-MS)

Compuestos ^a	Porcentaje	Tiempo de retención relativo x 10 ⁻² (min)	Método de Identificación ^b
Monoterpenos Hidrocarbonados (65.65%)			
triciclono	1.99	925	GCMS
α-pineno	13.80	937	GCMS-Co
camfeno	12.62	954	GCMS
sabineno	1.59	975	GCMS-Co
β-pineno	5.80	979	GCMS-Co
β-mirceno	5.83	990	GCMS
α-felandreno	6.76	1003	GCMS
p-cimeno	1.92	1025	GCMS-Co
limoneno	12.81	1033	GCMS-Co
β-felandreno	2.53	1036	GCMS
Monoterpenos Oxigenados (0.71%)			
1,8-cineole	0.44	1037	GCMS
acetato de bornelo	0.27	1285	GCMS
Sesquiterpenos Hidrocarbonados (30.61%)			
α-copaeno	0.34	1376	GCMS
β-bourbonena	tr ^c	1388	GCMS
β-elemeno	0.39	1394	GCMS
α-gurjuneno	0.39	1403	GCMS
β-cariofileno	11.88	1419	GCMS
α-humuleno	1.06	1455	GCMS
aromadendreno de allo	0.19	1460	GCMS
γ-muuroloeno	0.20	1480	GCMS
germacreno D	8.95	1485	GCMS
β-selineno	0.17	1489	GCMS
biciclogermacreno	5.16	1494	GCMS
γ-cadineno	0.22	1513	GCMS
δ-cadineno	1.53	1524	GCMS
germacreno B	0.13	1555	GCMS
Sesquiterpenos Oxigenados (2.34%)			
germacreno-D-4-ol	1.27	1576	GCMS
spafulenol	0.50	1578	GCMS
τ-cadinol	0.25	1640	GCMS
α-cadinol	0.32	1653	GCMS
Total	99.31		

^a En orden de elución en una columna DB-5.

^b GCMS: pico de identificación basados en la comparación con los almacenados en la biblioteca de espectros del software del MS; Co: identificación basado en la comparación estandar con el tiempo relativo de retención. tr: traza (<0.05%)

De esta Tabla 1 se puede determinar que el 65.65% de la constitución del AE de *Schinus areira* está compuesto por monoterpenos hidrocarbonados. Mientras el 30.61% son sesquiterpenos hidrocarbonados, en el cual el β -cariofileno es el de mayor porcentaje (11.88%), seguido por el germacreno D con un 8.95.

Una vez obtenido el perfil cromatográfico del AE de *S. areira*, se procedió a obtener la fracción hidrocarbonada mediante la técnica de cromatografía de capa delgada (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje en la composición de terpenos de la fracción hidrocarbonada del aceite esencial de *Schinus areira* obtenido por cromatografía en capa delgada

Compuestos	Porcentaje
Monoterpenos Hidrocarbonados (39.13%)	
α -pineno	0,5
Canfeno	Tr ^a
β -pineno	0,7
Mirceno	3,0
α -felandreno	1,9
α -terpineno	tr ^a
<i>p</i> -cimeno	1,3
Limoneno	6,5
β -felandreno	3,3
Sesquiterpenos Hidrocarbonados (60.87%)	
Δ -elemeno	1,6
α -copaeno	1,1
β -elemeno	1,7
α -gurjuneno	1,2
β -cariofileno	37,6
β -cedreno	1,0
α -humuleno	2,8
allo aromadendreno	0,8
γ -muroleno	0,9
germacreno D	17,3
β -selineno	1,0
Biciclogermacreno	8,0
γ -cadineno	1,4
Δ -cadineno	6,5
Total	100,0

En esta Tabla 2 se invierte el porcentaje de hidrocarbonados con respecto a la Tabla 1, en donde el porcentaje de los sesquiterpenos hidrocarbonados es mayor cuantitativamente (60,8%) y dentro de ellos el β -cariofileno, llegando a un 37.6%; seguido por germacreno D en un 17.3% y el biciclogermacreno en un 8%.

5.2 Signos clínicos en conejos despiertos normotensos y tratados con el AE de *Schinus areira*

El estudio de dosis aguda proporciona una guía para la selección del estudio de dosis subaguda o crónica que puede ser clínicamente más relevante.

Independientemente del sexo, los animales no manifestaron alteraciones o signos clínicos significativos; como así también no se encontraron cambios en el comportamiento, modificaciones en el consumo de alimentos y/o en el consumo de agua, cambios en el peso corporal, o hallazgos macroscópicos en cualquier momento de la observación en la administración crónica (AE10-300).

5.3 Efectos del aceite esencial de *Schinus areira* en parámetros hematológicos y bioquímicos en conejos despiertos normotensos

Tabla 3. Valores hematológicos obtenidos en conejos despiertos, no tratados (Pretratamiento) y tratados (Postratamiento) con el aceite esencial de *Schinus areira* L.

Serie Roja

AE <i>Schinus areira</i>	Obtención	Glóbulos Rojos (μL)	Hematocrito (%)	Hemoglobina (g/dL)
AE-300	Pret (n:7)	5.061.000 \pm 185.22	35.25 \pm 1.51	10.89 \pm 0.77
	Post (n:6)	4.945.000 \pm 213.87	35.17 \pm 1.75	11.06 \pm 0.89
AE10-300	10 días (n:5)	5.127.000 \pm 234.28	35.60 \pm 1.92	12.05 \pm 0.98
FH-I	Pret (n:8)	5.728.750 \pm 261.94	36.50 \pm 2.16	10.85 \pm 1.09
	Post (n:9)	5.396.670 \pm 302.46	36.00 \pm 2.49	9.57 \pm 1.26
FH-II	Pret (n:8)	6.035.000 \pm 261.94	33.00 \pm 2.16	11.17 \pm 1.09
	Post (n:9)	6.085.000 \pm 213.87	34.83 \pm 1.76	11.81 \pm 0.89

AE-300: aceite esencial 300 mg/Kg. AE10-300: tratamiento durante 10 días con 2 dosis diaria del aceite esencial 300 mg/Kg. FH-I: Fracción Hidrocarbonada I: 5 mg/Kg. FH-II: Fracción Hidrocarbonada II: 2.5 mg/Kg. Pre y Post: tratamiento. Los valores se expresan como Término Media \pm ESM; n: número de animales.

5.3.1 Valores hematológicos de conejos despiertos normotensos y tratados con el AE de *Schinus areira*: Serie roja

En las Tablas 3, 4 y 5 se representan los valores hematológicos y bioquímicos. Los índices hematopoyéticos se han notificado a ser muy sensibles a los compuestos tóxicos y sirven como un índice importante del estado fisiológico y patológico tanto para los animales y para los seres humanos.

El efecto de los diferentes tratamientos con el AE de *S. areira* en los parámetros hematológicos de los conejos experimentales y de control se presentan en la Tabla 3. Los resultados indicaron que todos los valores hematológicos de la serie roja se mantuvieron dentro del intervalo fisiológico en los animales tratados, especialmente el tratamiento durante 10 días.

Tabla 4. Valores hematológicos obtenidos en conejos normotensos despiertos no tratados (Pretratamiento) y tratados (Postratamiento) con el aceite esencial de *Schinus areira* L.

Serie Blanca

<i>AE Schinus areira</i>	Obtención	Glóbulos Blancos (μL)	PMN (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)
AE-300	Pre	8.340 \pm 0.83	31.00 \pm 4.38	7.88 \pm 3.65	-	57.13 \pm 4.41	2.75 \pm 0.56
	Post	7.790 \pm 0.95	28.5 \pm 5.05	9.17 \pm 4.05	-	55.33 \pm 5.09	4.00 \pm 0.64
AE10-300	10 días	7.660 \pm 1.05	4.8 \pm 5.54	35.20 \pm 12.24	-	60.00 \pm 5.57	0
FH-I	Pret	6.340 \pm 0.83	39.50 \pm 8.75	2.00 \pm 0.00 ^a	-	58.50 \pm 8.81	0
	Post	6.130 \pm 0.78	43.50 \pm 8.75	2.00 \pm 1.00 ^a	-	54.00 \pm 8.81	0
FH-II	Pret	6.340 \pm 0.83	10.00 \pm 6.19	41.50 \pm 3.75 ^b	-	58.50 \pm 8.81	0.50 \pm 0.79
	Post	6.130 \pm 0.78	14.60 \pm 5.64	30.40 \pm 8.98	-	54.60 \pm 5.57	0.40 \pm 0.71

AE-300: aceite esencial 300 mg/Kg. AE10-300: tratamiento durante 10 días con 2 dosis diaria del aceite esencial 300 mg/Kg durante 10 días. FH-I: Fracción Hidrocarbonada I: 5 mg/Kg. FH-II: Fracción Hidrocarbonada II: 2.5 mg/Kg. Pre y Post: tratamiento. Los valores se expresan como Término Media \pm ESM; n: número de animales 7-9.a vs b $p \leq 0.05$

5.3.2 Valores hematológicos: Serie blanca

En la serie blanca, sin embargo, se encontró un incremento de eosinófilos tanto en animales no tratados como los tratados en AE10-300 y FH-II; reduciéndose los PMN con el tratamiento FH-II y AE10-300 (Tabla 4). Los otros parámetros se mantuvieron dentro de la gama de variación fisiológica normal y no hubo relación dosis-respuesta.

5.3.3 Valores Bioquímicos

Tabla 5. Valores bioquímicos obtenidos en conejos despiertos normotensos no tratados (Pretratamiento) y tratados (Postratamiento) con el aceite esencial de *Schinus areira* L.

AE de <i>Schinus areira</i> L.	Obtención	Urea (mg/L)	Creatinina (mg/L)	Proteínas			GPT (U/I)	FAL (UI/L)	L-Citrulina (mM)
				Totales (g/dL)	Albúmina (g/L)				
AE-300	Pretratamiento (n:7)	49.25 ± 4.88	0.95 ± 0.09	4.64 ± 0.24	2.51 ± 0.18	18.00 ± 3.79	154.75 ± 191.74	5.10 ± 0.55	
	Postratamiento (n:6)	52.33 ± 5.63	0.98 ± 0.10	4.38 ± 0.27	2.38 ± 0.20	19.17 ± 4.38	135.83 ± 221.40	5.28 ± 0.59	
AE10-300	10 Días (n:5)	53.00 ± 6.75	1.67 ± 0.11	5.00 ± 0.3	3.77 ± 0.22	19.60 ± 4.80	701.20 ± 242.53	2.97 ± 0.65	
FH-I	Pretratamiento (n:8)	40.25 ± 6.90	0.78 ± 0.12	5.37 ± 0.33	3.42 ± 0.24	27.75 ± 5.36	327.00 ± 271.16	3.16 ± 0.75	
	Postratamiento (n:9)	40.33 ± 7.96	0.82 ± 0.14	4.31 ± 0.38	2.47 ± 0.28	23.67 ± 6.19	208.33 ± 313.11	3.27 ± 0.86	
FH-II	Pretratamiento (n:8)	17.50 ± 6.90	0.56 ± 0.12	4.68 ± 0.33	3.32 ± 0.24	8.25 ± 5.36	411.50 ± 271.16	3.78 ± 0.75	
	Postratamiento (n:9)	24.50 ± 5.63	0.71 ± 0.10	4.74 ± 0.27	3.14 ± 0.20	14.00 ± 4.38	400.33 ± 221.40	3.42 ± 0.61	

AE-300: aceite esencial 300 mg/Kg. AE10-300: tratamiento durante 10 días con 2 dosis diaria del aceite esencial 300 mg/Kg. FH-I: Fracción Hidrocarbonada I: 5 mg/Kg. FH-II: Fracción Hidrocarbonada II: 2.5 mg/Kg. Los valores se expresan como Término Media ± ESM; n: número de animales.

Los datos de los parámetros bioquímicos en conejos tratados y control se presentan en la Tabla 5. No se observaron diferencias estadísticamente significativas de los valores bioquímicos, entre el control y los animales tratados, a pesar que en algunos parámetros experimentaron una variación no significativa, no hubo relaciones de dosis-respuesta y todos los parámetros anteriores se mantuvieron dentro del rango fisiológico.

Los valores de L-citrulina en los animales tratados en forma aguda con 300 mg/kg produjo un aumento del 3.52%, mientras que en el tratamiento por 10 días con la misma dosis, decreció un 25%. En los lotes tratados con la fracción hidrocarbonada-I, aumentaron en un 3.5% y con la fracción hidrocarbonada-II, disminuyeron un 9.5%.

5.4 Efectos del aceite esencial de *Schinus areira* en parámetros histopatológicos en conejos despiertos normotensos

En el examen histopatológico, no se observaron lesiones relacionadas con el AE de *S. areira*, aunque se encontraron modificaciones (Figura 4).

Los principales hallazgos en conejos controles como en el AE-300, es que se encontraron alveolos engrosados por la presencia de infiltrado inflamatorio de leucocitos mononucleares, congestión vascular y edema de los septos, hemosiderófagos en luces alveolares y pigmento antracótico en sectores y algunas arterias de paredes engrosadas, capilares glomerulares congestivos y dilatados, leve infiltrado inflamatorio de leucocitos mononucleares intersticial focal y algunas arterias de paredes engrosadas en los riñones.

En el estudio de las muestras de pulmón de las fracciones hidrocarbonadas (FH-I y II) y control, se encontraron focos de infiltrado inflamatorio mononuclear y áreas de extravasación eritrocitarias. En el hígado y riñón presenta leve congestión en capilares glomerulares y zona medular. En el tratamiento crónico (AE10-300) mostraron una reducción células de las áreas infiltradas en los órganos evaluados, con infiltrado de leucocitos mononucleares, congestión

vascular y edema en pulmón. Estos cambios no se consideraron relacionados con el tratamiento, debido a que estos cambios microscópicos fueron observados comúnmente en conejos no tratados. El grupo de dosis alta (300 mg/kg) no fue significativamente diferente del grupo de control en cualquier órgano.

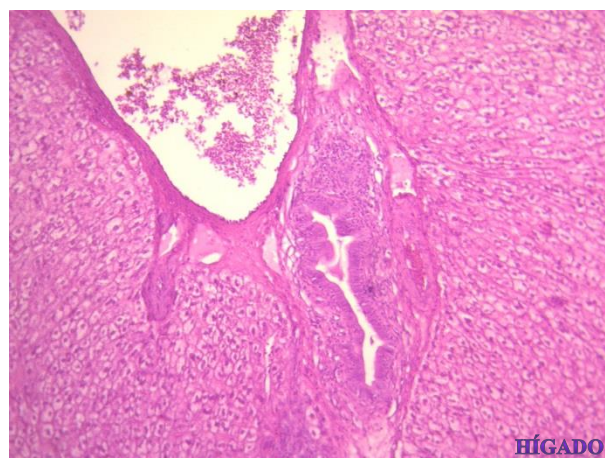
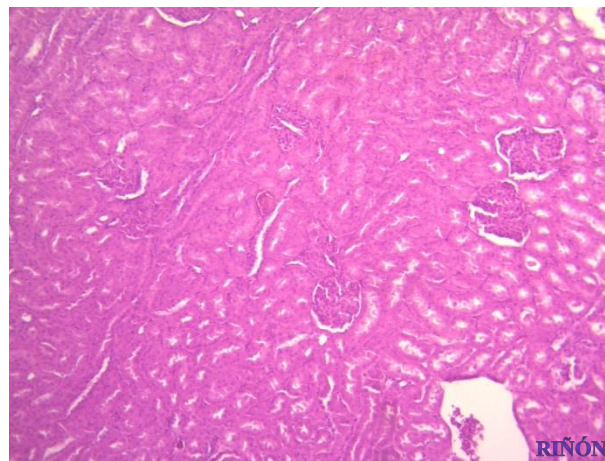
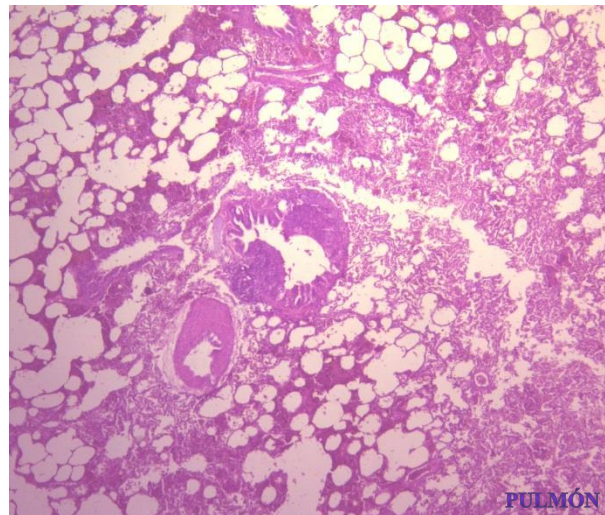


Figura 4. Microfotografía de secciones de pulmón, riñón e hígado de conejos tratados con el AE de *Schinus areira* 300 mg/kg. Pulmón asociado a infiltración linfocítica y congestión vascular. Riñón: Leve infiltrado de leucocitos mononucleares y capilares glomerulares congestivos. Hígado: congestión vascular (tinción con H y E -X 300).

5.5 Efectos del aceite esencial de *Schinus areira* en parámetros Hemodinámicos en conejos despiertos normotensos

5.5.1 Efectos del AE de *S. areira* sobre la presión arterial: Tratamiento agudo

Tabla 6. Valores hemodinámicos obtenidos en conejos normotensos *in vivo* no tratados (Pretratamiento), y posteriormente tratados (Postratamiento) y evaluados a diferentes tiempos con el aceite esencial de *Schinus areira* L. (300 mg/Kg, e.v.)

Tratamientos	n	Presión Arterial (mmHg)			FC (lat/min)
		PAS	PAD	PAM	
Basal	13	96.82 ± 3.06	77.69 ± 2.57	83.46 ± 3.14	195.71 ± 18.08
AE-300 5 min	6	86.25 ± 1.49 [*]	72.75 ± 3.10	79.08 ± 1.52	239.50 ± 21.18 [*]
AE-300 10 min	6	83.11 ± 3.50 [#]	71.78 ± 3.63	78.53 ± 2.01	227.00 ± 12.87
AE-300 15 min	6	86.88 ± 1.37 [*]	73.27 ± 3.38	79.34 ± 2.14	224.07 ± 12.89
Nife 5 min	7	73.30 ± 7.54 [#]	59.40 ± 4.06 [#]	66.35 ± 5.58 [†]	238.00 ± 12.01 [*]
Nife 10 min	6	72.71 ± 6.68 [#]	58.04 ± 3.45 [#]	65.38 ± 4.84 [†]	225.00 ± 37.00
Nife 15 min	6	73.40 ± 5.90 [#]	59.57 ± 3.54 [#]	66.61 ± 4.49 [†]	209.67 ± 12.10

Presión arterial y frecuencia cardíaca en conejos *in vivo*: PAS: presión arterial sistólica. PAD: presión arterial diastólica. PAM: presión arterial media. AE-300: aceite esencial de *Schinus areira* 300mg/Kg. Nife: Nifedipina 10 mg. ^{*} $p < 0.05$; [#] $p < 0.01$; [†] $p < 0.001$. Media ± SEM; n: número de animales.

De la Tabla 6 se puede apreciar que los valores de la PAS, PAD y la PAM tratados con el aceite esencial de *S. areira* disminuyeron en porcentajes, a los 5 minutos: 10.9, 6.3 y 5.24; 10 minutos: 14.1, 7.60 y 5.90 y a los 15 minutos: 10.2, 5.68 y 9.1, respectivamente.

Por otro lado, los animales tratados con nifedipina la PAS, PAD y la PAM disminuyeron significativamente en porcentajes a los 5 minutos: 24.29, 23.54 y 20.50; 10 minutos: 24.90, 25.29 y 21.66; y a los 15 minutos: 24.18, 23.32 y 20.18 respectivamente.

5.5.2 Efectos del AE de *S. areira* sobre la presión arterial en conejos despiertos normotensos: Tratamiento crónico de 10 días

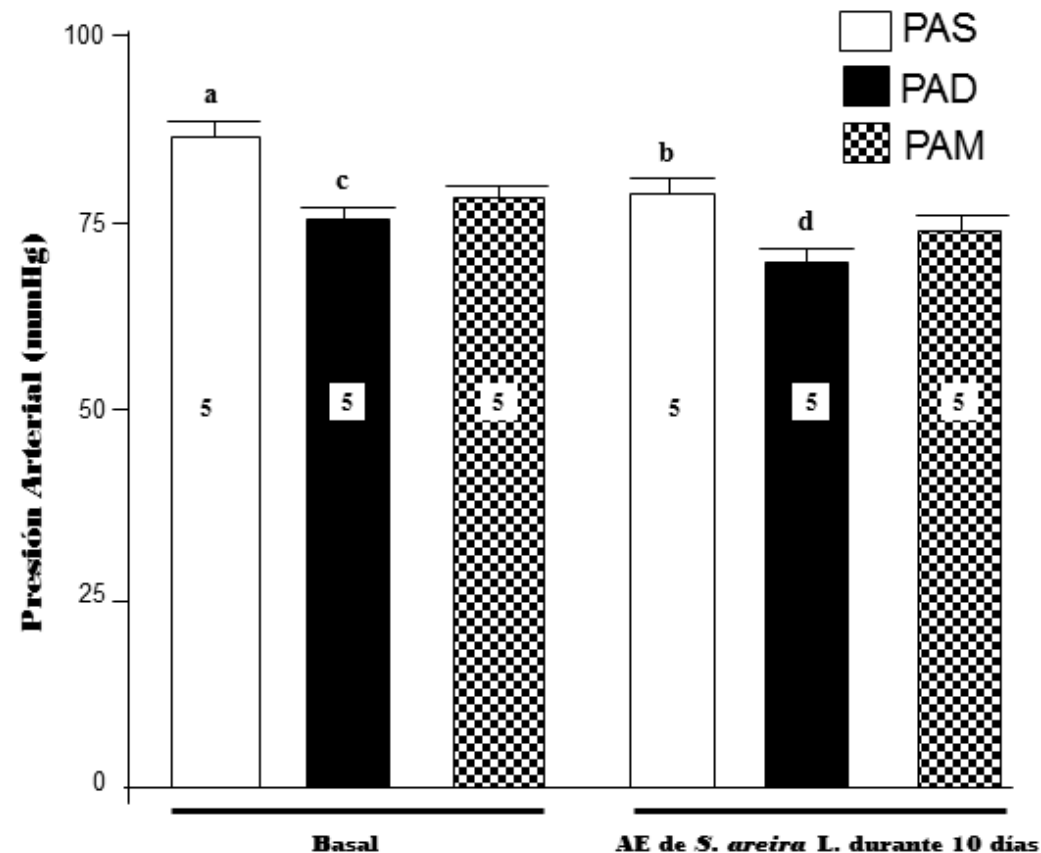


Figura 5: Presión arterial en conejos despiertos normotensos *in vivo* no tratados (Basal) y tratados posteriormente durante 10 días con dos dosis diaria de 300 mg/kg obtenida del aceite esencial (AE) de *Schinus areira*. □ PAS: presión arterial sistólica. ■ PAD: presión arterial diastólica. ▨ PAM: presión arterial media. AE-300: aceite esencial de *Schinus areira* 300mg/Kg. a vs b y c vs d: $p < 0.05$ Los datos se expresan como Término Medio \pm SEM; dentro de cada barra se indica el número de animales evaluados.

5.5.3 Efectos del AE de *S. areira* de la Fracción Hidrocarbonada-I sobre la presión arterial en conejos despiertos normotensos

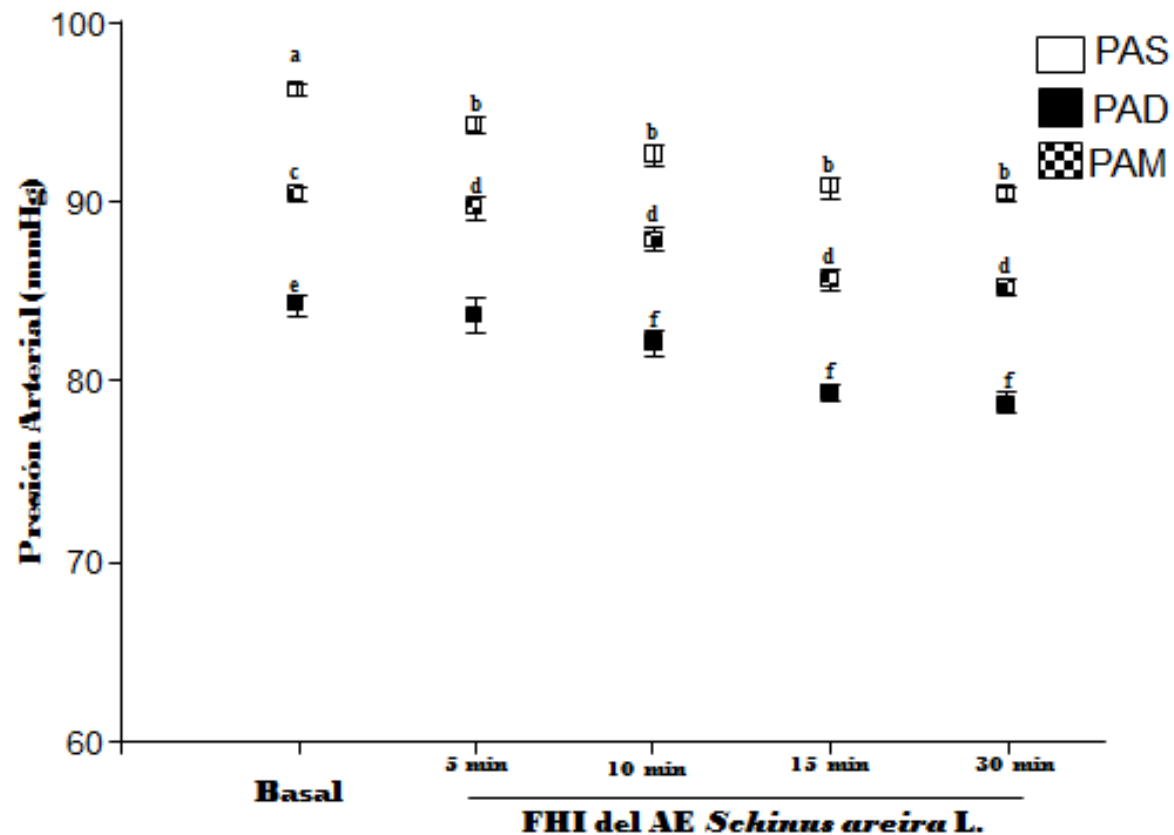


Figura 6: Presión arterial en conejos despiertos normotensos *in vivo* no tratados (Basal) y tratados posteriormente con la Fracción Hidrocarbonada I (5 mg/kg) obtenida del aceite esencial (AE) de *Schinus areira* □ PAS: presión arterial sistólica. ■ PAD: presión arterial diastólica. ▣ PAM: presión arterial media. AE-300: aceite esencial de *Schinus areira* 10 mg. a vs b, c vs d y e vs f: $p < 0.05$ Los datos se expresan como Término Medio \pm SEM; número de animales evaluadas: 5-6 en cada grupo.

5.5.4 Efectos AE de *S. areira* de la Fracción Hidrocarbonada-II sobre la presión arterial en conejos despiertos normotensos

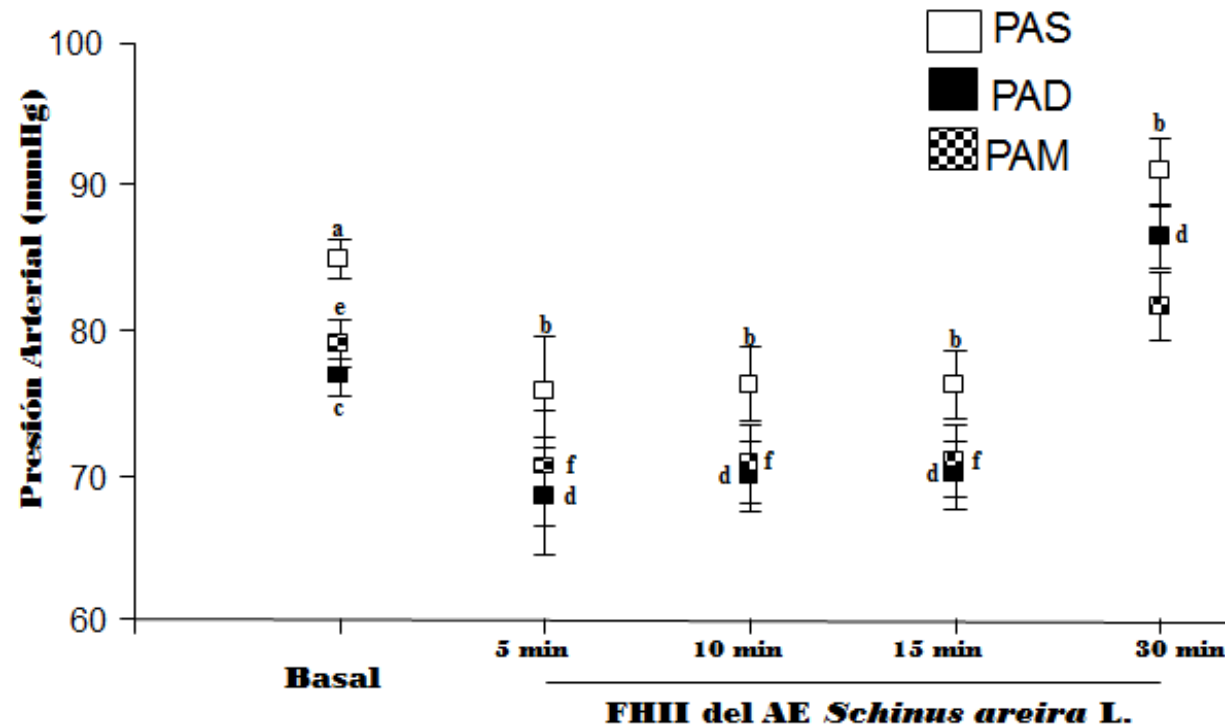


Figura 7: Presión arterial en conejos despiertos normotensos *in vivo* no tratados (Basal) y tratados posteriormente con la Fracción Hidrocarbonada II (FHII, 5 mg/kg) obtenida del aceite esencial (AE) de *Schinus areira*. □ PAS: presión arterial sistólica. ■ PAD: presión arterial diastólica. ▣ PAM: presión arterial media. a vs b, c vs d y e vs f: $p < 0.05$ Los datos se expresan como Término Medio \pm SEM; número de animales evaluados: 5-6 en cada grupo.

5.5.5 Efectos del AE de *S. areira* sobre la contractilidad miocárdica de corazón *ex vivo* de ratón Albino Swiss

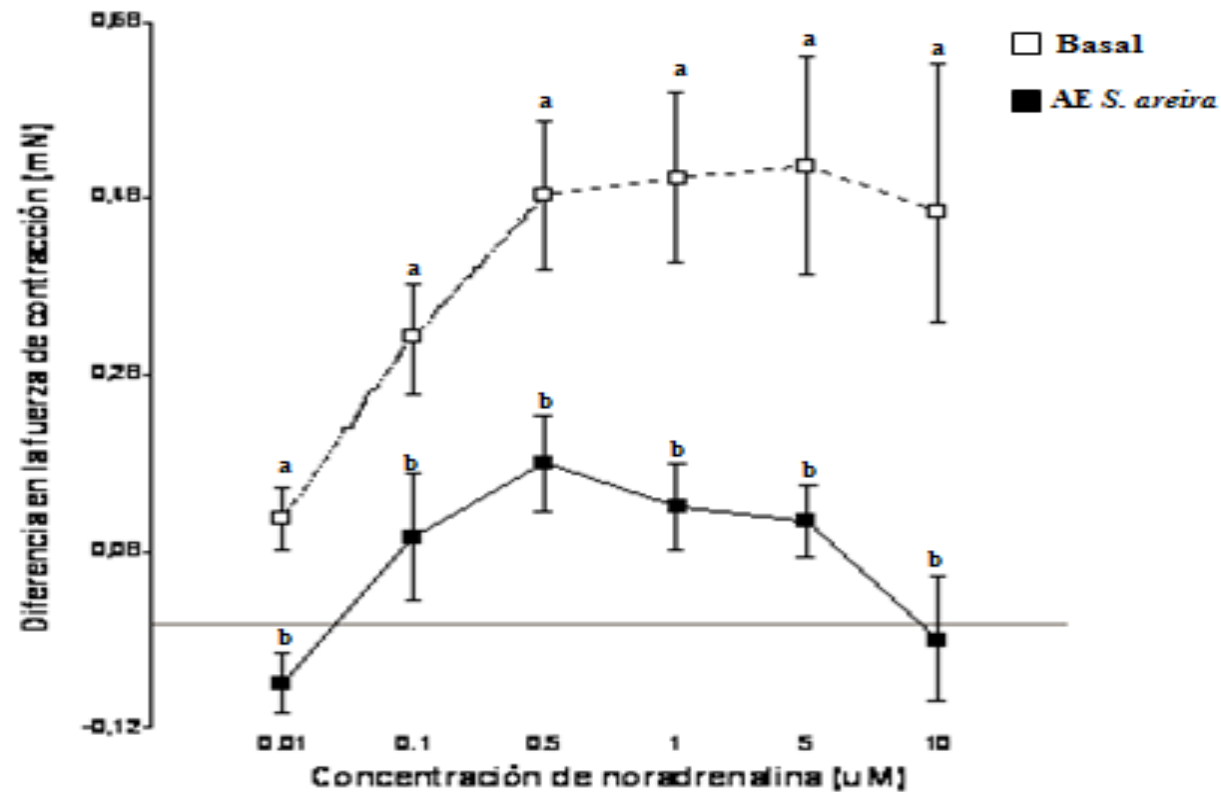


Figura 8: Determinación de la contractilidad cardíaca (mN: mili Newton) en corazón *ex vivo* de ratón Albino Swiss sometido a concentraciones crecientes de noradrenalina (µM): 0,01, 0,1, 0,5, 1, 5 y 10. □ Basal: animales sin tratamiento previo y ■ animales tratados con AE durante 3 hs con 300 mg/Kg i. p. previo a la determinación de la contractilidad cardíaca. Los datos se expresan como Término medio ± ESM (n: 6). a vs b $p \leq 0,05$ en todas las concentraciones de noradrenalina.

En la Figura 5 se observa que las PAS y la PAD en animales despiertos normotensos tratados con una dosis crónica del AE de *S. areira* (AE-300) disminuyeron significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto al Basal.

En el Figura 6 se puede apreciar que las medición de la PAS y PAM registradas en conejos normotensos despiertos con una dosis de la Fracción Hidrocarbonada del aceite esencial de *Schinus areira* FH-I (5 mg/kg, i.v.) a los 5, 10, 15 y 30 minutos, disminuyeron significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto al Basal. La PAD disminuye significativamente ($p \leq 0.05$) recién a partir de los 10, 15 y 30 minutos.

Como se puede observar en el Figura 7, las medición de la PAS, PAD y de la PAM registrados en conejos normotensos despiertos con una dosis de la Fracción Hidrocarbonada del AE de *S. areira* FH-II (2.5 mg/kg, iv.) a los 5, 10, 15 minutos, disminuyeron significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto al Basal. Asimismo, las PAS y la PAD a los 30 min aumentaron significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto al Basal.

Finalmente, se evaluó la actividad contráctil del corazón *ex vivo* de ratón tratado previamente con AE 300 mg/Kg de peso corporal, durante tres horas y sometido posteriormente a concentraciones crecientes de noradrenalina, en una cámara perfundida con medio de Krebs-Ringer bicarbonato. Como puede apreciarse en la Figura 7, el grupo Basal fue significativamente mayor en todos los puntos evaluados en su respuesta a la noradrenalina ($p \leq 0.05$).

6. DISCUSIÓN

Las personas que utilizan remedios tradicionales pueden no entender las razones científicas detrás de sus medicinas, pero saben por experiencia personal, empirismo o transmisión oral de una generación a otra, que las plantas medicinales pueden ser muy eficaces si se utilizan en las dosis adecuadas.

En la actualidad, la investigación para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer, la diabetes y la hipertensión se lleva a cabo entre otras fuentes, en la evaluación de agentes basados en principios activos provenientes de las plantas y al tener una mejor comprensión actual en Fisiología Humana estamos en una excelente posición para entender la acción de los principios activos de las plantas y su potencial como entidades químicas multi-funcionales para el tratamiento de ciertas condiciones de la salud humana (Liby et al., 2007; Santos et al., 2013).

Los productos naturales y sus derivados representan más del 50% de todas las drogas de uso clínico en el mundo. Aproximadamente la mitad (125.000) de las especies de plantas con flores viven en la bosques tropicales y son una reserva para la obtención de nuevos fármacos y continúan proporcionando químicos con un valor incalculable (Asgary et al., 2000).

El potencial de encontrar más compuestos es enorme ya que a la fecha sólo el 1% de las especies tropicales han sido estudiados por su potencial farmacéutico. Esta proporción es aún menor para las especies confinadas a las selvas tropicales (Mendelson y Balick, 1995; Turiel et al., 2013). Hasta la fecha cerca de 50 medicamentos han llegado a partir de plantas tropicales y la existencia de productos farmacéuticos para descubrir nuevos productos ha sido a menudo citada como una de las razones más importantes para la protección de bosques tropicales, por lo que la alta tasa de extinción anual es preocupante (Cordell y Colvard 2005; Kaore et al., 2013).

Lo primero que se realizó en el desarrollo del diseño experimental de este trabajo, fue la obtención del AE de *Schinus areira*, la determinación de su composición química y finalmente

la aislación mediante cromatografía de capa delgada de la fracción hidrocarbonada, el que posteriormente fue analizado por GC-MS, indicando la presencia de terpenos, mono y sesquiterpenos, hidrocarbonados y oxigenados.

La extracción del AE mediante la técnica de destilación por arrastre de vapor resultó ser efectiva, las primeras gotas de aceite comenzaron a salir entre los 20 y 30 minutos e inmediatamente se dio la separación de fases. El tiempo de destilación se determinó durante los primeros experimentos observando que se obtenía el mayor volumen de aceite entre las dos y tres horas, por lo tanto, se estandarizó el método especificando un tiempo de tres horas para todas las réplicas realizadas, lo cual concuerda con Durling et al., (2007), quien sugiere que el tiempo de extracción para los AE no sea mayor de tres horas.

En este trabajo, se identificaron el 99,31% de los AE, el cual está formado por 30 terpenos, identificados por GS-MS. Este AE se caracteriza por la presencia predominante de hidrocarburos, tanto sesquiterpenos (48.5%) como monoterpenos (38.3%) y en menor proporción, por sesquiterpenos y monoterpenos oxigenados (4.5% y 0.8%, respectivamente).

Abdel-Sattar et al., (2010) detallan la presencia de 65 compuestos presentes en el aceite de este árbol. Por otro lado, los principales terpenos identificados son similares a los descriptos por Rouibi et al., (2009, 2010); mientras que Murray et al., (2005, 2009) describen como el mayor componente del AE de *S. areira* al limoneno, α -pineno y α y β -felandreno. Torres et al., (2006) refieren que la presencia de germacreno D (16,4%) y β -cariofileno (13,4%), son indicativos de la buena conservación y procesamiento del AE (Marongiu et al., 2004; Pérez-Lopez et al., 2006).

Muchos investigadores han llevado a cabo estudios científicos para validar la eficacia de las recetas a base de plantas, sin embargo, pocos han iniciado investigaciones que abordan la seguridad y la toxicidad (El-Azzouny et al., 2010; Kaur et al., 2010). De hecho, la toxicidad de

muchos de estos remedios a base de hierbas no se ha validado científicamente y su seguridad ha sido cuestionada recientemente debido a publicaciones que describen efectos secundarios y muertes a causa del uso de plantas medicinales (Veiga-Junior et al., 2005), hepatotoxicidad (Saad et al., 2006) y nefrotoxicidad (Debelle et al., 2008).

Dentro del contexto mencionado en el párrafo anterior y teniendo en cuenta la complejidad de las recetas a base de plantas en general y de su variación biológica inherente, es necesario evaluar la seguridad, eficacia y calidad de estos compuestos (Castro et al., 2009). No se detectaron cambios significativos en conejos despiertos normotensos en los valores hematológicos en la serie roja tanto en animales control, como en animales tratados con el AE de *S. areira*.

Por otro lado, los valores hematológicos en la serie blanca se hallaron un incremento de eosinófilos en animales con tratamiento crónico con AE de *S. areira* (AE10-300) y la FH-I; y una disminución de PMN en FH-II y en el AE10-300. No observaron modificaciones en los restantes parámetros evaluados en nuestro modelo experimental y se respalda con las evaluaciones histopatológicas (Tabla 4 y Figura 4).

L-citrulina y los PMN se encontraron valores menores en el grupo tratados durante 10 días, junto a un incremento de eosinófilos (AE10-300). L-citrulina se utiliza como marcador inflamatorio, al igual que la detección de Proteínas C reactivas en pacientes reumatoideos (pacientes estos de prevalente manifestaciones inflamatorias) (Marini, Babini, y Moretti, 2004; Piton et al., 2009; Rossetti et al., 2009; van der Velden et al., 2013). En estudios de nuestro laboratorio, Bigliani et al., (2012) describen a *S. areira* con una actividad anti-inflamatoria.

Dentro de este contexto, el β -cariofileno es un sesquiterpeno hidrocarbonado que participaría en la inhibición en la producción de la prostaglandina E2, en la liberación de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), en la expresión de la sintasa inducible del óxido nítrico y sobre la

ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Fernandes et al., 2007). En un estudio realizado por Gertsch et al., (2008) el β -cariofileno demostró efectos antiinflamatorios en un modelo experimental en ratones al unirse selectivamente al receptor canabinoide tipo 2 (CB2).

Este descenso, si bien no resultó significativo, podría estar relacionado con la disminución de los PMN, células productoras de óxido nítrico, indicando que el AE de *S. areira* podría ejercer una modulación sobre la enzima óxido nítrico sintetasa.

Por otro lado, es importante destacar el incremento en el recuento de eosinófilos (Tabla 4). Los eosinófilos particularmente, se vuelven muy activos en ciertas reacciones alérgicas, infecciones, infestaciones parasitarias u otras afecciones médicas (asma, trastornos autoinmunitarios, eccema, rinitis, leucemia). Los neutrófilos son un tipo de glóbulos blancos que tienden a aumentar en las infecciones agudas bacterianas, respuestas inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, como el infarto de miocardio y en quemaduras.

El órgano más afectado según los análisis histopatológicos fue el pulmón, debido probablemente a su alta vascularización, mientras que los riñones fueron también afectados en menor medida, seguido por el hígado y el corazón, sin presentar particularidades específicas, en este último órgano.

Estas variaciones celulares halladas en los eosinófilos como los cambios histopatológicas, se pueden atribuir a una combinación de factores, entre la cual es importante mencionar a la acción alérgica encontrada “*per se*” del AE de *S. areira* en AE10-300, como así también a la vía de administración, a los factores ambientales y/o alimentarios observados en animales control. Estos hallazgos se observaron en ambos sexos y no depende de la dosis-respuesta. Sin embargo, estos síntomas son parte a menudo descriptos en conejos y es observado con frecuencia en lotes animales de granja y experimentación (Arshad, 2006; Låstbom et al., 2003; Morris, 2002; Newman et al., 2000).

Si bien, las dosis administradas, están cercanas a las de muchas otras dosis utilizadas en otros AE y por regla general, los AE por vía oral (AE10-300) poseen una baja toxicidad, ya que los fármacos administrados por vía oral se absorben en el tracto gastrointestinal.

Teniendo en cuenta que la administración en el tratamiento agudo se realizó por vía endovenosa, en cambio, la vía oral se utilizó para el tratamiento crónico, la cual es menos alérgica, causando una disminución en el stress y otros efectos adversos que ocasionan una administración crónica vía endovenosa.

En nuestro modelo experimental y de acuerdo con los resultados previos de nuestro laboratorio (Bigliani et al., 2010, 2012), los tratamientos estuvieron por debajo de DL₅₀, tanto en las dosis e.v. como por la vía oral, ya que la mayoría de los AE que se utilizan frecuentemente tienen una DL₅₀ comprendida entre 2 y 5 g/kg como son el anís (*Pimpinella anisum*), el eucalipto (*Eucalyptus*), el clavo (*Syzygium aromaticum*) y superior a 5 g/kg como la manzanilla (*Chamaemelum nobile*), la lavanda (*Lavandula officinalis*), la mejorana (*Origanum majorana*) y el vetiver (*Chrysopogon zizanioides*).

Otras plantas poseen una DL₅₀ comprendida entre 1 y 2 g/kg: la albahaca (*Ocimum basilicum*); el estragón (*Artemisia drancunculus*) y el hisopo (*Hyssopus officinalis*) (1,5 *Melaleuca* y el wintergreen (*Galultheria procumbens*) (0,9-1,2 g/kg) y el sazafrán (*Sassafras albidum*) (1,9 g/kg) (Bakkali et al., 2008; Bigliani et al., 2012; Zunino et al., 2011).

En el análisis bioquímicos de la Tabla 5, los valores de urea (que es un índice la función hepática y de la excreción renal de orina y los sub productos finales del metabolismo proteico), creatinina (marcador del clearance renal, mas especifico de la función del glomérulo renal como metabolito final de proteínas); proteínas totales (índice de la ingesta, absorción, catabolismo y síntesis proteica, funcionamiento e integridad, desde el tubo digestivo y de sus glándulas anexas, el hígado y páncreas); albúmina (mantenimiento de la presión oncótica y transporte de

varios compuestos, función hepática); GPT o transaminasa glutámico-pirúvica (enzima está evaluada por su casi especificidad del citoplasma del hepatocito y en menor medida, corazón, riñón y musculo); FAL o fosfatasa alcalina (función del tejido óseo y metabolismo del calcio y de la acción intra y extra-hepática de los líquidos biliares) no mostraron cambios significativos en las dosis y tiempo utilizado en nuestro modelo experimental. Mariscal-Mariscal-Quintanar et al., (1997) describen patologías que podían inducir cambios en los valores citológicos y bioquímicos, sin por ello producir síntomas clínicos y pasar con un episodio no detectado.

Si bien en esta tesis no fue el estudio toxicológico del AE de *S. areira*, los resultados anatómicos presentaron ausencia de daños orgánicos macroscópicamente y no se observaron variaciones en los signos clínicos o en los estudios hematológicos de la serie roja y bioquímicos graves, durante los 10 días de dosis repetidas. No hubo cambios significativos observados en el comportamiento general, en la ingesta alimentaria como hídrica, efectos en la piel, la defecación y anomalías posturales causadas por la administración del AE de *S. areira* (AE10-300 mg/kg/12hs durante 10 días) en ninguno de los animales tratados en comparación con el grupo control.

A lo largo del período experimental de AE10-300 no se observaron indicios clínicos ó signos que generalmente suelen ocurrir en forma espontánea y podrían no ser relacionados con la administración de AE de *S. areira*, ya que estos hallazgos observados en ambos sexos y descritos en las Tablas 4 y 5, en los grupos de tratamiento y sin una relación dosis-respuesta, podrían no ser provocados específicamente ó únicamente por la administración del AE de *S. areira*. Estas observaciones encontradas en los análisis hematológicos y anatomopatológicos, se detectan frecuentemente en conejos clínicamente normales y en otros animales de granja y se consideran espontáneos o característicos de cada especie (Ajayi y Raji, 2012; Andhare et al., 2012; Giusti et al., 2012, Xie et. al. 2013).

En la determinación de los valores de la PA, los animales se mantuvieron sin anestesia y conectados al aparato de medición de la PA. Esta maniobra desencadena una serie de eventos, entre los cuales provoca stress y de esa manera se incrementa la PA (Slipack, 1991).

Durante la respuesta en la fase aguda, siguiendo la elevación de la PA, hay además taquicardia, palpitations cardíacas, mareos, hipotermia y dificultad respiratoria (Du et al., 2013; Hjemdahl and Esler, 2012).

El estrés agudo aparece en cualquier momento, es breve y no tiene tiempo suficiente para producir grandes lesiones. Puede consistir en desequilibrio emocional, con una combinación de ira o irritabilidad, ansiedad y depresión, problemas musculares con dolor, tensiones musculares, contracturas y lesiones en tendones y ligamentos, problemas digestivos en estómago o en intestino, acidez, flatulencia, diarrea, estreñimiento y síndrome del intestino irritable (García Triana et al., 2013; Hjemdahl & Esler, 2012).

Se acompaña además, de otros cambios endócrinos, como la elevación de la secreción de hormona del crecimiento, incremento de la secreción de aldosterona y una disminución de la secreción de vasopresina por la hipófisis posterior, a fin de reducir el volumen de fluidos corporales que deben ser calentados, contribuyendo así al aumento de la temperatura (Du et al., 2013).

Como vemos, las interacciones entre los elementos reguladores de la osmolaridad de los líquidos corporales establecen un juego muy especial durante la respuesta de fase aguda, resultantes en gran parte por una serie de eventos autonómicos especiales, conducidos por la activación del sistema simpático, llevado por la rama periférica de las neuronas noradrenérgicas centrales, resultando una redistribución del flujo cutáneo hacia zonas profundas para minimizar la pérdida de calor por la piel y eventos endócrinos, como la elevación de CRH, ACTH y

glucocorticoides. Estas manifestaciones generales son transitorias, lo que conduce a un incremento de la osmolaridad del LEC (Alves et al., 2014; Chávez, 2009; Slipack, 1991).

Al analizar en la Tabla 6, la consecuencia del estrés producido a los animales por la inmovilización y sujeción, produce un aumento de la PAS, que es la resultante entre la fuerza de contracción miocárdica (sístole ventricular), volemia (viscosidad sanguínea), y la distendibilidad de la aorta y grandes arterias (estroma rico en fibras musculares lisas) y se detectó una disminución de un 25% luego de la administración de nifedipina. La nifedipina se usa para tratar la PA alta y controlar la angina de pecho. La nifedipina pertenece a una clase de medicamentos llamados bloqueadores de los canales de calcio. Actúa relajando los vasos sanguíneos, de modo que el corazón no tenga que bombear con tanta fuerza. También aumenta el flujo sanguíneo y la oxigenación del corazón.

En nuestro modelo experimental, el AE-300 disminuyó significativamente la PAS en conejos normotensos *in vivo*, a los 5-10 y 15 min y luego de 10 días de administración (Tabla 6, Figura 5 respectivamente) como así también en las fracciones hidrocarbonadas FH-I (5 mg/kg) un 5% y 15% en la FH-II (2.5 mg/kg). Cuando se administró en forma crónica el AE de *S. areira* durante 10 días (AE10-300) la PAS descendió un 15% aproximadamente y en el análisis de la PAD y de la PAM, observamos que las mismas decrecieron un 5% tanto a los 10 minutos, como así también en la administración del AE10-300, mientras que no se detectó ningún efecto sobre la frecuencia cardíaca.

Por otro lado, no es la misma concentración de monoterpenos y sesquiterpenos hidrocarbonados y por consiguiente las respuestas no se pueden atribuir a un grupo de terpenos y menos a aun a uno o dos, que son los más representativos en porcentajes en los sesquiterpenos como en el caso del β -cariofileno y el germacreno D ya que la constitución del AE de *S. areira* fue de un 12% de β -cariofileno y casi 9% de germacreno D, mientras que en las fracciones

hidrocarbonadas estos se expresan en un porcentaje aún mayor, 37% y 17 % respectivamente. Con estas comparaciones es que los hallazgos de diferencias de presión no pueden ser atribuidos a concentraciones, ni la exclusividad de estos dos terpenos, como así también a la administración crónica del AE de *S. areira* (AE10-300) (Chizzola et al., 2012).

Lahlou et al., (2005) demostraron que el terpinen-4-ol, un terpeno del AE de la *Alpinia zerumbet*, promueve la hipotensión y Aydin et al. (2007) demostraron que el carvacrol, terpeno de muchos AE posee acción hipotensora y vasodilatadora, posiblemente debido a un bloqueo de los canales de Ca^{++} . Guedes et al., (2004) publicaron que el rotundifolone, un terpeno aislado del AE de la *Gentiana floribunda*, presentó acción hipotensora por disminución de la RVP. Este efecto fue causado por la inhibición de canales voltaje dependiente de Ca^{2+} y liberación del Ca^{2+} intracelular (Khan et al., 2012; Oliveira et al., 2012).

En Brasil, un trabajo realizado por la Sociedad Brasileira de Cardiología se administró a pacientes hipertensos una infusión con citronelol, demostrado los posibles beneficios de este AE en el sistema cardiovascular (Arquives Brasileria de Cardiologia, 2007). En un modelo de ratas conscientes, la administración intravenosa de citronelol, indujo hipotensión asociado con taquicardia (Aydin et al., 2007; Bastos y col, 2010; Magalhães et al., 2008; Peixoto-Neves et al., 2010).

Santos et al., (2011) describe a dieciséis monoterpenos que han sido estudiados por sus efectos sobre el sistema cardiovascular: carvacrol, citronelol, p-cimeno, eucaliptol (1,8-cineol), linalol, mentol, mirtenal, mirtenol, α -pineno, rotundifolone (óxido de piperitenona), sobrerol, timol, α -limoneno, α -terpinen-4-ol, α -terpineol y alcohol perílico. Los principales efectos observados son: vasorrelajación, disminución de la frecuencia cardíaca y la presión arterial (Maynard et al., 2011; Mathison et al., 2011). Esta revisión demuestra que los monoterpenos se pueden considerar agentes prometedores para la prevención o el tratamiento de enfermedades

del sistema cardiovascular y algunos de estos terpenos están presentes en el AE de *Schinus areira* utilizado en este trabajo.

Con estos resultados, podemos inferir que los mecanismos por el cual el AE de *S. areira* podría actuar sobre la regulación de la PA, tanto sobre la regulación a corto plazo y sobre los mecanismos a largo plazo. La actividad cardiovascular del AE de *S. areira*, puede atribuirse a que los AE pueden cambiar la permeabilidad de la membrana y de esa manera, interactuar varios terpenos, como por ejemplo el β -cariofileno, descrito como un bloqueante de los canales de Ca^{2+} (Zunino et al., 2011). Estas observaciones podrían indicar una heterogeneidad en sus sitios de acción, es por ello, la amplia acción fisiológica que se le describen a los AE obtenidos de las plantas aromáticas (Bakkali et al., 2008; Bigliani et al., 2012; Zunino et al., 2011).

Los bloqueantes de los canales de Ca^{2+} inhiben la entrada de Ca^{2+} en las células y por lo tanto producen relajación del músculo liso vascular, que es una base para el tratamiento de la hipertensión arterial. A pesar de la reducida entrada de Ca^{2+} en las células del corazón puede ser beneficioso en ciertas enfermedades debido a la disminución de la carga de Ca^{2+} , que siempre conduce a un efecto inotrópico negativo, como se describe en en la Figura 8 (Cauvin & Malik, 1984; Wang et al., 2001).

Olafsson et al., (1997) y Galvez Ranilla et al., (2010) demostraron la acción de esta planta sobre la inhibición de la ECA. La ECA está unida y anclada a la membrana del endotelio de muchos lechos vasculares, como el endotelio vascular del pulmón y la aorta (Caldwell et al., 1976) y desempeña un papel fundamental en el SRA catalizando la conversión del péptido Ang II a partir de su precursor inactivo Ang I) (Du et al., 2013; Kuba et al., 2006). La inhibición farmacológica de la ECA se utiliza ampliamente con un enfoque terapéutico, especialmente en

el tratamiento de la hipertensión y este mecanismo es postulado mediante el siguiente la siguiente Figura (de la Sierra et al., 2011; Du et al., 2013; Figura 8).

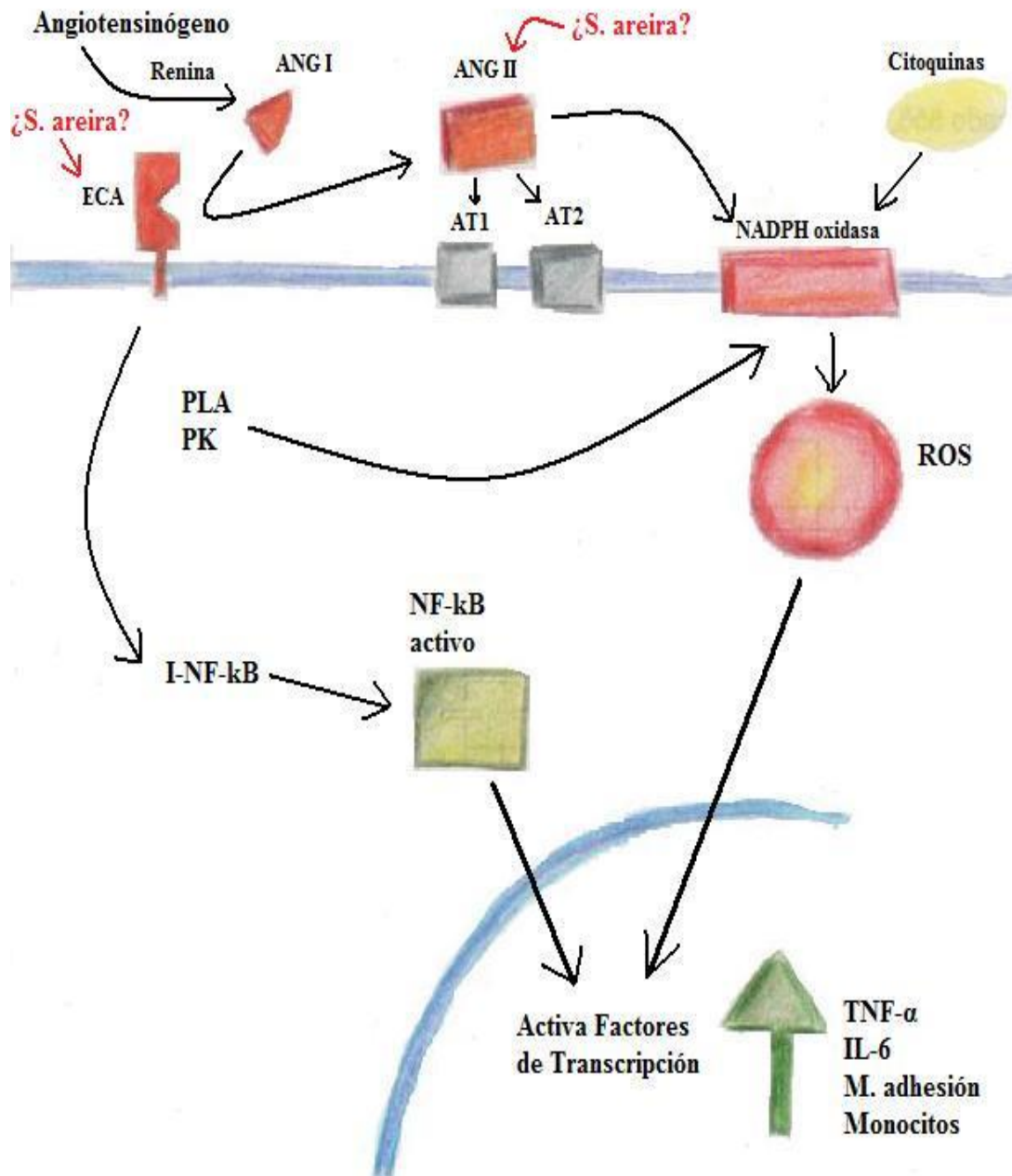


Figura 9. Esquema de la posible regulación de terpenos de *Schinus areira* (*S. areira*) en el Sistema Renina-Angiotensina. ECA: enzima convertidora de angiotensina. ANG: angiotensina. AT: receptor de angiotensina. Ilustración de M.C. Bigliani. Modificado de Kuba et al., (2006).

Además de regular la presión sanguínea, la insuficiencia cardíaca congestiva, la liberación de aldosterona y la reabsorción de sodio, evidencias actuales indican que la Ang II afecta a las

células circulantes donde se ha demostrado la presencia de receptores de Ang II en monocitos/macrófagos. Por otra parte, Ang II estimula la quimiotaxis de células mononucleares humanas (Tedgui & Mallat, 2006) y está involucrada en el proceso inflamatorio, actuando como mediador proinflamatorio a través de la modulación de NF- κ B (Montecucco, Pende, & Mach, 2009).

En este contexto, postulamos que la posible acción de AE10-300 utilizados en nuestro modelo experimental, lograron reducir la migración de PMN, mediando a través de la acción del SRA descrito anteriormente.

Como mencionáramos en los párrafos anteriores, el AE de *S. areira*, podría actuar sobre el SRA y se ha postulado que la inhibición de la ECA reduce el riesgo cardíaco y que además la Ang II es la responsable directa de la hipertrofia ventricular izquierda (Brugts et al., 2009) y de allí la importancia que se le asigna a su receptor, el AT1, ubicado en la superficie de los miocitos cardíacos. Los inhibidores de la ECA, los bloqueantes β -adrenérgicos y los antagonistas cálcicos reducen la hipertrofia ventricular izquierda (Mehta et al., 2007) mientras que Paul et al., (2003) describen que tanto los receptores de Ang II como los beta adrenérgicos comparten mecanismos similares.

Al evaluar la contractilidad cardíaca *ex vivo* de la cepa Albino swiss de ratón, luego de la administración del AE de *S. areira* L (300 mg/kg) la dosis creciente de noradrenalina en el corazón *ex vivo* tratados previamente con AE de *S. areira* de 300 mg/Kg (i.p.) demostró no incrementar la contractilidad cardíaca mediada por noradrenalina en las dosis utilizadas, demostrando tener un efecto inotrópico negativo.

La función de la fibra miocárdica, y por ende la función cardíaca, está controlada principalmente por el sistema nervioso simpático. El corazón recibe fibras postganglionares que liberan noradrenalina, neurotransmisor que media la acción simpática sobre los receptores β -

adrenérgicos del músculo cardíaco y los receptores α -adrenérgicos de las arterias coronarias y de células del nódulo sinusal (Mehta et al., 2007). Como se observa en el estudio de AE de *Schinus areira* en ratones acerca de la contractilidad miocárdica *ex vivo*, se obtuvo una disminución de la fuerza de contracción bajo la acción de la noradrenalina.

Además, si tenemos en cuenta que β -cariofileno está presente en el AE de *S. areira* en un 13.4% y este terpeno ha sido descrito como bloqueante de los canales de Ca^{2+} podríamos suponer que el efecto inotrópico (-) podría estar mediado a través de la inhibición de la ECA y en los canales de Ca^{2+} (Das y De, 2013; Sensch et al., 2000).

CONCLUSIONES

Los animales tratados con el AE de *S. areira* en la forma aguda presentaron modificaciones en el recuento de PMN y eosinófilos, correlacionado con el estudio histopatológico. Sin embargo, en el análisis bioquímico y en la seria roja, no presentó alteraciones significativas, exhibiendo una disminución de la PA en conejos despiertos normotensos entre un 10 a 15%, entre las distintas dosis y tratamientos y ejerce una acción inotrópica negativa en corazón *ex vivo* en ratones.

Se postula que los terpenos presentes en el AE de *S. areira* poseen heterogeneidad en sus sitios de acción, produciendo reacciones alérgicas inespecíficas y podrían actuar en los mecanismos involucrados en regulación de la PA en el corto plazo, a través de la regulación en la musculatura lisa de capa intermedia de los vasos sanguíneos y en el largo plazo, a través del sistema renina angiotensina.

Por último, es necesario un estudio amplio para la utilización de compuestos activos de origen natural, ya sea que provengan de las plantas, algas u hongos, el cual debe ser sistemático para evaluar sus propiedades farmacéuticas, farmacológicas, toxicológicas, clínicas y

terapéuticas, determinando la calidad, eficacia y seguridad para el uso en seres humanos. Sin embargo, dado que la toxicidad en los animales y los seres humanos es genéticamente diversa y puede responder de forma diferente, a partir de estos resultados podemos deducir que este trabajo nos deja abierto el camino para avanzar más, profundizar conocimientos y entendimientos de cuáles son los terpenos que podrían interactuar en el control de la PA.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Sattar, E., Zaitoun, A.A., Farag, M.A., Gayed, S.H.E., & Harraz, F.M. (2010). Chemical composition, insecticidal and insect repellent activity of *Schinus molle* L. leaf and fruit essential oils against *Trogoderma granarium* and *Tribolium castaneum*. *Natural Product Research* 24(3): 226-235.
- Adams R. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. (4th Ed.) Allured Publishing, Carol Stream, Illinois, USA, 804p.
- Adams R.P. (2001). *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*; Allured: Carol Stream, IL.
- Ahad, A., Aqil, M., Kohli, K., Sultana, Y., Mujeeb, M., & Ali, A. (2011). Role of novel terpenes in transcutaneous permeation of valsartan: effectiveness and mechanism of action. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 37(5): 583-596.
- Ajayi, A.F., & Raji, Y. (2012). Haematological and serum biochemical indices of pre-pubertal male rabbits fed with graded level of blood-wild sunflower forage meal mixture. *African Journal of Biotechnology* 11(35): 8730-8734.
- Alonso J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Ed. Corpus. 10º Edición.
- Alves, F.H., Crestani, C.C., Resstel, L.B., & Corrêa, F.M. (2014). Both α 1-and α 2-adrenoceptors in the insular cortex are involved in the cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *PloS one* 9(1): e83900.
- American Heart Association (2008). Heart disease and stroke statistics-2008 Update. *Circulation* 117: e25-e146.
- Anderson, Jeffrey L., et al. (2013). "Management of Patients With Peripheral Artery Disease (Compilation of 2005 and 2011 ACCF/AHA Guideline Recommendations) A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." *Journal of the American College of Cardiology* 61 (14): 1555-1570.
- Andhare, R.N., Raut, M.K., & Naik, S.R. (2012). Evaluation of antiallergic and anti-anaphylactic activity of ethanolic extract of *Sanseveiria trifasciata* leaves (EEST) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 142(3): 627-633.
- Arshad, S.H. (2006). Allergy. Allergic reactions. In G.J.Laurent & S.D.Shapiro (Eds.): *Encyclopedia of Respiratory Medicine* (pp.72-80). Oxford: Academic Press.
- Asgary, S., Naderi, G.H., Sarrafzadegan, N., Mohammadifard, N., Mostafavi, S., & Vakili, R. (2000). Antihypertensive and antihyperlipidemic effects of *Achillea wilhelmsii*. *Drugs under Experimental and Clinical Research* 26(3): 89-94.
- Aydin, Y., Kutlay, O., Ari, S., Duman, S., Uzuner, K., & Aydin, S. (2007). Hypotensive effects of carvacrol on the blood pressure of normotensive rats. *Planta Medica* 73 (13): 1365-1371.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomor M. (2008). Biological effects of essential oils. A review. *Food and Chemical Toxicology* 46:446-475.
- Barrachina M.D., Bello R., Martinez Cuesta M.A., Primoyufero E.Y., Esplugues J. (1997). Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus areira* L. *Phytotherapy Research* 11(4): 317-319.

-
- Bastos, J.F.A., et al. (2010). Hypotensive and vasorelaxant effects of citronellol, a monoterpene alcohol, in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 106.4: 331-337.
 - Bello R., Barrachina M.D., Moreno L., Primoyufera E.Y., Espluges J. (1998). Effects an arterial blood-pressure of the methanol and dichloromethanol extracts from *Schinus areira* L. in rats. *Phytotherapy Research* 10 (7): 634-635.
 - Bernstein, K.E. y Berk B.C. (1993). The biology of angiotensin II receptors, *American Journal Kidney Disease* 22: 745-754.
 - Bhat, R.B, Jacobs, T.V. (1995). Traditional herbal medicine in Transkei. *J Ethnopharmacol* 48 (1): 7-12.
 - Bigliani M.C., Grondona E., Zunino P.M., Ponce A.A. (2010). Effects of *Cecropia pachystachya* and *Larrea divaricata* aqueous extracts in mice. *Human Experimental Toxicology* 29(7): 601-606.
 - Bigliani, M.C., Rossetti V. et al. (2012): Chemical compositions and properties of *Schinus areira* L. essential oil on airway inflammation and cardiovascular system of mice and rabbits. *Food and Chemical Toxicology* 50(7): 2282-2288.
 - Biocomercio Sostenible. (2003). Estudio del mercado colombiano de aceites esenciales. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander Von Humboldt. Bogota, Colombia 109p.
 - Bobrovskaya, L., Beard, D., Bondarenko, E., Beig, M.I., Jobling, P., Walker, F.R., Day, T.A., & Nalivaiko, E. (2013). Does exposure to chronic stress influence blood pressure in rats? *Autonomic Neuroscience*.
 - Brugts, J.J., Ninomiya, T., Boersma, E., Remme, W.J., Bertrand, M., Ferrari, R., Fox K., Mac Mahon S., Chalmers J., Simoons Maarten L. (2009). The consistency of the treatment effect of an ACE-inhibitor based treatment regimen in patients with vascular disease or high risk of vascular disease: a combined analysis of individual data of advance, europa, and progress trials. *European Heart Journal* 30: 1385-1394.
 - Burt, S.A. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - A Review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223– 253.
 - Caldwell, P.R., Seegal B.C., Hsu K.C., Das M., Soffer R.L. (1976). Angiotensin-converting enzyme: vascular endothelial localization. *Science* 191: 1050-1051.
 - Calixto, J.B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in latin america: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 131–134.
 - Campana, E.M.G., Brandão, A.A., Pozzan, R., França, M.D.F., Fonseca, F.L., Pizzi, O.L., & Brandão, A.P. (2009). Blood pressure in young individuals as a cardiovascular risk marker. The Rio de Janeiro study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 93(6): 657-665.
 - Castañeda M.L, Muñoz A, Martínez J.R, Stashenko E. (2007). Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia Et Technica XIII* 33:165-166.
 - Castro L.S, Perazzo F.F., Maistro E.L. (2009). Genotoxicity testing of *Ambelania occidentalis* (Apocynaceae) leaf extract in vivo. *Genetic Molecular Research* 13(2): 440–447. doi: 10.4238/vol18-2gmr588.

- Cauvin, C., & Malik, S. (1984). Induction of Ca⁺⁺ influx and intracellular Ca⁺⁺ release in isolated rat aorta and mesenteric resistance vessels by norepinephrine activation of alpha-1 receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 230 (2): 413-418.
- Chávez. Haydée Irais León (2009). Efecto del estrés agudo por restricción de movimiento en la producción de IgA y en el número de linfocitos T y B del en ratones balb/c. Tesis Doctoral.
- Chin, Y.W., Balunas M.J., Chai H.B., Kinghorn A.D. (2006). Drug discovery from natural sources. *AAPS J* 8: 239-253.
- Chirino, M., Cariac M., Ferrero A.A. (2001). Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus areira* L. (Anacardiaceae) sobre larvas neonatas de *Cydia Pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Bol San Veget Plagas* 27: 305-314.
- Chizzola, R. (2012). Composition and variability of the essential oil of *Salvia nemorosa* (Lamiaceae) from the Vienna area of Austria. *Natural Product Communications* 7(12): 1671-1672.
- Chrubasik, S., Künzel, O., Black, A., Conradt, C., & Kerschbaumer, F. (2001). Potential economic impact of using a proprietary Willow bark extract in outpatient treatment of low back pain: an open non-randomized study. *Phytomedicine* 8(4): 241-251.
- Clardy, J., Walsh C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature* 432:829-837.
- Cordell, G.A, Colvard M.D. (2005). Some thoughts on the future of thnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 5-14.
- da Silva, T.B., Menezes, L.R., Sampaio, M.F., Meira, C.S., Guimarães, E.T., Soares, M.B., & Costa, E.V. (2013). Chemical composition and anti-Trypanosoma cruzi activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopiia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). *Natural Product Communications* 8(3): 403-406.
- Das, S., & De, B. (2013). Evaluation of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory potential of some underutilized indigenous fruits of West Bengal using an in vitro model. *Fruits* 68(06): 499-506.
- Davicino, R., Mattar, A., Casali, Y., Anesini, C., & Micalizzi, B. (2010). Different activities of *Schinus areira* L.: anti-inflammatory or pro-inflammatory effect. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32(4): 620-627.
- de la Sierra, A., Segura, J., Banegas, J.R., Gorostidi, M., Juan, J., Armario, P., & Ruilope, L.M. (2011). Clinical features of 8295 patients with resistant hypertension classified on the basis of ambulatory blood pressure monitoring. *Hypertension* 57(5): 898-902.
- Debelle, F.D., Vanherweghem, J.L., Nortier, J.L. Aristolochic. (2008). Acid nephro-pathy: a worldwide problem. *Kidney Int*: 13:158–169. doi: 10.1038/ki.2008.129.
- Deng, G.B., Zhang, H.B., Xue, H.F., Chen, S.N., & Chen, X.L. (2009). Chemical composition and biological activities of essential oil from the Rhizomes of iris bulleyana. *Agricultural Sciences in China* 8(6): 691-696.
- Di-Palma, J.R. (1990). Antihypertensive drugs. In *Basic Pharmacology in Medicine*. Edited by Di-Palma JR, Di-Gregorio GJ. New York: McGraw-Hill; 421–435.

-
- Dordevic, A., Zlatkovic, B., Lazarevic, J., & Palic, R. (2011). A detailed chemical composition and antimicrobial activity of *Hypericum richeri* Vill. subsp. *Grisebachii* (Boiss.) Nyman essential oil from Serbia. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(23): 5486-5492.
 - Du, D., Chen, J., Liu, M., Zhu, M., Jing, H., Fang, J., Shen, L., Zhu, D., Yu, J., & Wang, J. (2013). The effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) in the rostral ventrolateral medulla of rats on stress-induced hypertension. *PLoS One* 8 (8): e70976.
 - Duhau, A.J., Pino, M.S., Houssay, R.H. (2000). En: Houssay Albero B. Cingolani HE. *Fisiología Humana de Houssay*. (Ed) El Ateneo, Buenos Aires. Séptima edición.
 - Duke, J.A. *Handbook of Medicinal Herbs*. Ed. CRC Press. Boca Raton. Florida (1985).
 - Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, K.A., Foo, L.Y., & Perry, N.B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry* 101(4): 1417-1424.
 - El-Azzouny, M.A. (2010). Towards safe and effective phytomedicines: the need for standardization. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*: 7-7.
 - Ennigrou, A., et al. (2011). Leaf volatile oil constituents of *Schinus terebinthifolus* and *Schinus molle* from Tunisia. *Foodbalt* 1: 90-92.
 - Esquivel-Gutiérrez, E.R. (2013). Plants used in Mexican folk medicine with antidiabetic and antihypertensive properties Edgar R. Esquivel-Gutiérrez, Ruth Noriega-Cisneros, Alfredo Saavedra-Molina, Rafael Salgado-Garciglia. *Pharmacology Online* 2: 15-23.
 - Fernandes, E.S., Passos, G.F., Medeiros, R., daCunha, F.M., Ferreira, J., Campos, M.M., Pianowski, L.F., Calixto, J.B. (2007). Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology* 569: 228–236.
 - Fernández, L.F., Palomino, O.M., & Frutos, G. (2013). Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence in Health-Related Quality of Life. *Journal of Ethnopharmacology* 151(1): 509-516.
 - Ferrero, A., Sánchez Chopa, C., Werdin, J., Alzogaray, R. (2007). Repellence and toxicity of *Schinus molle* extracts on *Blattella germanica*. *Fitoterapia* 78: 311-314.
 - Flack, J.M., Peters, R., Shafi, T., Alrefai, H., Nasser, S.A., Crook E. (2003). Prevention of hypertension and its complications: theoretical basis and guidelines for treatment. *Journal of American Society Nephrology* 14(Suppl.2): S92–S98.
 - Galvez Ranilla, L., Kwon, Y., Apostolidis, E., Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology* 101 (12): 4676-4689.
 - García Triana, B.E., Saldaña Bernabeu, A., & Saldaña García, L. (2013). El estrés oxidativo y los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 12(2): 187-196.
 - Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.Z., Xie, X.Q. & Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(26): 9099-9104.

-
- Ghayur, M.N., Janssen, L.J. (2010). A natural way to cardiovascular health. *Nature Review Cardiology* 7(3): 1–2.
 - Gilani, A.H., Rahman, A.U. (2005). Trends in Ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 43-49.
 - Giusti, M., Lacchini, R., Hugo Farina, O., & Rule, R. (2012). Biochemical and hematological parameters and productivity of rabbits fed low and normo-protein diets. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 46(2): 213-219.
 - Gonzalez-Muñoz, A., Quesille-Villalobos, A.M., Fuentealba, C., Shetty, K., & Galvez Ranilla, L. (2013). Potential of Chilean native corn (*Zea mays* L.) accessions as natural sources of phenolic antioxidants and in vitro bioactivity for hyperglycemia and hypertension management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(46): 10995-11007.
 - Graßmann, J. (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins & Hormones* 72: 505-535.
 - Guala, M.S, Elder, H.V., Perez G., Chiesa A. (2009). Evaluation of the antioxidant power of fractions of *Schinus areira* L. Essential oil obtained by vacuum distillation. *Información Tecnológica* 20: 83-88.
 - Guardiola, V.G., D.E. Miguel P., Primo E. (1990). Repellent activity against *Blattella germanica* of components of *Schinus areira* L. *Revista Agroquímica Tecnológica Alimentos* 30 (3): 341-346.
 - Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27(1): 1-93.
 - Hjemdahl, P., & Esler, M. (2012). Cardiovascular and autonomic responses to stress. *Stress and Cardiovascular Disease*: 31-53.
 - Joukar, S., Askarzadeh, M., Shahouzehi, B., Najafipour, H., & Fathpour, H. (2013). Assessment of safety and therapeutic efficacy of *Rosa damascena* and *Quercus infectoria* on cardiovascular performance of normal and hyperlipidemic rabbits: physiologically based approach. *Journal of Toxicology*. doi:10.1155/2013/769143
 - Kaore, S.N., Amane, H.S., & Kaore, N.M. (2013). Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 27(1): 35-50.
 - Kaur, G., Athar, M., Alam, M.S. (2010). Dietary supplementation of *Silymarin* protects against chemically induced nephrotoxicity, inflammation and renal tumor promotion response. *Investigation of New Drugs* 28: 703–713.
 - Khan, A.U., Mustafa, M., Khan, A., & Murugan, D. (2012). Hypotensive effect of *Gentiana floribunda* is mediated through Ca⁺⁺ antagonism pathway. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 12(1): 121.
 - Khayyal, M. T., El-Ghazaly, M. A., Abdallah, D. M., Nassar, N. N., Okpanyi, S. N., & Kreuter, M. H. (2002). Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats. *Arzneimittel Forschung* 52(11): 797-802.
 - Kitic, D., Brankovic, S., Radenkovic, M., Savikin, K., Zdunic, G., Kocic, B., & Velickovic-Radovanovic, R. (2012). Hypotensive, vasorelaxant and cardiodepressant activities of the

- ethanol extract of *Sideritis raeseri* spp.raeseri Boiss & Heldr. Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society 63(5): 531-535.
- Koehn, F.E, Carter, T.C. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. Nature Review Drug Discovery 4: 206-220.
 - Koehn, F.E. (2008). High impact technologies for natural products screening. Natural Compounds as Drugs Volume I. Birkhäuser Basel: 175-210.
 - Korkina, L. G. (2007). Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. Cellular Molecular Biology 53(1) 15-25.
 - Koroch, A., Juliani, R., Zygadlo, J.A. (2007). Bioactivity of essential oil and their components. In: Berger (Ed). Flavours and Fragrances Chemistry. Springer-Verlag, Berlin. Cap 5, 1-80.
 - Kramer, F.L. (1957). The pepper tree *Schinus areira*. Economy Botanica 11: 323-326.
 - Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Jiang, C., Penninger, J.M. (2006). Lessons from SARS: control of acute lung failure by the SARS receptor ACE2. Journal of Molecular Medicine 84: 814-820.
 - Lagerwerf, F. M., Wever, R. M., van Rijn, H. J., Versluis, C., Heerma, W., Haverkamp, J., & Boer, P. (1998). Assessment of Nitric Oxide Production by Measurement of [¹⁵N] Citrulline Enrichment in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Analytical Biochemistry 257(1): 45-52.
 - Lahlou, S., Magalhaes, P.J., de Siqueira, R.J., Figueiredo, A.F., Interaminense, L.F., Maia, J.G., & Sousa, P.J. (2005). Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. Journal of Cardiovascular Pharmacology 46 (4): 412-421.
 - Låstbom, L., Boman, A., Johnsson, S., Camner, P., & Ryrfeldt, Å. (2003). Increased airway responsiveness of a common fragrance component, 3-carene, after skin sensitisation—a study in isolated guinea pig lungs. Toxicology Letters 145(2): 189-196.
 - Lawless, J. (2003). Aceites esenciales para aromaterapia. Diccionario completo del uso de aceites esenciales en aromaterapia y fitoterapia. Editores: Susaeta Ediciones, S.A.España. ISBN 84-305-3913-1.
 - Lefkowitz, R.J., & Willerson, J.T. (2001). Prospects for cardiovascular research. Journal of the American Medical Association 285(5): 581-587.
 - Leiva Suero, L.E., del Pozo Jeréz, H.A., & Pérez Caballero, D. (2000). Óxido nítrico y su relación con la hipertensión arterial. Revista Cubana de Medicina 39(3): 174-179.
 - Liby, K.T, Yore, M.M., Sporn, M.B. (2007). Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer. Natural Review Cancer 7: 357-369.
 - Light, M.E., Sparg, S.G., Stafford, G.I., Staden, J. (2005). Riding the wave: south Africa's contribution to ethnopharmacological research over the last 25 years. Journal of Ethnopharmacology 100: 127–130.
 - Lima, F.J., Brito, T.S., Freire, W., Costa, R.C., Linhares, M.I., Sousa, F.C., & Magalhães, P.J. (2010). The essential oil of *Eucalyptus tereticornis*, and its constituents α - and β -pinene, potentiate acetylcholine-induced contractions in isolated rat trachea. Fitoterapia 81(6): 649-655.

-
- Lima, T, Cardoso, et al. (2012). Structural relationships and vasorelaxant activity of monoterpenes. *DARU. Journal of Pharmaceutical Sciences* 20(1): 23.
 - Lo Presti, M.S., Leid, J.G., Grondona, E., Monroy, F.P., Bigliani, C.M., Pessah, O., Ponce A.A. (2010). Alterations in electrocardiographic parameters induced by acute infection with *Pseudomonas aeruginosa* wild-type and mucoid strains in mice. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 381-385.
 - Mac Mahon S., Peto R., Cutler J., Collins R., Sorlie P., Neaton J., Abbott R., Godwin G., Dyer A., Stamler J. (1990). Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 335(8692): 765–774.
 - Machado, D.G., Bettio, L.E., Cunha, M.P., Santos, A.R., Pizzolatti, M.G., Brighente I.M., Rodrigues A.L. (2008). Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology* 587: 163-168.
 - Machado, D.G., Kaster, M.P., Binfaré, R.W., Dias, M., Santos, A.R.S., Pizzolatti M.G., Brighente I.M.C., Rodrigues A.L.S. (2007). Antidepressantlike effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro Psychopharmacology Biology of Psychiatry* 31: 421-428.
 - Mancia, G., Volpe, R., Boros, S., Ilardi, M., Giannattasio, C. (2004). Cardiovascular risk profile and blood pressure control in Italian hypertensive patients under specialist care. *Journal of Hypertension* 22(1): 51–57.
 - Marini, V., Babini, A., & Moretti, E. (2004). Determinación de citrulina y óxido nítrico en el suero de pacientes con artritis reumatoidea y otras enfermedades reumáticas. *Archivos de Alergia e Inmunología Clínica* 35: 39-45.
 - Mariscal-Quintanar M.G., Garcia-Escamilla R.M., Garcia-Escamilla N., Torres-Lopez J., Bautista-Ordóñez J.A., Rosiles-Martínez R. (1997). Effect of ingesting *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* on the cytology of bone marrow and on serum albumin and globulin concentrations. *Veterinaria Mexico* 28: 75-81.
 - Marongiu, B., Porcedda A.P.S., Casu R., Pierucci P. (2004). Chemical composition of the oil and supercritical CO₂ extract of *Schinus molle* L. *Flavour and Fragrance Journal* 19: 554-558.
 - Martínez, G.J. (2008). Medicinal plants used by the Criollos of Calamuchita to treat blood, cardiovascular, and neuroendocrinous diseases. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* 13(3): 55-82.
 - Mathison, Y., Estada, S., Rojas, A., Mata, R., & Israel, A. (2011). Mecanismo molecular de la acción relajante inducida por compuestos aromáticos aislados de la *Scaphyglottis livida* en el íleo de la rata. *Revista de la Facultad de Farmacia* 73(2): 37-42.
 - Maynard, Luana G., et al. (2011). Chemical composition and vasorelaxant effect induced by the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) in rat mesenteric artery. *Indian Journal of Pharmacology* 43(6): 694.
 - Mehta, P.K., Griendling, K.K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology and Cell Physiology* 292(1): C82-C97.
-

-
- Mendelson R, Balick MJ. (1995). The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economy Botanica* 49: 22-228.
 - Menezes, I.A., Barreto, C.M., Antonioli, Â.R., Santos, M.R., & de Sousa, D.P. (2010). Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. *Zeitschrift für Naturforschung.C. Journal of Biosciences* 65(9): 562.
 - Montecucco, F., Pende, A., & Mach, F. (2009). The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. *Mediators of Inflammation* 75: 2406.
 - Moreira, F.V., Bastos, J.F., Blank, A.F., Alves, P.B., & Santos, M.R. (2010). Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20(6): 904-909.
 - Morris, N. (2002). The effects of lavender (*Lavendula angustifolium*) baths on psychological well-being: two exploratory randomised control trials. *Complementary Therapies in Medicine* 10(4): 223-228.
 - Munglue, P., Eumkep, G., Wray, S., & Kupittayanant, S. (2013). The effects of Watermelon (*Citrullus lanatus*) extracts and l-Citrulline on rat uterine contractility. *Reproductive Sciences* 20(4): 437-448.
 - Murray, A.P., Frontera, M.A., Tomasa, M.A., Muleta, M.C. (2005). Gas Chromatography-Mass Spectrometry study of the essential oils of *Schinus longifolia* (Lindl.) Speng., *Schinus fasciculata* (Griseb.) IM Johnst, and *Schinus areira* L. *Z Naturforsch* 60: 25-29.
 - Murray, A.P., Gurovic, M.S., Rodríguez, S.A., Murray, M.G., Ferrero, A.A. (2009). Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oils from *Schinus areira* L. and *Schinus longifolia* (Lindl.) Speng. *Natural Products Communications* 4(6): 873-876.
 - Mutolo, D., Cinelli, E., Bongiani, F., Evangelista, S., & Pantaleo, T. (2013). Comparison between the effects of lisinopril and losartan on the cough reflex in anesthetized and awake rabbits. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 64(2): 201-210.
 - Mwangi, J.W., Thoithi, G.N., & Kibwage, I.O. (2010). Essential oil bearing plants from Kenya: chemistry, biological activity and applications. *African natural plant products. New Discoveries and Challenges in Chemistry and Quality* 495-525.
 - Newman, S.H., Anderson, D.W., Ziccardi, M.H., Trupkiewicz, J.G., Tseng, F.S., Christopher, M.M., & Zinkl, J.G. (2000). An experimental soft-release of oil-spill rehabilitated American coots (*Fulica americana*): II. Effects on health and blood parameters. *Environmental Pollution* 107(3): 295-304.
 - Ng, T.B., F.Liu, and Z.T.Wang. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life sciences* 66(8): 709-723.
 - Novais, M. H., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 93(2), 183-195.
 - Olafsson, K., Jaroszewski, J.W., Smitt, U.W., Nyman, U. (1997). Isolation of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus areira*. *Planta Medica* 63: 352-353.

-
- Oliveira, Aurylene C., et al. (2012). *Erythroxylum pungens* elicits vasorelaxation by reducing intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle cells of rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22(2): 436-442.
 - Ordóñez, R.M., Zampini, I.C., Rodríguez, F., Cattaneo, F., Sayago, J.E., & Isla, M.I. (2011). Radical scavenging capacity and antimutagenic properties of purified proteins from *Solanum betaceum* fruits and *Solanum tuberosum* tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(16): 8655-8660.
 - Paul, M., Mehr, A.P., & Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews* 86(3): 747-803.
 - Peixoto-Neves, D., et al. (2010). Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 24(3): 341-350.
 - Pérez López, A.J., & Carbonell, Barrachina, Á.A. (2006). Volatile odour components and sensory quality of fresh and processed mandarin juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86(14): 2404-2411.
 - Perez, C.Y., Anesini, C. (1994). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinean medicinal plants. *Fitoterapia* 65(2): 169-172.
 - Phillips, D.R., Rasbery, J.M., Bartel, B., Matsuda, S.P. (2006). Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion Plant Biology* 9: 305-314.
 - Piton, G., Cypriani, B., Monnet, E., Navellou, J.C., Manzon, C., Barbot, O., & Capellier, G. (2009). Plasma citrulline kinetics and prognostic value in the critically ill patient. *Critical Care* 13: 1-1.
 - Ranilla, L.G., Kwon, Y.I., Apostolidis, E., Shetty, K. (2010). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresch Technology* 101: 4676-4689.
 - Redfors, B., Shao, Y., & Omerovic, E. (2014). Influence of anesthetic agent, depth of anesthesia and body temperature on cardiovascular functional parameters in the rat. *Laboratory Animals* 48(1): 6-14.
 - Revista de la Universidad Nacional de Córdoba. (1915). *Actos y Documentos Oficiales* 2: 6 495.
 - Rouibi, A., F.Saidi, and H.Boutoumi. (2009). Identification par CG/MS et Détermination des Effets Antimicrobiens des Huiles Essentielles du Faux Poivrier (*Schinus molle* L.). *International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants-SIPAM2009* 853.
 - Rouibi, A., Saidi, F., Boutoumi, H. (2010). Identification par CG/MS et détermination des effets antimicrobiens des huiles essentielles du faux poivrier (*Schinus areira* L.). *Acta Horticultura* 853: 219-228.
 - Ruffa, M.J., Ferraro, G., Wagner, M.L., Calcagno, M.L., Capos, R.H., Cavallaro, L. (2002). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extract on human hepatocellular carcinoma cell line. *Journal of Ethnopharmacology* 79: 33-59.

-
- Saad, B., Azaizeh, H., Abu-Hijleh, G., Said, O. (2006). Safety of traditional Arab herbal medicine. *Evidence-based Complementary Alternative* 13:433–439.doi: 10.1093/ecam/nel058.
 - Saika, A.P., Ryakala, V.K., Sharma, P., Goswami, P., Bora, U. (2006). Ethnobotany of medicinal plants used by assamese people for various skin ailments and cosmetics. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 149–157.
 - Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R.S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* 34: 3–21.
 - Santos, K.T., Lima, B.G., Tietbohl, L.A.C., Fernandes, C.P., Carestiato, J.C., Sant'Anna, L.S., Bressa, P.A.C., Santos, M.G., Ruppelt, B.M., Moreira, C.M., Rocha, L. (2013). Effects of essential oil from leaves of *Eugenia sulcata* spring ex Mart. (Myrtaceae) on hemodynamic parameters of wistar rats. *Latin American Journal of Pharmacy* 32(6): 944-947.
 - Santos, M.R.V., et al. (2011). Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(4): 764-771.
 - Schellekens, G. A., De Jong, B. A., Van den Hoogen, F. H., Van de Putte, L. B., & van Venrooij, W. J. (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *Journal of Clinical Investigation* 101(1): 273.
 - Seeff, L.B. (2007). Herbal hepatotoxicity. *Clinical Liver Disease* 13:577–596.doi: 10.1016/j.cld.2007.06.005.
 - Sensch, O., Vierling, W., Brandt, W., Reiter, M. (2000). Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of beta-caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *British Journal of Pharmacology* 131(6): 1089-1096.
 - Serrano, N.C., Díaz, L.A., Páez, M.C., & Casas, J.P. (2010). Relevancia funcional de los polimorfismos del gen de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud* 42(1): 66-77.
 - Shiina, Y., Funabashi, N., Lee, K., Toyoda, T., Sekine, T., Honjo, S., & Komuro, I. (2008). Relaxation effects of lavender aromatherapy improve coronary flow velocity reserve in healthy men evaluated by transthoracic Doppler echocardiography. *International Journal of Cardiology* 129(2): 193-197.
 - Singh, T.P., Schon, M.P., Wallbrecht, K., Michaelis, K., Rinner, B., Mayer, G., Schmidbauer, U., Strohmaier, H., Wang, X.J., & Wolf, P. (2010). 8-methoxypsoralen plus ultraviolet A therapy acts via inhibition of the IL-23/Th17 axis and induction of Foxp3+ regulatory T cells involving CTLA4 signaling in a psoriasis-like skin disorder. *Journal of Immunology* 184 (12): 7257-7267.
 - Slipack, O.E. (1991). Historia y concepto de estrés. *Revista Argentina de Clínica Neuropsiquiátrica* (3): 355-360.
 - Sociedade Brasileira de Cardiologia (2007). V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arquivos Brasileira de Cardiologia* 89: 24-79.
 - Solomon, D., Adams, J., & Graves, N. (2013). Economic evaluation of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of mild to moderate depression. *Journal of Affective Disorders* 148 (2-3): 228–234.
-

-
- Stashenko, E.E, Jaramillo, B.A, Martínez, J.R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia verbenaceae. *Revista Academia Colombiana de Ciencias* 27: 579-597.
 - Tang, J.L., Liu, B.Y., Ma, K.W. (2008). Traditional Chinese medicine. *Lancet*: 13:1938–1940. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61354-9.
 - Tedgui, A., & Mallat, Z. (2006). Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews* 86(2): 515-581.
 - Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9 (3): 297-304.
 - Torres, A.M., Camargo, F., Ricciardi, G.A.L., Ricciardi, A.I.A. & Dellacassa, E. (2006). *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas E-019: Resumen*.
 - Turiel, N.A., Ribeiro, A.F., Carvalho, E.E.N., Domingos, V.D., Lucas, F.C.A., Carreira, L.M.M., & Maia, J.G.S. (2013). Essential oils composition of croton species from the amazon. *Natural Product Communications* 8(10): 1471-1472.
 - van der Velden, W.J.F.M., Herbers, A.H.E., Brüggemann, R.J.M., Feuth, T., Donnelly, J.P., & Blijlevens, N.M.A. (2013). Citrulline and albumin as biomarkers for gastrointestinal mucositis in recipients of hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation* 48: 977-981.
 - Veiga-Junior, V.F., Pinto, A.C., Maciel, M.A.M. (2005). Medicinal plants: safe cure? *Quimica Nova* 13: 519–528. doi: 10.1590/S0100-40422005000300026.
 - Vokurka, S., Svoboda, T., Rajdl, D., Sedláčková, T., Racek, J., Koza, V., & Trefil, L. (2013). Serum citrulline levels as a marker of enterocyte function in patients after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation—a pilot study. *Medical science monitor. International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 19: 81.
 - Wang, G., Tang, W., Bidigare, R. Terpenoids as therapeutic drugs and pharmaceutical agents. Zhang L., Demain A.L. (2005) (Eds). *Natural Products: Drugs Discovery and Therapeutic Medicine*. Humana Press Inc, Totowa, NJ. 197-227.
 - Wang, G.J., Shum, A.Y.C., Lin, Y.L., Liao, J.F., Wu, X.C., Ren, J., & Chen, C.F. (2001). Calcium channel blockade in vascular smooth muscle cells: major hypotensive mechanism of s-petasin, a hypotensive sesquiterpene from petasites formosanus. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297 (1): 240-246.
 - Wang, Y., Huang, Y., Lam, K.S., Li, Y., Wong, W.T., Ye, H., & Xu, A. (2009). Berberine prevents hyperglycemia-induced endothelial injury and enhances vasodilatation via adenosine monophosphate-activated protein kinase and endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovascular Research* 82(3): 484-492.
 - World Health Organization (WHO). (2007). *Monographs on selected medicinal plants*. Vol 3. Geneva: WHO.
 - Xie, J.H., Chen, Y.L., Wu, Q.H., Wu, J., Su, J.Y., Cao, H.Y., & Su, Z.R. (2013). Gastroprotective and anti-Helicobacter pylori potential of herbal formula HZJW: safety and efficacy assessment. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13(1): 119.
 - Yáñez, C.A., Rios, N., Mora, F., Rojas, L., Diaz, T., Velasco, J., & Melendez, P. (2011). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. de los llanos venezolanos. *Revista Peruana de Biología* 18(2): 149-151.

- Yueqin, R., Recio, M., Manez, S., Giner, R., Cerda N., Rios J. (2003). Isolation of two triterpenoides and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. *Planta Medica* 69: 893-898.
- Zunino M.P., Novillo Newton M., Maestri D.M., Zygadlo J.A. (1997). Composition of the essential oil of *Baccharis crispa* Spreng. and *B. salicifolia* (Ruiz et Pavón) Pers. grown on Córdoba. *Flavour and Fragrance Journal* 12: 405-407.
- Zunino, M.P., López, M.L. and Zygadlo, J.A. (2003). Medicinal plants of Argentina. Pharmacological properties and phytochemistry. In: F Imperato (Ed.) *Advances in Phytochemistry*. Editorial Research Signpost. Kerala, India. Chapter 7: 209-245.
- Zunino, M.P., López, M.L., and Zygadlo, J.A. (2005). Tagetone induces changes in lipid composition of *Panicum miliaceum* L. roots. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 8(3): 239-249.
- Zunino, M.P., Turina, A.V., Zygadlo, J.A., & Perillo, M.A. (2011). Stereoselective effects of monoterpenes on the microviscosity and curvature of model membranes assessed by DPH steady state fluorescence anisotropy and light scattering analysis. *Chirality* 23(10): 867-877.
- Zwenger, S., & Basu, C. (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology Molecular Biology Review* 3(1): 1-7.
- Zygadlo, J.A, Juliani Jr, H.R. (2000). Bioactivity of essential oil components. Minireview: *Current Topics in Phytochemistry* 3: 203-214.

Anexo 1. Efectos del AE de *S. areira* sobre la presión arterial en conejos despiertos normotensos: Tratamiento crónico de 10 días

		n	Media	SD	Min	Mx
Trto de 10 días	Sistólica	5	78,84	16,4	20	108
Trto de 10 días	Diastólica	5	69,34	15,96	16	95
Trto de 10 días	Media	5	73,97	16,33	18	102
Basal	Sistólica	5	86,05	15,79	45	134
Basal	Diastólica	5	75,75	12,11	45	102
Basal	Media	5	78,64	14,54	39	105

Anexo 2. Efectos del AE de *S. areira* de la Fracción Hidrocarbonada-I sobre la presión arterial en conejos despiertos normotensos

	Tiempo	N	Media	SD	Min	Mx
Sistólica	10 min	6	92,59	3,33	83	99
Diastólica	10 min	6	82,13	4,46	72	92
Media	10 min	6	87,97	3,86	77	96
Sistólica	15 min	6	90,84	3,28	83	95
Diastólica	15 min	6	79,44	2,77	72	84
Media	15 min	6	85,69	3,32	77	89
Sistólica	30 min	5	90,45	3,32	83	95
Diastólica	30 min	5	78,85	3,96	69	86
Media	30 min	5	85,24	3,7	77	89
Sistólica	5 min	6	94,29	1,72	93	99
Diastólica	5 min	6	83,65	4,11	80	92

Media	5 min	6	89,71	2,49	88	96
Basal	Sistólica	5	86,05	15,79	45	134
Basal	Diastólica	5	75,75	12,11	45	102
Basal	Media	5	78,64	14,54	39	105

Anexo 3. Efectos AE de *S. areira* de la Fracción Hidrocarbonada-II sobre la presión arterial en conejos despiertos normotensos

Variable	Tiempo	n	Media	D.E.	Mín	Máx
Sistólica	10 min	5	76,23	17,36	27	104
Diastólica	10 min	5	69,91	16,9	9	92
Media	10 min	5	70,77	18,22	23	96
Sistólica	15 min	6	76,24	18,91	27	117
Diastólica	15 min	6	70,02	18,04	9	104
Media	15 min	6	71	19,41	23	111
Sistólica	30 min	5	90,94	16,91	27	120
Diastólica	30 min	5	86,59	16,23	23	112
Media	30 min	5	81,67	17,24	9	107
Sistólica	5 min	5	75,77	18,1	27	104
Diastólica	5 min	5	68,5	19,3	9	89
Media	5 min	5	70,45	18,61	23	94

Anexo 4. Efectos del AE de *S. areira* sobre la contractilidad miocárdica de corazón *ex vivo* de ratón Albino swiss

Grupo	Variable	n	Media	E.E.	Mín	Máx
Aguaribay	NE 10-8 M	6	-0,07	0,03	-0,20	0,00
Aguaribay	NE 10-7 M	6	0,10	0,07	-0,10	0,40

Aguaribay	NE 5x10-7 M	6	0,18	0,05	0,00	0,30
Aguaribay	NE 10-6 M	6	0,13	0,05	0,00	0,30
Aguaribay	NE 5x10-6 M	6	0,12	0,04	0,00	0,20
Aguaribay	NE 10-5 M	6	-0,02	0,07	-0,30	0,20
N + NE	NE 10-8 M	11	0,12	0,04	0,00	0,27
N + NE	NE 10-7 M	11	0,33	0,07	0,08	0,75
N + NE	NE 5x10-7 M	11	0,49	0,08	0,18	1,25
N + NE	NE 10-6 M	11	0,51	0,10	0,21	1,25
N + NE	NE 5x10-6 M	11	0,52	0,13	0,00	1,50
N + NE	NE 10-5 M	11	0,47	0,17	-0,19	1,75



Chemical compositions and properties of *Schinus areira* L. essential oil on airway inflammation and cardiovascular system of mice and rabbits

María C. Bigliani^a, Víctor Rossetti^b, Ezequiel Grondona^a, Silvina Lo Presti^c, Patricia M. Paglini^c, Virginia Rivero^d, María P. Zunino^e, Andrés A. Ponce^{a,f,*}

^a Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^b Cátedra de Pequeños Animales, Dpto. Académico de Ciencias y Tecnologías Aplicadas a la Producción, al Ambiente y al Urbanismo, Universidad Nacional de la Rioja, Argentina

^c Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^d Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^e Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales (IMBIV-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

^f Cátedra de Fisiología Humana, Dpto. de Ciencias de la Salud y Educación, Universidad Nacional de la Rioja, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2011

Accepted 15 April 2012

Available online 21 April 2012

Keywords:

Essential oil

Terpenes

Schinus areira

Lung inflammation

Cardiovascular

ABSTRACT

The main purpose was to investigate the effects of essential plant-oil of *Schinus areira* L. on hemodynamic functions in rabbits, as well as myocardial contractile strength and airways inflammation associated to bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) in mice.

This study shows the important properties of the essential oil (EO) of *S. areira* studied and these actions on lung with significant inhibition associated to LPS, all of which was assessed in mice bronchoalveolar lavage fluid and evidenced by stability of the percentage of alveolar macrophages, infiltration of polymorphonuclear leukocytes and tumor necrosis factor- α concentration, and without pathway modifications in conjugated dienes activity. Clinical status (morbidity or mortality), macroscopic morphology and lung/body weight index were unaffected by the administration of the EO *S. areira*.

Furthermore, the *ex vivo* analysis of isolated hearts demonstrated the negative inotropic action of the EO of *S. areira* in a mice model, and in rabbits changes in the hemodynamic parameters, such as a reduction of systolic blood pressure. We conclude that EO *S. areira* could be responsible for modifications on the cardiovascular and/or airway parameters.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Essential oils (EOs) are aromatic components obtained from different plant parts such as flower, buds, seed, leaves and fruits, and are composed of secondary metabolites such as terpenes. Terpenes act as a mechanism of defense against pathogen attack (viruses, herbivores, microbes or competing plants), which, despite extraction and distillation of the plants, do not lose their characteristics and composition. They have been employed for a long time in different industries, mainly in perfumes (fragrances and aftershaves), food (as flavoring and preservatives), pharmaceuticals (therapeutic action) and for centuries in traditional medicine (Bakkali et al., 2008).

Abbreviations: EO, essential oil; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; AMs, alveolar macrophages; PMNs, polymorphonuclear leukocytes; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; LPS, lipopolysaccharide; CDs, conjugated dienes; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; MAP, mean arterial pressure.

* Corresponding author at: Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Santa Rosa 1085, Córdoba 5000, Argentina. Tel./fax: +54 3514332019.

E-mail address: andresaponce@daad-alumni.de (A.A. Ponce).

Aromatic plants contain volatile oils that exhibit a variety of biological properties, that can release chemical compounds that interact with volcanic activity, forest fires, natural gas leaks, wood drying, etc. involving many substances such as methane, carbon dioxide, carbon monoxide, and other volatile compounds that are released in the air as a result of these biological processes and the EOs can have a profound impact on homeostasis of the human (Jia et al., 2010; Kabesch and Roger, 2004; Park et al., 2010; Weschler et al., 2006).

Aromatic components and particulate air pollutants together with their soluble components, may enter the lung and produce local inflammation and cardiac autonomic alteration, modifying the signal transduction of the myocardial adrenergic system, changing the intracellular levels of Ca²⁺ or by altering the sensitivity of certain proteins that regulate this ion and some of these mechanisms might be modulated by the terpenes present in the EO (Menezes et al., 2010; Nielsen et al., 2005).

The contamination with lipopolysaccharide (LPS) an endotoxin from the cell wall of gram-negative bacteria, it is present as a contaminant on airborne particles, including organic dust and cigarette smoke and several authors described that LPS instillation

in mice results in a pulmonary inflammation (Rahman and MacNee, 1998).

The respiratory tract penetration is principally dependent on water solubility of the volatile organic compounds. Moreover, these volatile organic compounds are able to penetrate deeply into the lungs reaching the lower areas, like the alveoli, bronchioles or bronchia, producing a rise of allergic diseases (atopic rhinoconjunctivitis, atopic dermatitis, and asthma) and can even spread into the systemic circulation or to environment (Viegi et al., 2004; Zahed et al., 2010).

The anti-inflammatory activity of EOs has been investigated in inflammatory diseases such as allergy, rheumatism, arthritis and bronchitis (Passos et al., 2007; Süntar et al., 2012). They tend to have low mammalian toxicity, less environmental effects and wide public acceptance (Koroch et al., 2007).

Schinus areira L. [synonymous: *Schinus molle* L. var. *areira* (L.) DC.] commonly called “peppertree”, “molle” and “aguaribay” is a native plant from South America and nowadays it is distributed through Argentina, south-eastern of Brazil, Perú, Colombia, Ecuador, Uruguay and widely distributed in México, Central and Southern of California and West Texas, United States. It is a tree belonging to the Anacardiaceae family (Zunino et al., 2003).

All parts of this tree are used in traditional medicine as antibacterial, antifungal, antirheumatic, anti-conjunctivitis, tuberculosis, bronchitis, cough, etc. (Molina-Salinas et al., 2007; Zunino et al., 2003). A review of the EO composition of this plant was described by Zygadlo and Juliani (2002). This EO possesses antimicrobial activity, fungitoxic activity, antiradical power (Dikshit et al., 1986; Guala et al., 2009; Hayouni et al., 2008; Murray et al., 2009; Simonatto et al., 2011; Zahed et al., 2010).

A mice model of LPS-induced acute lung injury was used to evaluate anti-inflammatory activity of the EO of *S. areira* in lung inflammation and the effects of the EO of *S. areira* in cardiovascular system has not been fully investigated yet and due to the widespread domestic use of this plant, it is necessary to study at cardiorespiratory level.

Therefore, this study was designed to elucidate the response to different concentrations of EO on lung inflammation previously induced by intranasally administration of LPS, in addition to the local expression of TNF- α , lipid-conjugated dienes (CD) levels and cellular migration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Finally, we analyzed the correlation of EO administration with the myocardial contractile strength (inotropic effects) in mice and with the hemodynamic functions in rabbits.

2. Material and methods

2.1. Collection of plant material

Aerial parts (leaves and flowers) of *S. areira* L. (Anacardiaceae) were collected from Mendiolaza, Córdoba, Argentina (31°14' S; 64°15' W).

The voucher specimens have been deposited in the Herbarium of the Museo Botánico de Córdoba, Argentina (M. P. Zunino No. 1341 CORD).

2.2. Essential oils extraction

Samples of at least 200 g of dried plant were hydrodistilled for 1 h using a Clevenger-type apparatus. The EO was dried over anhydrous sodium sulfate and stored at -20 °C to analyzes (Zunino et al., 2000).

2.3. Essential oils gas chromatography and mass spectrometry analyzes

For the quantification of individual components, EO was analyzed using a Perkin-Elmer Clarus 500 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID). A capillary column DB-5 (30 m \times 0.25 mm i.d. and 0.25 μ m coating thickness) was used for the separation of individual components of the EO. Helium was employed as the carrier gas with a flow rate of 1 mL/min. The temperature program

was 60 °C for 4 min, from 60 to 240 at 5 °C/min, with a final hold time of 10 min. The injector and detector were maintained at 260 and 280 °C, respectively. The sample was diluted 1:100 in n-hexane, 0.2 μ L was injected with a 1:100 split ratio.

For the determination of the composition, EO samples were diluted with hexane. The injection volume was 1 μ L. The identification of the terpenes of EO from *S. areira* was realized by GC-MS. A Perkin-Elmer Q700 GC-MS coupled with an ion trap mass detector was employed for the identification. A capillary column DB-5 (60 m \times 0.25 mm i.d. and 0.25 μ m coating thickness) was used for the separation of the components. Helium was used as carrier gas with a flow rate of 0.9 mL/min. The temperature program for the oven and injector was the same as that for the GC-FID. Ionization was realized by electron impact at 70 eV. Mass spectral data were acquired in the scan mode in the m/z range 35–450. Retention indices (RI) of the sample components were determined on the basis of homologous n-alkane hydrocarbons under the same conditions. The compounds were identified by comparing their retention indices and mass spectra with published data (Adams, 2007) and libraries NIST and Adams. The main components were further identified by coinjection of authentic standards (SIGMA, USA). The quantitative composition was obtained by peak area normalization, and the response factor for each component was considered to equal 1 (Zunino et al., 2003).

2.4. Animal preparation

Adult male Swiss albino mice (25–30 g) were randomly distributed in 9 groups and placed in small standard polycarbonate cages (30 \times 20 \times 15 cm, 6 animals per group). Separate groups of animals were used to obtain BALF for cellular counts and CD analysis and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The animals were housed in appropriate facilities and maintained at 24–26 °C with 55–75% humidity and a 12/12-h light/dark cycle with continuous access to standard food and water *ad libitum*.

Experiments with adult male White Argentine rabbits (21 animals per group; 2.5–2.7 kg wt) were obtained from breeding grounds from Córdoba City and caged individually.

The animals were treated gently with regards to all abbreviation of distress. All efforts were made to avoid any unnecessary suffering and the experimental procedure were carried out in strict compliance with the U.S. National Institutes of Health guidelines for the experimental use of animals (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996) and all animals studies were approved by a local animal use committee.

2.5. Study protocol

BALF samples were obtained from lung tissues subjected to the following treatments: Vehicle: instilled only with the phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl; 70 mM NaH₂PO₄; 3 mM KCl; 1.5 mM KH₂PO₄ at 37 °C), or with only one concentration of EO group during 3 h (EO groups: EO 5, EO 30 and EO 300 mg/kg; IP). The others procedures commenced with the administration of LPS followed by the different therapies: LPS (lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*, 100 μ g LPS/kg of mouse body mass; serotype 10, ATCC27316, N° L9147, Sigma Aldrich, USA) during 2 h and were subsequently treated with only one doses from EO group concentration, or Dexamethasone (DX, 2.5 mg/kg; IP) during 3 h. Glucocorticoids such as DX, are widely used as anti-inflammatory agent in various inflammatory lung pathology and DX was used as positive controls dissolved in PBS. In accordance with Davicino et al., (2010), we used the IP injection because the majority of short-term protocols of toxicology effects have been conducted with IP or gavage administration.

2.5.1. Instillation in mice

BALF were obtained as previously reported (Roque et al., 2009). Animals were anesthetized with ether with a short lasting inhalation and acute lung inflammation was induced intranasally (i.t.) with LPS in 60 μ L of PBS solutions. During the experimental anesthetic procedure, the mice were placed under a warming light and the temperature was maintained close to 37 °C. After i.t. through a polyethylene tube, mice were placed in vertical position to insure that the fluid was evenly distributed in both lungs.

After treatments, mice were sacrificed by CO₂ inhalation and immediately after, a mid-line incision was performed in the neck to isolate the trachea. A sterile cannula (22 GA Insyte, Becton Dickinson) was inserted into the trachea and 1-ml of ice-cold PBS was infused and the fluid was collected by aspiration. This procedure was repeated three times by flushing, resulting in a retrieved average volume greater than 90% of the amount previously instilled; these volumes did not differ among treatments. BALF samples were stored in ice until centrifuged at 300 g for 10 min. The supernatant was then discarded, leaving a 0.1–0.15 mL cell pellet. This pellet was re-suspended in 1-ml buffer and a 10- μ L aliquot was used for cell counting using Trypan blue exclusion (0.4%) to determine cell viability; for differential cell counts, May-Grünwald Giemsa staining was used before air-drying and cover slipping. More than two hundred cells obtained by BALF, using morphologic criteria, were counted under the microscope to obtain the percentages of macrophages (MA) or polymorphonuclear neutrophils (PMNs) (Borron et al., 2000). After BALF procedure, the BALF were stored at -80 °C for CD and ELISA.

2.5.2. TNF- α in bronchoalveolar lavage fluid

TNF- α in BALF was quantified by ELISA protocol, according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). The range of detection of these kits was 35–2.240 pg/mL.

2.5.3. Detection of lipid peroxidation products in bronchoalveolar lavage fluid: conjugated dienes

The detection of CD (early oxidation products) levels of the lipids oxidation was extracted from BALF following the procedure by Ogura et al. (1994) with slight modifications. These modifications include: (i) the maximization of the precipitation efficiency, (ii) all experiments were performed twice in triplicate, (iii) 300 μ l of BALF were extracted with 1.6 ml of n-hexane and the CD were measured spectrophotometrically by monitoring the absorbance at 233 nm at room temperature ($e = 25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.6. Cardiac contractility in ex vivo mice

We used *ex vivo* isolated heart to evaluate the myocardial function. A single dose of EO was administered during 3hs (300 mg/kg; IP) and *ex vivo* cardiac contractility was determined. The heart of mice was removed quickly in toto and hung immediately in the Perspex chamber and perfused with 5 mL/min Krebs Ringer Bicarbonate medium (pH 7.4) gassed with 95% O₂ and 5% CO₂; they were kept at a temperature of 32 °C and subjected to increasing concentrations of norepinephrine (μ M): 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 and 10 (Lo Presti et al., 2009).

2.7. Determination of arterial blood pressure in rabbits

Awaken animals were used to avoid the influences the baroreceptor reflex or sympathetic nerve activity intensely influenced by anesthesia and post-surgical. Therefore during the day of the experiment, experienced personnel collaborated to maintain the animals relatively immobile, calm, and tranquil (Matsumura et al., 2001; Menezes et al., 2010).

The effect of EO on the following hemodynamic parameters was evaluated: systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate.

The catheters were inserted into the central ear artery and taped to the ear of each animal, which had previously received local anesthesia with 1% lidocaine. Without restraining the rabbits, needles were intermittently connected to pressure transducer and after hemodynamics parameters had stabilized and the parameters were recorded Monitor (Multipar Feas SA, No. 36851, Argentina) as described: Vehicle group rabbits were studied using PBS infused during 45–50 min, and following the administration of dose of the EO (300 mg/kg; intravenous) using the same animal with the same time periods.

As described above, following the Vehicle administration, using different animals, one single dose of nifedipine 10-mg (Adalat retard; Bayer Argentina) was placed on the tongue of each animal with a syringe-type device; the mouths were kept closed until swallowing was confirmed. Nifedipine is a Ca²⁺ channel antagonist widely used for the treatment of hypertension and nifedipine was used as positive controls (Olivari et al., 1979).

2.8. Statistical analysis

The data were confirmed to be normally distributed by the Kolmogorov–Smirnov test. They were expressed as Means \pm Standard Errors of the Means (SEM). The statistical significance of the differences between treatments and Vehicle was determined by factorial analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple-range test. Differences were considered statistically significant when *p* values were lower than 0.05. Statistical analyzes were performed using Info-Stat software (Córdoba, Argentina, 2010).

3. Results

3.1. Chemical compositions of essential oil of *S. areira*

The separation of the EO components revealed that the chromatographic profile was predominantly composed by monoterpenes compounds (66.4%); the main components were α -pinene (13.80%), limonene (12.81%) and camphene (12.62%). Among minor components, we can mention sesquiterpenic compounds (32.95%) with β -caryophyllene (11.88%) and germacrene D (8.95%) as the main components in this fraction (Table 1).

3.2. Macroscopic evaluation, relative organ weight and clinical observations

The EO did not produce any deleterious effects on the overall performance of mice or rabbits, either on ambulation or in their clinical status during the procedure. No particular macroscopic lesions were found in the necropsies of lungs, liver and kidneys and none of the animals died (data not shown). Different treatments with EO of *S. areira* did not modify the relative organ weight of mice lungs compared to the vehicle group or between treatments groups (Vehicle: 1,16 \pm 0,16, n:5; LPS: 1,07 \pm 0,06, n:6; LPS + DX: 0,98 \pm 0,14, n:6; EO 5: 0,95 \pm 0,07, n:7; EO 30: 1,02 \pm 0,04, n:7; EO 300: 1,10 \pm 0,31, n:7; LPS + EO 5: 0,92 \pm 0,15, n:6; LPS + EO 30: 1,11 \pm 0,22, n:7; LPS + EO 300: 1,16 \pm 0,16, n:6).

3.3. Effects of the essential oil of *S. areira* on BALF-cells

As shown in Table 2, the analysis of BALF-cells revealed that the exposure to LPS and LPS + EO 5 induced a significant decrease in viable cell counts in mice, compared to Vehicle. Also, the EO group was significantly different in terms of LPS only (*p* < 0.05).

In the EO group, LPS, LPS + DX and LPS + EO 5 (*p* < 0.05) induced an increase of PMNs compared to Vehicle. Moreover, LPS + EO 30 and 300 were the only treatments that yielded significant differences of PMNs compared to LPS in BALF.

As shown in Table 2, we evaluated the presence of AMs obtained from BALF samples of mice under different therapies. Vehicle, EO, LPS + DX and LPS + EO groups had significantly higher values than the LPS group (*p* < 0.05). Furthermore, the percentage of AMs in the EO, LPS + DX, LPS + EO 5 groups (*p* < 0.05) were significantly lower than Vehicle (*p* < 0.05).

3.4. Effects of essential oil of *S. areira* on TNF- α detection

Only the EO groups was detected a dose–response in TNF- α concentration (Table 3). However, the EO 5 and EO 30, LPS and LPS + EO groups the TNF- α in BALF were significantly higher than Vehicle, whereas in animals that received EO 30 and 300, LPS + DX and LPS + EO 5, the values of TNF- α were significantly lower than those from the LPS group (*p* < 0.05). No statistical differences were found in EO 300, LPS + DX versus Vehicle; as well as in EO 300, LPS + DX, LPS + EO 30 and LPS + EO 300 versus LPS group.

3.5. Effects of the essential oil of *S. areira* on stress oxidative

There is no significant difference in the dose–response relationship between EO group and vehicle in the detection of CD, as shown in Table 3. CDs were determined in different experimental groups in BALF and unequal sample sizes due to sample losses.

In LPS and LPS + DX, they were significantly lower than Vehicle. In the EO and LPS + EO groups, they were significantly higher than LPS (*p* < 0.05). The Vehicle versus EO groups and LPS + EO groups showed no significant differences.

3.6. Effects of essential oil of *S. areira* on cardiac contractility

We evaluated the *ex vivo* activity of mice hearts pretreated for three hours with EO 300 mg/kg. Hearts were removed and subjected to increasing concentrations of norepinephrine. As shown in Fig. 1, the Basal group yielded significantly higher values in all points tested, in response to norepinephrine concentrations.

3.7. Effects of the essential oil of *S. areira* on cardiovascular parameters

Finally, we determined the *in vivo* SBP, DBP and MAP of rabbits pretreated with only EO 300 mg/kg body wt. This study had the

Table 1

Percentage composition of essential oil of *S. areira* L., determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Compounds ^a	Percentage	Retention index	Method of identification ^b
Hydrocarbon monoterpenes (65.65%)			
Tricyclene	1.99	925	GCMS
α -Pinene	13.80	937	GCMS-Co
Camphene	12.62	954	GCMS
Sabinene	1.59	975	GCMS-Co
β -Pinene	5.80	979	GCMS-Co
β -Myrcene	5.83	990	GCMS
α -Phellandrene	6.76	1003	GCMS
<i>p</i> -Cymene	1.92	1025	GCMS-Co
Limonene	12.81	1033	GCMS-Co
β -Phellandrene	2.53	1036	GCMS
Oxygenated monoterpenes (0.71%)			
1,8-Cineole	0.44	1037	GCMS
Bornyl acetate	0.27	1285	GCMS
Hydrocarbon sesquiterpenes (30.61%)			
α -Copaene	0.34	1376	GCMS
β -Bourbonene	tr ^c	1388	GCMS
β -Elemene	0.39	1394	GCMS
α -Gurjunene	0.39	1403	GCMS
β -Caryophyllene	11.88	1419	GCMS
α -Humulene	1.06	1455	GCMS
Alloaromadendrene	0.19	1460	GCMS
γ -Muuroolene	0.20	1480	GCMS
Germacrene D	8.95	1485	GCMS
β -Selinene	0.17	1489	GCMS
Bicyclogermacrene	5.16	1494	GCMS
γ -Cadinene	0.22	1513	GCMS
δ -Cadinene	1.53	1524	GCMS
Germacrene B	0.13	1555	GCMS
Oxygenated sesquiterpenes (2.34%)			
Germacrene-D-4-ol	1.27	1576	GCMS
Spathulenol	0.50	1578	GCMS
τ -Cadinol	0.25	1640	GCMS
α -Cadinol	0.32	1653	GCMS
Total	99.31		

^a In elution order from a DB-5 column.

^b GCMS, peak identifications are based on MS comparison with file spectra; Co, peak identification are based on standard comparison with relative retention time.

^c tr, trace (<0.05%).

benefit that the tests were conducted on conscious animals and induced only moderate and transient decrease of SBP.

The SBP decreased after treatment with EO or nifedipine at 5, 15 min ($p < 0.05$) and 10 min ($p < 0.01$) compared to Vehicle group (Table 4). Moreover, nifedipine decreased the SBP, DBP ($p < 0.01$) and MAP ($p < 0.001$) at 5, 10 and 15 min, and increased the heart rate in comparison to Vehicles ($p < 0.05$) and returning to basal values within the following 20–35 min.

4. Discussion

The separation of the EO of *S. areira* components in the chromatographic profile was principally composed by hydrocarbon monoterpenes compounds. A difference in composition (percentage of the same terpenes) of the oil was observed between the same specie at different locations (Díaz et al., 2008; Marongiu et al., 2004; Murray et al., 2009; Rouibi et al., 2010). However all the oils presented high percentage of sesquiterpene and monoterpene hydrocarbons. Marongiu et al. (2004) and Murray et al. (2009) have described limonene, α -pinene and β -phellandrene as the largest components of EO of *S. areira*. These slight differences in the quality of the oils could be probably due to changes of the constituents caused by different environmental factors related to soil, humidity, sun exposure, and other external influences (Edris, 2007).

Table 2

Percentage of viable cells (VCs), alveolar macrophages (AMs) and polymorphous neutrophils (PMNs) in BALF from LPS-treated mice.

Treatments	n	Percentage of cells in total BALF		
		VCs	PMNs	AMs
Vehicle	6	89.15 \pm 4.38	3.42 \pm 1.22	96.58 \pm 1.22
EO 5	6	91.25 \pm 1.64 [#]	28.73 \pm 4.78 ^{*,#}	71.27 \pm 4.78 ^{*,#}
EO 30	6	90.37 \pm 2.36 [#]	34.16 \pm 8.67 ^{*,#}	77.23 \pm 9.05 ^{*,#}
EO 300	5	83.55 \pm 3.97 [#]	12.31 \pm 4.8 ^{*,#}	79.64 \pm 8.88 ^{*,#}
LPS	5	79.29 \pm 4.19 [†]	78.80 \pm 4.8 [*]	21.20 \pm 4.8 [*]
LPS + DX	5	87.90 \pm 3.15	24.03 \pm 4.68 [*]	75.97 \pm 4.6 ^{*,#}
LPS + EO 5	6	69.95 \pm 2.72 [†]	29.46 \pm 2.65 [*]	70.54 \pm 2.65 ^{*,#}
LPS + EO 30	5	84.61 \pm 4.38	13.86 \pm 6.01 [#]	86.14 \pm 6.0 [#]
LPS + EO 300	6	77.08 \pm 5.70	15.39 \pm 4.83 [#]	84.61 \pm 4.83 [#]

^{*} $p < 0.05$ vs. vehicle group.

[#] $p < 0.05$ vs. LPS in the vehicle group. Mean \pm SEM; n, number of animals.

Table 3

Conjugated dienes (CDs) and TNF- α concentration in BALF from LPS-treated mice.

Treatments	n	BALF	
		CDs (μ M/mL)	TNF- α (pg/mL)
Vehicle	5	12.72 \pm 1.93	ND
EO 5	5	12.98 \pm 1.60 [#]	481.44 \pm 167.90 ^{**}
EO 30	6	9.75 \pm 2.03 [#]	92.46 \pm 43.08 ^{*,#}
EO 300	5	13.10 \pm 1.55 [#]	ND [†]
LPS	6	5.81 \pm 0.31 [†]	1159.98 \pm 321.64 ^{**}
LPS + DX	6	7.62 \pm 0.79 [†]	ND [†]
LPS + EO 5	6	12.75 \pm 1.76 [#]	101.58 \pm 15.58 ^{*,†}
LPS + EO 30	6	13.57 \pm 1.44 [#]	246.51 \pm 98.40 ^{**}
LPS + EO 300	6	12.56 \pm 1.76 [#]	186.59 \pm 53.95 [*]

ND, not detected.

Mean \pm SEM; n, number of animals.

^{*} $p < 0.05$ vs. vehicle group.

^{**} $p < 0.01$ vs. vehicle group.

[#] $p < 0.05$ vs. LPS.

[†] $p < 0.01$ vs. LPS.

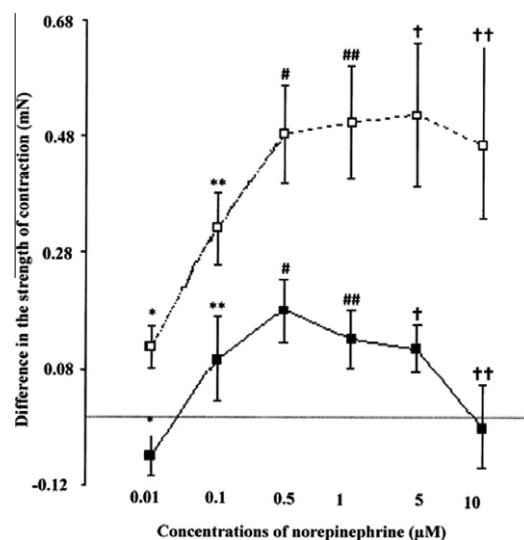


Fig. 1. Determination of cardiac contractility (mN, milli Newton) in *ex vivo* hearts of Swiss Albino mice, placed in the Perspex chamber and perfused with Krebs buffer, at 5 mL/min and subjected to increasing concentrations of norepinephrine (μ M): 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 and 10. □ Basal: untreated animals and animals treated with ■ essential oil 300 mg/kg IP for 3 h prior to determination of cardiac contractility. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). All error bars represent SEM. *, **, #: $p \leq 0.05$; ##, †, ††: $p \leq 0.01$.

Table 4
Arterial blood pressure and *in vivo* heart-rate of rabbits.

Treatments	n	Arterial blood pressure (mm/Hg)			Heart rate (beats/min)
		S.B.P.	D.B.P.	M.A.P.	
Vehicle	13	96.82 ± 3.06	77.69 ± 2.57	83.46 ± 3.14	195.71 ± 18.08
EO 5 min	6	86.25 ± 1.49 [†]	72.75 ± 3.10	79.08 ± 1.52	239.50 ± 21.18 [†]
EO 10 min	6	83.11 ± 3.50 [#]	71.78 ± 3.63	78.53 ± 2.01	227.00 ± 12.87
EO 15 min	6	86.88 ± 1.37 [†]	73.27 ± 3.38	79.34 ± 2.14	224.07 ± 12.89
Nife 5 min	7	73.30 ± 7.54 [#]	59.40 ± 4.06 [#]	66.35 ± 5.58 [†]	238.00 ± 12.01 [†]
Nife 10 min	6	72.71 ± 6.68 [#]	58.04 ± 3.45 [#]	65.38 ± 4.84 [†]	225.00 ± 37.00
Nife 15 min	6	73.40 ± 5.90 [#]	59.57 ± 3.54 [#]	66.61 ± 4.49 [†]	209.67 ± 12.10

S.B.P., systolic blood pressure; D.B.P., diastolic blood pressure; M.A.P., mean arterial pressure; Nife, nifedipine.

Mean ± SEM; n, number of animals.

^{*} p < 0.05.

[#] p < 0.01.

[†] p < 0.001.

Adverse effects of the EO of *S. areira* on morphometric parameters were quantified. In this context, the relationship between total body weight and lung weight was similar to vehicle and no macroscopic changes were observed in lung tissues of animals that received a single dose of EO of *S. areira*. Moreover, we did not detect any changes in the ambulation or clinical status of the animals while they were under the effects of LPS, EO of *S. areira* alone or a combination of both. However, Barrachina et al. (1997) described acute toxicity in rats that received a dose of hexane-dichloromethane extract obtained from *S. areira* producing total inhibition of motor activities and decreased pain threshold induced by chemical stimuli. Furthermore, Vargas Correa et al. (1991) have reported cross-reactivity produced by hypersensitivity to pollen of mango (*Magnifera indica*) with *S. molle* (synonymous variant of *S. areira*).

In the analysis of stimulation produced by LPS, a 3 h treatment with EO of *S. areira* at 30 or 300 mg/kg had the ability to maintain the levels of AMs within the normal range. This is due to the fact that these cells are found in the alveoli in high proportions, which probably reflects the activation of AMs into foam cells as response of acute inflammation (Borron et al., 2000).

The presence of PMNs and AMs in the airways after exposure to LPS is consistent with our previous studies (Roque et al., 2010). On the other hand, in our study we found a significant increase of PMNs was also detected in lungs of rodents exposed to LPS, considering that the EO of *S. areira* could have an active role in the activation of AMs in mice lungs.

The percentage of PMNs in BALF decreased after the administration of LPS + DX and LPS + EO 30 and 300 to levels similar to those of Vehicle. PMNs are involved in processes like phagocytosis, release of proteolytic enzymes, generation of active free radicals and synthesis of cytokines producing inflammation. In addition, the PMNs act as a significant source of TNF- α in the tissues during the acute lung inflammation elicited by LPS. However, the group of EO 5, 30 and 300 showed significant increase of the percentage of PMNs.

This phenomenon is probably due to the action of enantiomers from the terpenes present in the EO of *S. areira*, which may be developing biological effects or with putative synergism, antagonism or zero-interaction with the terpenes present in the EO of *S. areira* or with any step of the inflammation pathway (Menezes et al., 2010).

Monoterpenes are released as gas during the milling and processing of fresh wood. This poses a potential health hazard on workers of sawmills, causing skin rash as well as eye and mucous irritation (Hedenstierna et al., 1983). Even though we did not analyze each individual terpene included in our study, the (+) or (–) α -pinene, the main volatile (–) monoterpene or (+) or (–) limonene produced different responses on the respiratory airways of mice (Larsen et al., 2000; Nielsen et al., 2005).

The presence of these enantiomers could be responsible for the nonspecific response of PMNs, AMs or TNF- α . Also, a feasible explanation for the lack of a dose–response curve is for the limited range of EO of *S. areira* dosages studied. Davicino et al. (2010) have described that according to the extraction, preparation and mode of administration *S. areira* has pro-inflammatory or anti-inflammatory effects.

Additionally, in our experimental model, the secretion of cytokines TNF- α was significantly attenuated by EO of *S. areira* administration, but only at the dose of 5 mg/kg or DX upon stimulation by endotoxin LPS. TNF- α is a key regulatory cytokine involved in inflammatory processes and its biosynthesis and release is a complex process regulated by many pathways; in addition, the EO of *S. areira* could block or regulate the interaction of LPS with the immune system.

Also, in Table 2, EO 5 and 30 induced a significant increase of TNF- α ; this rise was associated to the response of PMNs since these phagocytic cells, crucial in specific and non-specific immune responses, synthesize a variety of biological mediators, including pro- and anti-inflammatory cytokines. In inflammatory lung diseases, they have been associated with increased circulating levels of TNF- α . These effects could be due to the fact that small amounts of EO of *S. areira* can induce greater immune responses than higher concentrations of EO of *S. areira* (Neher et al., 2008).

One possible physiological explanation for the above mentioned data, Olafsson et al. (1997) involves the action of triterpenes from *S. areira* on the inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). The ACE inhibitors produce a diminution of TNF- α concentrations, although it may be possible that there is some kind of relationship between neurohormones (norepinephrine, angiotensin) and pro-inflammatory cytokines (Fukuzawa et al., 1997). Recent data suggest that the renin-angiotensin system could play an important role in the pathogenesis of pulmonary inflammation, as well as on an increased production of free radicals (Wösten-van Asperen et al., 2010).

In addition, α -pinene develops anti-inflammatory activity by inhibiting the enzyme cyclooxygenase (Zandi and Breitner, 2001). Although other mechanisms could not be entirely discarded, its effects appear to involve an inhibitory action of the activity of the enzyme acetylcholinesterase (Murray et al., 2009). Nevertheless, the mechanisms postulated for the EO of *S. areira* should be confirmed with future research studies and remain necessary to fully understand the molecular mechanisms and should be directed to establish the steps of signal transduction.

The generation of oxygen-free radicals is a well understood mechanism of the inflammation process and in recent years, the balance between the ratios of oxidants/antioxidants in lung pathogenesis has taken special relevance (Till et al., 1985). Therefore, this ratio plays a clear role on body functions and an imbalance

of this delicate equilibrium directs to biochemical and cellular changes that may lead to significant pathological conditions within the environment complex (Cross et al., 1994).

In CDs assessed in BALF from mice lungs, LPS demonstrated to induce a significant decrease compared to the untreated group. This phenomenon can be attributed to changes in the non-physiological conditions induced by LPS; the concentration of CDs decreased significantly induced by the obligatory passage of conjugated dienic lipid hydroperoxides to peroxy radicals (isoprostanes and decomposition products: e.g. malondialdehyde) but not to the CDs pathway (Dotan et al., 2004). In this context, the presence of EO 5, 30 or 300 of *S. areira* attenuated the progress to another pathway reaction that occurs during oxidative stress. Also, in small animals with faster metabolism, the rate of inflammation progress and the susceptibility to oxidative stress is higher. It should be noted that in mice lungs, the ratio oxidation–antioxidation is lower than in other tissues because they have slower metabolism and therefore, less exposure to oxidative damage (Richter, 1987).

Numerous studies have demonstrated the antioxidant properties of natural products, which are similar to those obtained in our study (Bakkali et al., 2008; Galvez Ranilla et al., 2010; Guala et al., 2009; Shen et al., 2010). The EO of *S. areira* could prevent oxidative damage by using physiological mechanisms similar to the endogenous antioxidant system, inhibiting or preventing the generation of free radicals, enhancing antioxidant enzymes activity or by blocking the amplification of oxidative damage (Graßmann, 2005). Nevertheless, the EO of *S. areira* could produce free radicals which oxidize and damage lipids, proteins and DNA in high concentrations (Bakkali et al., 2008). However, the exact mechanism of EO on the oxidative stress in BALF remains unknown.

In this context, increasing doses of norepinephrine in *ex vivo* hearts of mice pretreated with only doses of EO of *S. areira* tested, proving to have negative inotropic effects in mice; in addition, in non-anaesthetized normotensive rabbits, EO of *S. areira* significantly decreased the SBP at 5, 10 and 15 min post treatment in *in vivo* rabbits and increased their heart rate, but only at 5-min post EO. Moreover, the cardiovascular activity of EO of *S. areira* has been reported, and in agreement with other authors, in our data of the main chemical constituent of the EO of *S. areira* is the terpene β -caryophyllene, present in 11.8%, has been described as a Ca^{2+} channel blocker (Sensch et al., 2000). Based on this study, it can be suggested that the negative inotropic effect could induce significant hypotension mediated by the regulation of Ca^{2+} channels or to the presence of different compounds in the EO of *S. areira* alone (α - or β - pinene, 13.8% and 5.8% respectively in our study) or in combination, and/or to the association of different compounds present in EO of *S. areira* (Menezes et al., 2010). However, the hypotensive reaction could also be due to a decrease of the total peripheral resistance related with cardiac parasympathetic stimulation, which might in turn decrease cardiac output and consequently decline the arterial blood pressure.

In conclusions, our data presented here demonstrate that the EO of *S. areira* can mitigate, initiate or release small concentrations of pro or anti-inflammatory mediators in the lungs; in addition, some of the terpenes present from EO of *S. areira* might produce homeostatic changes of unknown clear origin in many people and short-term exposure to EO of *S. areira* has been significantly associated to cardiac autonomic dysfunction, as demonstrated by the decrease of SBP and contractility. Additional studies to refute or confirm the effects of this EO of *S. areira* on the respiratory and cardiovascular systems are necessary to investigate the possible mechanisms involved.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors acknowledge the contribution of Ms. Gabriela M. Czékus for revising the English text. Dpto. Académico de Humanidades, Universidad Nacional de la Rioja, Argentina.

This research project was carried out by the financial support from Research University Grants Scheme: Universidad de la Rioja (00-07065/2007) and Universidad de Córdoba (05/H268) Argentina. Agencia Córdoba Ciencia (N° 000113/2011) Argentina.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy (Carol Stream Fourth ed.). Allured Publishing Corporation, Illinois.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food Chem. Toxicol.* 46 (2), 446–475.
- Barrachina, M.D., Bello, R., Martínez Cuesta, M.A., Primoyufer, E.Y., Esplugas, J., 1997. Analgesic and central depressor effects of the dichloromethanol extract from *Schinus areira* L. *Phytoth. Res.* 11 (4), 317–319.
- Borron, P., McIntosh, J.C., Korfhagen, T.R., Whitsett, J.A., Taylor, J., Wright, J.R., 2000. Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. *AJP-Lung Physiol.* 278(4):L840–L847.
- Cross, C.E., van der Vliet, A., O'Neill, C.A., Louie, S., Halliwell, B., 1994. Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ. Health Perspect.* 102 (Suppl 10), 185–191.
- Davicino, R., Mattar, A., Casali, Y., Anesini, C., Micalizzi, B., 2010. Different activities of *Schinus areira* L.: anti-inflammatory or pro-inflammatory effect. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 32 (4), 620–627.
- Díaz, C., Quesada, S., Brenes, O., Aguilar, G., Ciccio, J.F., 2008. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. *Nat. Prod. Res.* 22 (17), 1521–1534.
- Dikshit, A., Naqvi, A.A., Husain, A., 1986. *Schinus molle*: a new source of natural fungitoxicant. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1085–1088.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I., 2004. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 43 (3), 200–227.
- Edris, A.E., 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Res.* 21 (4), 308–323.
- Fukuzawa, M., Satoh, J., Sagara, M., Muto, G., Muto, Y., Nishimura, S., et al., 1997. Angiotensin converting enzyme inhibitors suppress production of tumor necrosis factor- α in vitro and in vivo. *Immunopharmacol.* 36 (1), 49–55.
- Galvez Ranilla, L., Kwon, Y., Apostolidis, E., Shetty, K., 2010. Phenolic compounds, antioxidant activity and *in vitro* inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Biores. Tech.* 101 (12), 4676–4689.
- Graßmann, J., 2005. Terpenoids as plant antioxidants. *Vitam. Horm.* 72, 505–535.
- Guala MS, Elder HV, Perez G, Chiesa A., 2009. Evaluación del poder antioxidante de fracciones de aceite esencial crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por destilación al vacío. *Info. Tech.* 20(2):83–88.
- Hayouni, E.A.K., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J.Y., Mohammed, H., Hamdi, M., 2008. *Tunisian Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 242–251.
- Hedenstierna, G., Alexandersson, R., Wimander, K., Rosén, G., 1983. Exposure to terpenes: effects on pulmonary function. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 51 (3), 191–198.
- Institute of Laboratory Animal Resources, 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (seventh ed.) Washington, DC: National Academy Press.
- Jia, C., Batterman, S., Godwin, C., Charles, S., Chin, J.Y., 2010. Sources and migration of volatile organic compounds in mixed-use buildings. *Indoor Air.* 20 (5), 357–369.
- Kabesch, M., Roger, P., 2004. Why old McDonald had a farm but no allergies: genes, environments, and the hygiene hypothesis. *J. Leukocyte Biol.* 75 (3), 383–387.
- Koroch, A., Juliani, R., Zygodlo, J.A., 2007. Flavours and Fragrances. Bioactivity of essential oil and their components (Chemistry. Springer-Verlag, Berger ed.). Berlin.
- Larsen, S.T., Hougaard, K.S., Hammer, M., Alarie, Y., Wolkoff, P., Clausen, P.A., et al., 2000. Effects of R(+) and S(–) limonene on the respiratory tract in mice. *Hum. Exp. Toxicol.* 19 (8), 457–466.
- Lo Presti, M.S., Rivarola, H.W., Fernández, A.R., Enders, J.E., Levin, G., Fretes, R., et al., 2009. Involvement of the β -adrenergic system in the cardiac chronic form of the experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology* 136, 905–918.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Casu, R., Pierucci, P., 2004. Chemical composition of the oil and supercritical CO₂ extract of *Schinus molle* L. *Flavour Frag. J.* 19 (6), 554–558.
- Matsumura, K., Tsuchihashi, T., Abe, I., 2001. Central human cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptide 55–102 increases arterial pressure in conscious rabbits. *Hypertension* 38 (5), 1096–1100.
- Menezes, I.A., Barreto, C.M., Antonioli, A.R., Santos, M.R., de Sousa, D.P., 2010. Hypotensive activity of terpenes found in essential oils. *Z Naturforsch. C* 65 (9–10), 562–566.

- Molina-Salinas, G.M., Pérez-López, A.P., Becerril-Montes, R., Salazar-Aranda, S., Said-Fernández, N., Waksman de Torres, F., 2007. Evaluation of the flora of Northern Mexico for *in vitro* antimicrobial and antituberculosis activity. *J. Ethnopharmacol.* 109, 435–441.
- Murray, A.P., Gurovic, M.S., Rodríguez, S.A., Murray, M.G., Ferrero, A.A., 2009. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of essential oils from *Schinus molle* L. and *Schinus longifolia* (Lindl.) Speg. *Nat. Prod. Commun.* 4 (6), 873–876.
- Neher, A., Gstottner, M., Thaurer, M., Augustijns, P., Reinelt, M., Schobersberger, W., 2008. Influence of essential and fatty oils on ciliary beat frequency of human nasal epithelial cells. *Am. J. Rhinol.* 22, 130–134.
- Nielsen, G.D., Larsen, S.T., Hougaard, K.S., Hammer, M., Wolkoff, P., Clausen, P.A., et al., 2005. Mechanisms of acute inhalation effects of (+) and (–) alpha-pinene in BALB/c mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 96 (6), 420–428.
- Ogura, H., Cioffi, W.G., Okerberg, C.V., Johnson, A.A., Guzman, R.F., Mason Jr, A.D., et al., 1994. The effects of pentoxifylline on pulmonary function following smoke inhalation. *J. Surg. Res.* 56 (3), 242–250.
- Olafsson, K., Jaroszewski, J.W., Smitt, U.W., Nyman, U., 1997. Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus areira*. *Planta Medica* 63, 352–353.
- Olivari, M.T., Bartorelli, C., Polese, A., Fiorentini, C., Moruzzi, P., Guazzi, M.D., 1979. Treatment of hypertension with nifedipine, a calcium antagonistic agent. *Circulation* 59, 1056–1062.
- Park, S.K., Auchincloss, A.H., O'Neill, M.S., Prineas, R., Correa, J.C., Keeler, J., et al., 2010. Particulate air pollution, metabolic syndrome, and heart rate variability: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Environ. Health Perspect.* 118 (10), 1406–1411.
- Passos, G.F., Fernandes, E.S., Cunha, F.M., Ferreira, J., Pianowski, L.F., et al., 2007. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J. Ethnopharmacol.* 110, 323–333.
- Rahman, I., MacNee, W., 1998. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax* 53, 601–612.
- Richter, C., 1987. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem. Phys. Lipids* 44, 175–189.
- Rouibi, A., Saidi, F., Boutoumi, H., 2010. Identification by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and determination of antimicrobial effects of essential oils from peppertree (*Schinus molle* L.). *Acta Horticult.* 853, 219–228.
- Roque, N., Cremonuzzi, D., Bigliani, C.M., Grondona, E., Zunino, M.P., Ponce, A.A., 2009. Biphasic modulation of neutrophil migration by aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* in murine lung. *J. Compl. Integr. Med.* 6 (1), 11. <http://dx.doi.org/10.2202/1553-3840.1222>.
- Senscho, O., Vierling, W., Brandt, W., Reiter, M., 2000. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: Comparison of β -caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *Br. J. Pharmacol.* 131 (6), 1089–1096.
- Shen, J.L., Man, K.M., Huang, P.H., Chen, W.C., Chen, D.C., Cheng, Y.W., et al., 2010. Honokiol and magnolol as multifunctional antioxidative molecules for dermatologic disorders. *Molecules* 15 (9), 6452–6465.
- Simionatto, E., Chagas, M.O., Peres, M.T., Hess, S.C., da Silva, C.B., Ré-Poppi, N., et al., 2011. Chemical composition and biological activities of leaves essential oil from *Schinus molle* (Anacardiaceae). *J. Essential Oil-Bearing Plants* 14 (5), 590–599.
- Süntar, I., Tumen, I., Ustun, O., Keles, H., Kupeli Akkol, E., 2012. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of Pinus species by *in vivo* and *in vitro* experimental models. *J. Ethnopharmacol.* 139, 533–540.
- Till, G.O., Hatherill, J.R., Tourtellotte, W.W., Lutz, M.J., Ward, P.A., 1985. Lipid peroxidation and acute lung injury after thermal trauma to skin. Evidence of a role for hydroxyl radical. *Am. J. Pathol.* 119(3):376–384.
- Vargas Correa, J.B., Sánchez Solís, L., Farfán, A.J.A., Noguchi, H., Moguel Baños, M.T., Vargas de la Peña, M.I., 1991. Allergological study of pollen of mango (*Mangifera indica*) and cross reactivity with pollen of piru (*Schinus molle*). *Rev. Alerg.* 38 (5), 134–138.
- Viegi, G., Simoni, M., Scognamiglio, A., Baldacci, S., Pistelli, F., Carrozzi, L., et al., 2004. Indoor air pollution and airway disease. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8 (12), 1401–1415.
- Weschler, C.J., Wells, J.R., Poppendieck, D., Hubbard, H., Pearce, T.A., 2006. Workgroup report: Indoor chemistry and health. *Environ. Health Perspect.* 114 (3), 442–446.
- Wösten-van Asperen, R.M., Lutter, R., Specht, P.A., van Woensel, J.B., van der Loos, C.M., Florquin, S., et al., 2010. Ventilator-induced inflammatory response in lipopolysaccharide-exposed rat lung is mediated by angiotensin-converting enzyme. *Am. J. Pathol.* 176(5), 2219–2227.
- Zahed, N., Hosni, K., Brahim, N.B., Kallel, M., Sebei, H., 2010. Allelopathic effect of *Schinus molle* essential oils on wheat germination. *Acta Physiol. Plant* 32 (6), 1221–1227.
- Zandi, P.P., Breitner, J.C.S., 2001. Do NSAIDs prevent Alzheimer's disease? And if so, why? The epidemiological evidence. *Neurobiol. Aging* 22, 811–817.
- Zunino, M.P., Lopez, M.L., Faillaci, S.M., Lopez, A.G., Ariza Espinar, L., Zygadlo, J.A., 2000. Essential oil of *Baccharis cordobensis* Heering. *Flav. Fragr. J.* 15, 151–152.
- Zunino, M.P., López, M.L., Zygadlo, J.A., 2003. Medicinal Plants of Argentina. Pharmacological Properties and Phytochemistry. *Advances in Phytochemistry*. (Chapter 7). (Research Singpost Trivandrum, Prof. Filippo Imperato Ed.).
- Zygadlo, J.A., Juliani, R.H. (Jr.), 2002. Study of the essential oil composition of aromatic plants from Argentina. In: *Series Recent Progress in Medicinal Plants*. Vol: 8. *Phytochemistry & Pharmacology II* (Majumdar, D.K., Govil, J.N., Singh, V.K., (Eds.) Sci. Tech. Pub., USA).



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS



**X JORNADAS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
SECRETARÍA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**II JORNADAS CIENTÍFICAS EN MODALIDAD SEMINARIOS
INSTITUTO DE VIROLOGÍA Dr. J. M. VANELLA**

- *Enfermedades Virales Emergentes:
Realidad epidemiológica 2009 en la Pcia. de Córdoba*
- *Obesidad: epidemiología, endocrinología y cirugía*

2, 3 y 4 de diciembre 2009

**Sede: Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud
Ciudad Universitaria**

**Informes e inscripción:
www.fcm.unc.edu.ar/secyt**

Cód. Trabajo:

87

Título:

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ESTANDARIZACIÓN DE L-CITRULINA COMO MARCADOR BIOQUÍMICO EN CANIS DOMESTICUS

Responsable:

ROSSETTI, VÍCTOR

Coautores:

ROSSETTI V., MARTÍN M., PONCE A.

Lugar:

CÁTEDRA DE FISIOLÓGIA HUMANA. FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS. UNC

Resumen:

Introducción El óxido nítrico (NO) es un potente vasodilatador endógeno. Es sintetizado por la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina a L-citrulina y NO. Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa, la cual tiene una amplia distribución en el organismo. Actualmente se le concede al ON una gran importancia en el estudio de la fisiología normal y su participación en la hemodinámica cardiovascular y algunas funciones hematológicas y de defensa. Objetivo: en el presente trabajo se trató de establecer a la L-citrulina como posible marcador bioquímico en *Canis domesticus* (perro). Materiales y Métodos: Se utilizaron animales sanos y jóvenes (machos y hembras; 3-5 años; 20-25 Kg, n:12). Para la determinación de L-citrulina se utilizó el método de Griess, mientras que para los otros parámetros medidos, se utilizaron reactivos comerciales. Resultados: L-citrulina: 3.24 ± 0.18 mM; hematocrito: $46.86 \pm 0.82\%$; hemoglobina: 15.99 ± 0.31 g/dl; eritrocitos: $5.39 \times 10^6/\text{mm}^3$; leucocitos: $7.6 \times 10^3/\text{mm}^3$; urea: 35.14 ± 2.40 mgr/dl; creatinina: 1.35 ± 0.08 mg/dl; proteínas: 6.68 ± 0.17 g/dl; GPT: 17.93 ± 3.39 UI/l; FAL: 123.86 ± 28.68 UI/l. Conclusiones: De los parámetros evaluados se desprende que L-citrulina puede ser medido en *Canis domesticus*, y que el valor hallado puede ser considerado como el valor normal en esta especie. Además, los otros marcadores obtenidos corresponden a valores normales descriptos en la clínica veterinaria. De esta manera, L-citrulina puede llegar a ser un marcador bioquímico para tener en cuenta para evaluar y pronosticar la evolución de patologías inflamatorias.

al efecto que la hiposialia ejerce sobre mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGE) y el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) producidos durante la reparación tisular post extracción dentaria. El objetivo de este estudio es evaluar los efectos de la SMx sobre dichos parámetros inflamatorios. Se utilizaron ratas Wistar macho ($n=10$ /grupo) al momento del destete (21 días): Grupo Experimental (SMx) y Grupo Sham. El día 7 post cirugía se realizó la exodoncia bilateral del primer molar inferior y se procedió a estudiar la actividad de la NOS (Arginina C14), los niveles de PGE (RIA) y el contenido de $TNF\alpha$ (ELISA) en dos áreas: 1) tejido que ocupa el alvéolo y 2) encía a las 24, 48 y 72 hs post exodoncia. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente considerándose significativas las diferencias con $p<0.05$. La actividad de la NOS aumentó en el Sham 48 hs con respecto a Sham 24hs ($p<0.01$) en ambas áreas estudiadas. El G SMx no presentó aumento de actividad de NOS respecto al Sham 48hs ($p<0.01$). Los niveles de PGE observados en el área 1, fueron mayores a las 24hs siendo más elevados en el G SMx 24 hs ($p<0.05$). En el G SMx 72 hs los niveles de PGE disminuyeron con respecto a G SMx 48 hs y 24 hs ($p<0.01$). El $TNF\alpha$ fue detectado en el área 1) en G Sham y G SMx 24 hs y a las 48 hs fue detectado sólo en el G SMx. La submandibulectomía modifica los niveles de NO, PGE y $TNF\alpha$ en el tejido que ocupa el alvéolo post exodoncia. Los cambios de estos parámetros inflamatorios podrían ejercer algún efecto sobre la reparación ósea post exodoncia en ratas. UBACyT 20020100100657, PIP 11220090100117 y UBACyT O 007

074. (136) EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL SCHINUS AREIRA (ANACARDEACEA) EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS EN RATÓN Y EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR EN CONEJOS

Bigliani C.¹; Rossetti V.²; Gronzona E.³; Lo Presti S.⁴; Pagnini P.⁵; Rivero V.⁶; Zunino M.⁷; Ponce A.⁸

Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Cs Médicas, UNC¹; Cátedra de Pequeños Animales, Dpto. Académico de Ciencias y Tecnologías Aplicadas a la Producción, al Ambiente y al Urbanismo, Universidad Nacional de la Rioja²; Cátedra de Biofísica, Facultad Cs Médicas, UNC³; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC⁴; Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales (IMBIV-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC⁵; Cátedra de Fisiología Humana, Facultad Cs Médicas, UNC, Cátedra de Fisiología Humana, Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Rioja⁶ bigliani.celeste@gmail.com

Diversas especies vegetales Sudamericanas tienen una larga historia de usos en la medicina popular, como el "Aguaribay" (*Schinus molle*), ampliamente utilizado como antiinflamatorio, antifúngico e hipotensor. Los terpenos presentes en su aceite esencial (AE) poseen actividad hipotensiva, antiradicalaria, e inhiben a la "enzima convertidora de angiotensina" (ECA). El presente estudio fue diseñado para determinar a nivel pulmonar, la acción biológica de diferentes concentraciones de AE (5, 30 y 300 mg/Kg; obtenido por destilación por arrastre con vapor de agua), administrado intraperitonealmente a ratones machos adultos de la cepa Albino Swiss, previamente instilados con LPS (lipopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa*, 1,67mg/Kg), cuantificando la expresión de $TNF-\alpha$ en pulmón, la concentración de dienos conjugados (DC), la activación de macrófagos (MA) y la migración de neutrófilos (PMN), a partir del lavado bronquioalveolar. También se determinó la contractilidad miocárdica en ratón inducida por noradrenalina y factores hemodinámicos en conejos machos. Los terpenos se identificaron mediante GC-MS, cuantificando el 98% del total de terpenos, siendo los principales el α -pineno (13.80%) y el canfeno (12.62%). Conclusiones: El AE disminuye significativamente $TNF-\alpha$, la activación de MA, el infiltrado de PMN y el cociente entre porcentaje de DC/MA (como parámetro de actividad antioxidante). Ejerció actividad inotrópica (-) en ratón, mientras que en conejos disminuyó significativamente

la presión sistólica ($p < 0.01$). Estos resultados podrían atribuirse a la actividad inhibitoria que ejercerían los terpenos sobre la ECA. Agradecimientos: Subsidios de la SECyT UNLAR.

075. (169) FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN HIPOCAMPO Y CORTEZA CEREBRAL DE RATAS SOMETIDAS A 5000 M DE ALTURA SIMULADA DURANTE 7 MESES.

La Padula P.¹; Costa L.²; Czerniczyniec A.³; Bustamante J.⁴; Loes Arnaiz S.⁵

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA^{1,2}; Laboratorio de Radicales Libres en Biología, FFyB, UBA^{3,4,5} pablolapa@hotmail.com

Nuestros estudios previos en mitocondrias aisladas de hipocampo de ratas expuestas a hipoxia hipobárica durante un mes indicaron un aumento de óxido nítrico sintasa (NOS), acompañado por una disminución del consumo de O₂ con preservación del potencial de membrana y la producción de H₂O₂, efectos que se integrarían en un mecanismo protector. Teniendo en cuenta que un aumento de NOS mitocondrial correlacionó con la cardioprotección observada durante un largo período de aclimatización (J Appl Physiol, 2008), el objetivo del presente estudio fue analizar la función mitocondrial en cerebro de ratas sometidas a hipoxia prolongada. Ratos Wistar fueron expuestos a una altura simulada de 5000 m (53,8 kPa) en una cámara de hipopresión, mientras que el mismo número de animales permanecieron como controles a presión atmosférica ambiental (101,3 kPa). Al cabo de 7 meses, las ratas se sacrificaron y se aisló la fracción mitocondrial de hipocampo (H) y corteza (C). La producción de NO, determinada por el método espectrofotométrico de la oxihemoglobina, y el consumo de O₂, determinado con un respirómetro de alta resolución, no mostraron cambios. La despolarización de la membrana, evaluada por citometría de flujo (sonda potenciométrica DiOC6), aumentó (en %) de 16 ± 1 a 25 ± 1 ($p<0.01$) y de 10 ± 1 a 16 ± 2 ($p<0.01$) en H y C, respectivamente. La producción de H₂O₂, medida por el método espectrofluorométrico (escopoletina-HRP), disminuyó en H ($p<0.05$). Se concluye que, probablemente debido a la mayor sensibilidad del cerebro a la deficiencia de O₂, el mecanismo protector descrito previamente no se manifestó después de un período prolongado en condiciones de hipoxia relativamente severas. Sin embargo, los resultados podrían interpretarse dentro del marco de la hipótesis "uncoupling to survive" (Brand, 2000), por la cual una moderada caída del potencial de membrana mitocondrial disminuiría la producción de especies reactivas del oxígeno y el consiguiente daño oxidativo.

076. (322) LA INOCULACIÓN INTRAMAMARIA DE PANAX GINSENG AL MOMENTO DEL SECADO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO ANÁLOGOS A INSULINA (IGFS).

Dallard B.¹; Pujato S.²; Baravalle C.³; Renna M.⁴; Rey F.⁵; Ortega H.⁶; Calvino L.⁷

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, FCV, UNL^{1,2} 3 4 5 6; Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA⁷ bdallard@fcv.unl.edu.ar

Se ha descrito que el sistema de IGF regula el proceso de remodelación mamaria durante la involución. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de componentes del sistema de IGF en tejido mamario bovino y en leche identificando posibles modificaciones tras la aplicación intramamaria (IM) de Panax ginseng (PG) durante la involución temprana. Se utilizaron 6 vacas Holstein no preñadas en la etapa final de la lactancia. La unidad experimental fue el cuarto mamario. Ocho cuartos fueron inoculados con 10 ml de una solución de extracto de PG (3 mg del extracto seco/ml), 8 con 10 ml de solución fisiológica (placebo, P) y 8 fueron mantenidos como controles libres de inoculación (C). Los animales fueron secados luego del tratamiento y se sacrificaron a los 7 días para la obtención de tejido mamario. Previa inoculación se tomaron muestras de leche (hora 0) y a las 24, 48 y 72 hs post inoculación (pi). A los 7 días del secado se observó una

CUDAP: Exp: 0018268/2012

Córdoba, 11 JUN 2014

VISTO:

Que el Sr. Médico Veterinario **VICTOR LUIS ROSSETTI** (DNI: 11.785.354), ha cumplido con todos los requisitos inherentes a la Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud y solicita autorización para realizar la disertación doctoral y,

CONSIDERANDO:

- Que el Sr. Médico Veterinario **VICTOR LUIS ROSSETTI**, realizó el trabajo titulado **"EFECTOS MORFOMÉTRICOS, BIOQUÍMICOS Y CARDIOVASCULARES DEL ACEITE ESENCIAL Y TERPENOS HIDROCARBONADOS DE SCHINUS AREIRA (ANACARDIACEAE) EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN ANIMALES"**, bajo la dirección del Sr. Prof. Dr. Andrés Alberto Ponce y la Comisión integrada por los Srs. Profs. Dres. Patricia Adriana Paglini y Alberto Jorge Eraso,
- Que de acuerdo a lo estipulado en el art. 10 inc h) del reglamento vigente los mencionados profesores suscribieron el acta de la fecha 04 de noviembre de 2013 dejando constancia que el Doctorando ha aprobado el informe de su trabajo de Tesis,
- Que se cumplieron todas las disposiciones reglamentarias previas,
- Que corresponde designar el Tribunal previsto en el Art. 17) según lo estipulado en el Art. 18) del Reglamento vigente,
- El Visto Bueno de la Secretaría de Graduados en Ciencias de la Salud,

**EL DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
RESUELVE:**

- Art.1) Designar a los Sres. Prof. Dres. Alberto Jorge Eraso, Elio Andrés Soria y María Susana Perrone, como integrantes del Tribunal encargado de receptor la Disertación Doctoral del Sr. Médico Veterinario **VICTOR LUIS ROSSETTI** (DNI: 11.785.354).
- Art.2) El Tribunal designado por el artículo precedente deberá completar el estudio del trabajo en un plazo máximo de 30 días corridos, a partir de la recepción del ejemplar de tesis y fijar día y hora para la disertación doctoral.
- Art.3) Protocolizar y Comunicar.

Prof. Mgter **ROGELIO DANIEL PIZZI**
SECRETARIO TÉCNICO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



Prof. Dr. **GUSTAVO L. IRIGOYEN**
DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

RESOLUCIÓN Nº
MV/mn

2010

