

Evaluación farmacognóstica, toxicológica y potencialidades hemostáticas de hojas y tallos de *Guarea guidonia* (L.) Sleumer

Pharmacognostic, toxicological assessment and hemostatic potentials of the leaves and stems of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer

Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-8885-4849>

Ramón Scull Lizama¹ <https://orcid.org/0000-0001-6401-221X>

Marianelys Hernández Martínez² <https://orcid.org/0000-0002-1326-2910>

Alejandro Felipe González¹ <https://orcid.org/0000-0003-2287-254X>

Regla Maité Casanova Orta¹ <https://orcid.org/0000-0002-8590-6332>

Gastón García Simón³ <https://orcid.org/0000-0002-4360-6606>

¹Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos. La Coronela, La Lisa, LA Habana, Cuba.

²Instituto de Ciencia Animal (ICA). San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

³Centro de Histoterapia Placentaria. Planta de producción. La Lisa, La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: yamiletgut@gmail.com; yamiletgg@ifal.uh.cu

RESUMEN

Introducción: *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae) se conoce comúnmente como yamagua, trompillo o guaraguao. Se distribuye ampliamente en Cuba, específicamente en las tierras planas y en las orillas de los ríos. Tradicionalmente se ha usado como expectorante y las hojas son efectivas en la hemorragia intestinal y la hematuria, sin embargo, los estudios científicos relacionados con la especie son escasos.

Objetivo: Evaluar los parámetros farmacognósticos, la seguridad y la actividad hemostática de extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de la *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae).

Métodos: La especie en estado vegetativo se recolectó en noviembre de 2017 en Ceiba del Agua, provincia Artemisa, Cuba. Los extractos hidroalcohólicos se obtuvieron por maceración y se midieron sus parámetros de calidad. Se estimó el perfil fitoquímico por cromatografía en capa fina, cuantificación de fenoles por Folin-Ciocalteu y determinación de flavonoides por el método colorimétrico del cloruro de aluminio. Se evaluó toxicidad aguda oral y la actividad hemostática mediante el modelo de sangrado en la pata de la rata.

Resultados: Se encontraron algunas diferencias en los parámetros de calidad de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de la especie. El perfil químico sugirió la presencia de compuestos fenólicos en general y triterpenoides, aunque se identificaron diferencias en el contenido de fenoles y flavonoides, siendo mayor para el extracto de hojas. Los extractos no generaron efectos tóxicos por vía oral a la dosis de 2000 mg/kg de peso corporal en los animales de experimentación y manifestaron actividad hemostática con una disminución en el tiempo de sangrado similar a la vitamina K1, demostrando un buen efecto hemostático bajo las condiciones ensayadas.

Conclusiones: Los resultados hacen una valiosa contribución al estudio de las propiedades biológicas de *G. guidonia* que crece en Cuba, proporcionando los primeros hallazgos sobre la demostración de su efecto hemostático, referido de manera tradicional para la especie. La evaluación farmacognóstica de los extractos permitió establecer un conjunto de parámetros que aseguran la calidad de la especie vegetal, lo que sienta las bases para la confección de la futura monografía de la planta.

Palabras clave: *Guarea guidonia*; extractos hidroalcohólicos; farmacognosia; actividad hemostática.

ABSTRACT

Introduction: *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae) it is commonly known as yamagua, trompillo o guaraguao. It is broadly distributed in Cuba, specifically in flat lands and in the banks of rivers. It has been traditionally used as expectorant and the leaves are effective in the treatment of intestinal hemorrhage and hematuria; however, the scientific studies related with this species are scarce.

Objective: Evaluate the pharmacognostic parameters, safety and hemostatic activity of the hydroalcoholic extracts from the leaves and stems of *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae).

Methods: The species in vegetative state was collected in November, 2017 in Ceiba del Agua, Artemisa province, Cuba. The hydroalcoholic extracts were obtained by maceration and their quality parameters were measured. It was estimated the phytochemical profile by thin layer chromatography, phenols quantification by Folin-Ciocalteu and determination of flavonoids by the colorimetric method of aluminium chloride. It was assessed the acute oral toxicity and the hemostatic activity through the bleeding model in the rat's leg.

Results: There were found some differences in the quality parameters of the hydroalcoholic parameters of leaves and stems of the species. The chemical profile suggested in general the presence of phenolic compounds and triterpenoids, although some differences were identified in the content of phenols and flavonoids, being higher for the leaves extract. The extracts did not generate toxic effects in the oral way to the dose of 2000 mg/kg of weight in the animals for experimentation and they manifested hemostatic activity with a decrease in the bleeding time similar to K1 vitamin and showing a good hemostatic effect under the tested conditions.

Conclusions: The results made a valuable contribution to the study of biologic properties of *G. guidonia* that grows in Cuba providing the first findings on its hemostatic effect's demonstration which has been referred traditionally for the species. The pharmacognostic assessment of the extracts allowed establishing a group of parameters that ensure the quality of this vegetal species, which becomes a precedent for the creation of the future monography on the plant.

Keywords: *Guarea guidonia*; hydroalcoholic extracts; pharmacognostic; hemostatic activity.

Recibido: 27/05/2020

Aceptado: 23/07/2020

Introducción

La hemostasia (fenómeno fisiológico que detiene el sangrado) ha despertado en los últimos años un gran interés científico, ya que las hemorragias siguen siendo una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo, y los sitios principales son el sangrado gastrointestinal, ginecológico e intracraneal.^(1,2,3)

Los productos hemostáticos disponibles comercialmente son, generalmente, insuficientes o demasiado lentos para lograr la hemostasia en casos extremos.⁽⁴⁾ En muchos países los pacientes sucumben al sangrado debido a un acceso deficiente a intervenciones y agentes hemostáticos apropiados.⁽⁵⁾ Un gran número de pacientes dependen de medicamentos complementarios y alternativos para el tratamiento de las hemorragias.⁽⁶⁾

Actualmente, las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que alrededor del 80 % de la población utiliza los principios de la medicina tradicional en la atención primaria de salud, aproximadamente 20 000 especies de plantas se emplean en los países del tercer mundo.^(7,8) Las herramientas de intercambio para muchos profesionales de la medicina complementaria y alternativa incluyen plantas medicinales, las cuales se usan ampliamente en gran parte del mundo por su actividad hemostática, incluyendo China, África y Sudamérica.^(3,9)

Cuba posee una gran variedad de plantas que están referidas en la medicina tradicional como hemostáticas, entre ellas la especie *Guarea guidonia* (L.) Sleumer; es un árbol común de la familia Meliaceae, conocida con los nombres triviales de yamagua, trompillo o guaraguao.⁽¹⁰⁾ La planta ha sido empleada como expectorante en la medicina popular y tradicional. Se utilizó mucho durante las guerras de independencia para curar las heridas de los mambises. Se asegura que el cocimiento de sus hojas es un remedio eficaz en las hematurias y hemorragias intestinales.⁽¹⁰⁾

Son escasos los estudios farmacognósticos de la planta y no existen evidencias científicas sobre estudios toxicológicos y actividad hemostática, aspectos imprescindibles para la validación de su uso tradicional dado a la especie que crece en Cuba. Tomando en consideración los elementos expuestos el presente estudio tiene el objetivo de evaluar los parámetros farmacognósticos, la seguridad y la actividad hemostática de extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de la *Guarea guidonia* (L.) Sleumer (Meliaceae).

Métodos

Recolección, selección y procesamiento del material vegetal

La especie vegetal utilizada fue *Guarea guidonia* (L.) Sleumer, recolectada en noviembre de 2017 en la localidad Ceiba del Agua, municipio Caimito del Guayabal, provincia Artemisa. Las plantas se encontraron en estado fenológico vegetativo y fueron herborizadas e identificadas en el herbario “Johannes Bisse” del Jardín Botánico Nacional de la Universidad de La Habana, por el MSc. José Ángel García Beltrán, con el código de identificación HFC 90279 (HAJB).

De las colectas realizadas se emplearon las hojas y tallos finos, previamente lavados con agua potable, los cuales fueron cortados en trozos pequeños con ayuda de tijeras. Consecutivamente, se secaron en estufa de recirculación de aire, modelo P/G 2007 ba, serie 081070207, de procedencia China, a una temperatura de 38 °C. La droga se fragmentó en un molino de cuchilla artesanal para su procesamiento y análisis.

Evaluación farmacognóstica

Obtención de extractos

A partir del material vegetal se elaboraron extractos, a razón de 20 g de droga/100 mL de disolvente, por el método de maceración, durante un periodo de siete días, a una temperatura de 30 °C ± 2 °C. Se utilizó como disolvente una mezcla hidroalcohólica al 50 %. Se siguió el procedimiento descrito en la norma cubana NRSP 312⁽¹¹⁾ y por Miranda y Cuéllar.⁽¹²⁾

Parámetros físico-químicos de calidad de los extractos

En las determinaciones se tuvieron en cuenta los parámetros siguientes: propiedades organolépticas (olor, color y apariencia), pH, sólidos totales, densidad relativa, índice de refracción y análisis capilar.^(11,12)

Cromatografía en capa delgada

Se utilizaron placas de 5 x 10 cm, de gel de sílice F_{254nm} (Merck, Alemania) sobre soporte de aluminio. Se utilizó como fase móvil n-butanol: ácido acético: agua (4:1:5 v: v: v). El desarrollo cromatográfico fue de forma ascendente, en una cámara cromatográfica cilíndrica

de vidrio que fue ambientada con el sistema de disolvente antes señalado, por un periodo de 15 minutos. Una vez efectuadas las corridas, las placas se secaron a temperatura ambiente bajo la corriente de aire de la campana hasta evaporación de la fase móvil. Posteriormente, se procedió al revelado según las condiciones siguientes: luz ultravioleta (UV) a 254 nm de longitud de onda y rociado con anisaldehído (2,5 mL de anisaldehído, 50 mL de ácido acético glacial, 425 mL de metanol, 25 mL de ácido sulfúrico. Se calentó a una temperatura de 105 °C aproximadamente, hasta la aparición de manchas o modificación de la apariencia de las ya existentes).

Determinación de fenoles totales y flavonoides totales

Los fenoles totales se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu.⁽¹³⁾ Se utilizó ácido gálico (Sigma-Aldrich) como sustancia de referencia a las concentraciones de 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL y 50 mg/100 mL. Se construyó una curva de calibración de absorbancia contra concentración de dicho patrón y a partir de ella se determinó la concentración de fenoles en los extractos expresada en mg/mL.

Los flavonoides totales se cuantificaron por el método colorimétrico del cloruro de aluminio.⁽¹⁴⁾ Se empleó como sustancia de referencia la quercetina (Sigma-Aldrich) en concentraciones de 5 µg/mL, 20 µg/mL, 50 µg/mL, 60 µg/mL y 80 µg/mL. Se construyó una curva de calibración de absorbancia contra concentración de dicho patrón y se determinó la concentración de flavonoides en los extractos expresada en mg/mL.

Ensayos biológicos

Toxicidad aguda oral

Para evaluar la seguridad de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos se realizó un ensayo de toxicidad aguda oral.^(15,16) El ensayo tuvo una duración de 19 días (cinco de aclimatación y 14 de ensayo).

Se emplearon ratas albinas Wistar procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con su correspondiente certificado de salud y un peso comprendido entre 180 g y 200 g. En el experimento se trabajó con dos grupos de tres animales hembras, cada grupo por cada producto ensayado. La dosis límite utilizada fue de 2000 mg/kg de peso corporal (p.c) de los animales. Las pesadas de las ratas se realizaron en los tiempos 1, 7 y 14

días. Debido a que el extracto se administró por vía oral, se tuvo en cuenta los signos de toxicidad retardada. Se evaluaron en ellos, signos clínicos y conductuales, la ganancia de peso y se examinaron varios órganos (pulmones, corazón, bazo, riñones y estómago).

Evaluación del efecto hemostático

Se utilizó el modelo de sangrado en la pata de la rata.⁽¹⁷⁾ Se usaron ratas Wistar machos con un peso promedio de 250 g y 310 g procedentes del CENPALAB con su correspondiente certificado de calidad. El tiempo que duró la prueba fue de 10 días (cinco de aclimatación y cinco de ensayo). En todos los casos los tratamientos fueron realizados utilizando una cánula oral, el tratamiento se repitió durante cuatro días consecutivos antes de provocarles la lesión. Se crearon cinco grupos de cinco animales cada uno:

- Grupo 1: control sin tratamiento.
- Grupo 2: warfarina sódica 2 mg/kg p.c.
- Grupo 3: fitomenadiona (vitamina K1) 0,142 mg/kg p.c.
- Grupo 4: extracto hidroalcohólico de hojas 400 mg/kg p.c.
- Grupo 5: extracto hidroalcohólico de tallos 400 mg/kg p.c.

Las variables analizadas fueron las siguientes: duración de la hemorragia (tiempo transcurrido luego de realizada la amputación hasta el cese del sangrado) y cantidad de sangrado (cantidad de sangre, en g, vertida desde la amputación hasta la detención de la hemorragia).

Consideraciones éticas

Todos los experimentos biológicos se realizaron siguiendo lo establecido en los procedimientos normalizados de operación (PNO) vigentes en el Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana. No se detectaron alteraciones que pudieran afectar la integridad de los resultados. Todos los animales recibieron una dosificación exacta de acuerdo al peso y la vía de administración utilizada.⁽¹⁸⁾ Al final del ensayo se procedió a sacrificar los

animales empleando para ello una atmósfera saturada de éter, teniendo siempre en cuenta las técnicas de refinamiento planteadas actualmente para realizar los ensayos con animales de experimentación.⁽¹⁹⁾

Los investigadores que participaron en el estudio respetaron los principios éticos que rigen la experimentación animal, garantizando su bienestar y su protección, tanto por la sensibilidad humana ante el sufrimiento animal, como por garantizar la validez de los resultados obtenidos. Se cumplió con las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas.⁽¹⁹⁾

Análisis estadístico

Los resultados correspondientes a las evaluaciones farmacognósticas de los extractos fueron procesados por el programa Statgraphics®Plus, versión 5.0. Se llevó a cabo un análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA-1), y para la comparación de las medias la prueba t de Student, considerando diferencias significativas $p < 0,05$.

En el ensayo farmacológico se hallaron las medias y desviaciones estándar de cada uno de los parámetros evaluados en cada grupo experimental, y fueron comparados utilizando la prueba de Tukey.

Resultados

A los extractos de hojas y tallos se les determinó un conjunto de parámetros de calidad, los cuales se presentan en la tabla 1. Desde el punto de vista organoléptico los extractos de hojas y tallos tuvieron una apariencia translúcida, de color ámbar oscuro (más intenso para el extracto de hojas) y olor característico maderable.

Tabla 1 - Parámetros físico-químicos de los extractos de *G. guidonia*

Parámetros	Resultados	
	Hojas	Tallos
pH	4,90/0,01 ^a	4,86/0,01 ^b
Sólidos totales (%)	1,48/0,01 ^c	0,79/0,07 ^d
Índice de refracción	1,3514/0,0004 ^e	1,3508/0,0001 ^e
Densidad relativa (g/mL)	0,9537/0,0001 ^f	0,9466/0,0008 ^g
Imagen capilar (altura en cm)	11,6/0,4 ^h	9,8/0,2 ⁱ

Los resultados se expresan como la media /la desviación estándar. Letras diferentes en una fila indican diferencias significativas, según t-Student ($p < 0,05$).

En la figura 1 se ilustra la imagen capilar de los dos extractos, de utilidad en su caracterización farmacognóstica. El extracto de hojas manifestó una imagen alta (mayor de 8 cm), poco coloreada, franja (límite superior de ascensión del líquido) entre regularmente dentada y profundamente dentada. Sub-franja (región generalmente poco coloreada, comprendida entre la franja y la zona superior de la banda) de color crema amarillento, la banda (zona generalmente pigmentada debido a la presencia de sustancias coloreadas) con varias tonalidades (entre crema oscuro y carmelita) y la sub-banda (situada debajo de la banda) se mostró crema amarillento. En el extracto de tallos la imagen fue alta, poco coloreada, con franja festonada y regularmente dentada, la sub-franja mostró un color crema claro, la banda presentó gamas de colores entre crema oscuro y carmelita, y la sub-banda se visualizó crema oscuro. Ambas muestras frente a los vapores de amoníaco intensificaron su color hacia tonalidades de amarillo, lo cual fue indicativo de la presencia de metabolitos con características ácidas, entre ellos, compuestos de naturaleza fenólica.

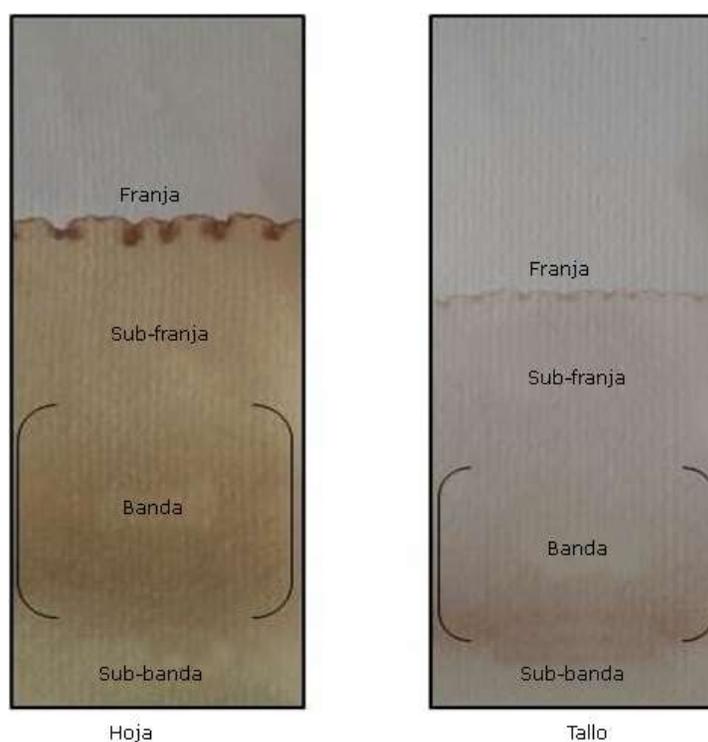


Fig. 1 - Imagen capilar de los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de *G. guidonia*.

La cromatografía en capa delgada constituyó parte del análisis fitoquímico de los extractos. En la figura 2 se muestran los cromatogramas del análisis.

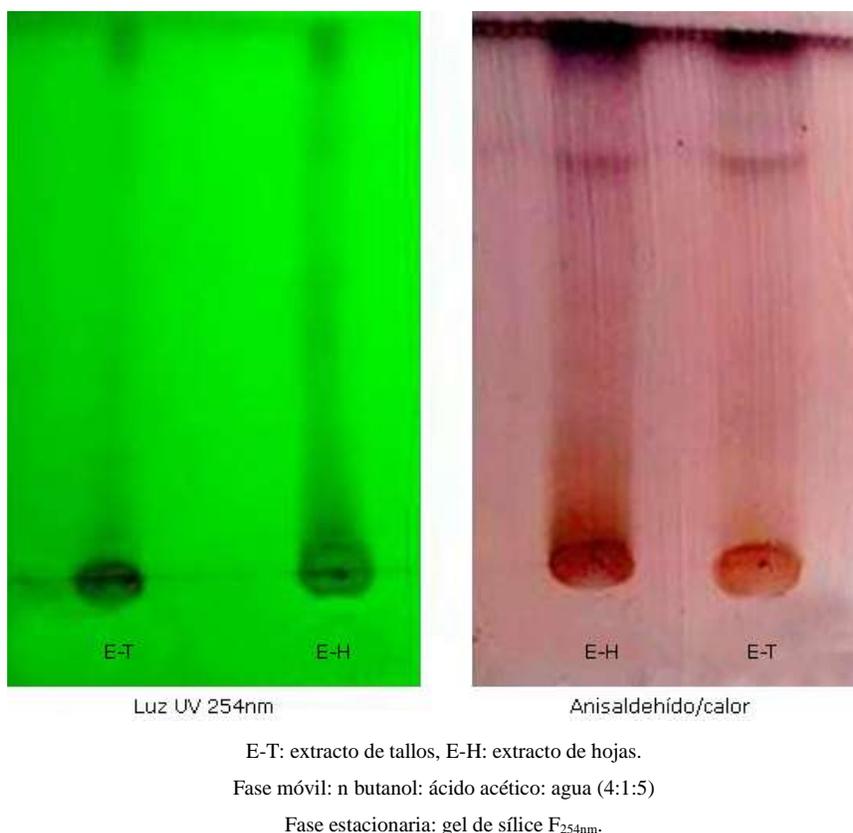


Fig. 2 - Cromatografía en capa delgada de los extractos hidroalcohólicos de *G. guidonia*.

Al visible se observó poca complejidad cromatográfica de los extractos. La exposición a la luz ultravioleta (254 nm) permitió observar modificaciones en el color de las manchas; este comportamiento es característico de metabolitos con grupos cromóforos en su estructura. En el revelado con solución de anisaldehído aparecieron manchas de colores variables, destacándose algunas de color rojizas en el punto de aplicación y otras naranjas, características de estructuras fenólicas en general y flavonoides. También fueron observadas manchas de R_f (factor de retardo o retención) alto de color violáceo intenso y marrón. Como parte del análisis fitoquímico de los extractos también se cuantificaron los fenoles y flavonoides, por ser metabolitos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. En la tabla 2 se evidencian los resultados.

Tabla 2 - Fenoles totales y flavonoides totales en los extractos de *G. guidonia*

Extractos	Fenoles totales (mg/mL)	Flavonoides totales (mg/mL)
Hojas	0,70/0,01 ^a	0,32/0,01 ^c
Tallos	0,63/0,01 ^b	0,12/0,02 ^d

Los resultados se expresan como la media /la desviación estándar (n = 3).

Letras diferentes en una columna indican diferencias significativas según t-Student ($p < 0,05$).

Tras la aplicación de la prueba de toxicidad aguda, los animales de los dos grupos tratados con los extractos (hojas y tallos) tuvieron ganancia en peso durante todas las pesadas efectuadas en el transcurso del experimento. No se observaron alteraciones clínicas cuando se analizaron sistema respiratorio, circulatorio, autónomo, nervioso central, mudanza de pelos, temblores, convulsiones, salivación, sedación, somnolencia y muerte. Durante los 14 días de estudio no hubo manifestación alguna de signos de toxicidad retardada. Desde el punto de vista macroscópico no se presentaron daños en las muestras tomadas de los órganos seleccionados (pulmón, corazón, bazo, riñones, estómago), por lo que el patólogo decidió no efectuar su toma para su estudio histopatológico.

Los extractos fueron probados para medir su efecto hemostático por vía oral, para lo cual se empleó una dosis de 400 mg/kg de peso corporal de los animales de ensayo. En la tabla 3 se presentan los resultados del estudio.

Tabla 3 - Resultados de la duración de la hemorragia y cantidad de sangre vertida durante el experimento

Grupos	Duración del sangramiento (min)	Cantidad de sangramiento (g)
1. Control sin tratamiento	2,96/0,46 ^a	1,43/0,40 ^d
2. Warfarina sódica 2mg/kg	4,30/0,39 ^b	4,33/0,40 ^e
3. Fitomenadiona (vitamina K1) 0,142 mg/kg	1,06/0,07 ^c	1,34/0,79 ^d
4. Extracto hidroalcohólico de hojas 400 mg/kg	1,08/0,18 ^c	2,47/0,47 ^f
5. Extracto hidroalcohólico de tallos 400 mg/kg	1,08/0,25 ^c	2,25/0,65 ^f

Los resultados se expresan como la media / la desviación estándar.

Letras diferentes indican que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) según Tukey.

Discusión

Se elaboraron extractos con mezcla hidroalcohólica al 50 %, considerándolo como el mayor poder extractivo de este disolvente, a partir de los resultados obtenidos por el grupo de trabajo en experiencias anteriores. El método de extracción que se aplicó fue la maceración (siete días), por ser simple, uno de los más utilizados para la preparación de extractos y poco agresivo para el material vegetal, ya que no se aplica calor a la muestra.^(20,21)

En términos generales se aprecia diferencias en los parámetros físico-químicos de calidad de los extractos. Se observa un pH ácido, que puede estar condicionado por la presencia de compuestos fenólicos, cuyas estructuras presentan grupos funcionales como los hidroxilos fenólicos que aportan esta característica al medio.^(21,22) Otro parámetro medido de gran importancia es el contenido de sólidos totales, los cuales brindan información sobre la cantidad de sólidos no volátiles presentes en un extracto, además de servir de base para el ajuste de dosis cuando se evalúa en ensayos farmacológicos y toxicológicos. En este sentido, el mayor porcentaje lo presenta el extracto de hojas. Por su parte, el análisis capilar también muestra diferencias en la apariencia de la imagen y en su altura, la que es más intensa para el extracto de hojas. Las determinaciones físico-químicas realizadas a los extractos de hojas y tallos, se informan por vez primera para la especie.

Respecto al comportamiento cromatográfico de los extractos, la fase móvil empleada logra separar, de alguna manera, los componentes según su polaridad, observando más complejidad en el extracto de las hojas. Se visualizan coloraciones típicas de compuestos fenólicos y otras asociadas a estructuras terpénicas, entre ellas, triterpenoides.⁽²³⁾ En las determinaciones cuantitativas se constata diferencias significativas en el contenido de fenoles y flavonoides donde, igualmente, el extracto de hojas alcanza la mayor concentración. Las diferencias pueden estar asociadas a las características propias del órgano vegetal ensayado. Estos resultados no han sido reportados con anterioridad en extractos hidroalcohólicos al 50 % de hojas y tallos de la planta.

Atendiendo a los informes fitoquímicos de la literatura relacionados con la especie, los resultados hasta el momento, bajo las condiciones probadas, confirman tentativamente la presencia de triterpenoides, los cuales fueron detectados por cromatografía en capa delgada, lo que está en correspondencia con lo referido por *Hernández* y otros.⁽²⁴⁾ También es notoria la presencia de compuestos fenólicos, en concordancia con lo descrito por *Morrell*.⁽²⁵⁾ Estos

compuestos tienen una demostrada actividad antioxidante,⁽²⁶⁾ hepatoprotectora, antitumoral, antiviral,⁽²⁷⁾ antiinflamatoria,⁽²⁸⁾ presentan propiedades analgésicas,⁽²⁹⁾ hemostáticas,^(30,31) entre otras.

Dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de toxicidad a dosis única, imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia. Los que se describen como los estudios cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas.⁽³²⁾ En la experiencia realizada se utilizó una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal y se pudo evidenciar que la administración de forma aguda de los extractos de *G. guidonia*, por vía oral, no produce efectos tóxicos en los animales ensayados.

Muchas plantas medicinales contienen sustancias que promueven la hemostasia y cuando se administran por vía oral o externa, pueden ayudar a soportar el proceso a través del cual se detiene el sangrado. Los componentes hemostáticos y mecanismos de acción han sido investigados en otros estudios usando el modelo de sangrado de la rata, donde se tiene en cuenta la duración de la hemorragia y la cantidad de sangre expulsada.^(17,33)

En cuanto a la duración del sangramiento se obtuvieron valores similares entre los dos extractos y la vitamina K1, sin diferencias significativas. Sin embargo, se percibe discrepancias entre los grupos anteriores, el control sin tratamiento y la warfarina, siendo en este último grupo (2) donde mayor tiempo demoró en detenerse el sangrado. Cuando se analiza la cantidad de sangre expulsada, el análisis estadístico demuestra que los extractos difieren de los restantes grupos, la cantidad de sangre es mayor que la expulsada por la vitamina K1 y el control sin tratamiento, aunque menos que la warfarina sódica.

Es conocido que los agentes hemostáticos pueden actuar activando los factores de la coagulación, produciendo vasoconstricción, incrementando la agregación plaquetaria o por mediación de la actividad anti-fibrinolítica.^(34,35) En este sentido, el comportamiento observado en los extractos pudiera estar relacionados con un mecanismo que promueva la agregación plaquetaria, lo cual explicaría una reducción del tiempo de sangrado debido a la formación de la placa ateromatosa.⁽³⁶⁾ Además, la presencia de flavonoides y taninos (compuestos fenólicos) en la planta favorecen este proceso mediante la formación de tapones vasculares y la reducción del sangrado debido también al efecto antioxidante relacionado a estos metabolitos.^(27,30)

El hecho de que los extractos hayan provocado un incremento en la cantidad de sangrado respecto a la vitamina K y el control sin tratamiento, aunque con valores inferiores a los obtenidos para la warfarina, pudiera estar asociado a la presencia de otros metabolitos secundarios como las coumarinas presentes en la especie^(37,38) y en el extracto ensayado fitoquímicamente en estudios anteriores por el grupo de trabajo.

Las coumarinas son metabolitos secundarios de la clase de compuestos orgánicos benzopirona que se encuentran en muchas plantas y poseen una variedad de propiedades farmacológicas tales como actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antidiabética y antioxidante, así como una influencia significativa en procesos fisiológicos como inhibidores enzimáticos. Una actividad farmacológica importante es la anticoagulante y su mecanismo de acción radica en el antagonismo competitivo de la vitamina K, a través del cual inhiben la coagulación de la sangre en el cuerpo al prevenir la producción de protrombina y varios factores de coagulación. La actividad también puede conducir a un sangrado no deseado.⁽³⁹⁾ Otros estudios han demostrado que algunos derivados de coumarinas causan un aumento significativo en el sangrado y el tiempo de coagulación en ratas en comparación con la warfarina.⁽⁴⁰⁾

Los extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos lograron detener el sangrado después de la amputación de la pata de la rata, en un tiempo similar a la fitomenadiona, se demostró un buen efecto hemostático desde el punto de vista de la duración del sangramiento. Otros posibles mecanismos como la promoción del sistema de coagulación sanguínea por modulación de uno o más factores que intervienen en el proceso de coagulación se necesitan esclarecer en próximos estudios.

Se puede concluir que los resultados obtenidos hacen una valiosa contribución al estudio de las propiedades biológicas de *G. guidonia* que crece en Cuba, proporcionando los primeros hallazgos sobre la demostración de su efecto hemostático, referido de manera tradicional para la especie. La evaluación farmacognóstica de los extractos permitió establecer un conjunto de parámetros que aseguran la calidad de la especie vegetal, lo que sienta las bases para la confección de la futura monografía de la planta.

Agradecimientos

Los autores agradecen al maestro Santiago Pereira, que con su sabiduría y experiencia popular en el uso de las plantas medicinales motivó al estudio de *Guarea guidonia* (yamagua) como una alternativa natural por sus propiedades hemostáticas. Agradecemos a la técnico Silvia Bárbara Malagón y al personal del Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos de La Universidad de La Habana por el soporte material para la realización de los ensayos biológicos.

Referencias bibliográficas

1. Holmström M, Nangarhari A, Öhman J, Duberg AS, Majeed A, Aleman S. Long-term liver-related morbidity and mortality related to chronic hepatitis C virus infection in Swedish patients with inherited bleeding disorders. *Hemophilia* 2016;22(6):e494-e501. DOI: [10.1111/hae.13020](https://doi.org/10.1111/hae.13020)
2. Yang SC, Hsu CN, Liang CM, Tai WC, Wu CK, Shih CW, *et al.* Risk of Rebleeding and Mortality in Cirrhotic Patients with Peptic Ulcer Bleeding: A 12-Year Nationwide Cohort Study. *PLoS One*. 2017;12(1):e0168918. DOI: [10.1371/journal.pone.0168918](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168918)
3. Yacouba LD, Issa S, Adiaratou T, Yacouba C, Boubacarsidiki ID, Aboubacar ST, *et al.* Biochemical and Hemostatic properties of herbal plants used for the treatment of bleeding in Mali. *Academia Journal of Medicinal Plants*. 2018;6(8):241-248. DOI: [10.15413/ajmp.2018.01.37](https://doi.org/10.15413/ajmp.2018.01.37)
4. Sogut O, Erdogan MO, Kose R, Boleken ME, Kaya H, Gokdemir MT, Ozgonul A, Iynen I, Albayrak L, Dokuzoglu MA. Hemostatic efficacy of a traditional medicinal plant extract (Ankaferd Blood Stopper) in bleeding control. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2015 May;21(4):348-53. DOI: [10.1177/1076029613504129](https://doi.org/10.1177/1076029613504129).
5. Konar H, Chakraborty AB. Maternal Mortality: A FOGSI Study (Based on Institutional Data). *J. Obstet. Gynaecol. India*. 2013;63(2):88-95. DOI: [10.1007/s13224-012-0258-1](https://doi.org/10.1007/s13224-012-0258-1)
6. Wang YJ, He LQ, Sun W, Lu Y, Wang XQ, Zhang PQ, *et al.* Optimized project of traditional Chinese medicine in treating chronic kidney disease stage 3: A multicenter double-blinded randomized controlled trial. *Ethnopharmacol*. 2012; 139(3):757-64.

7. Piao DSL, Lavorb AL, Damascenoa CMD, Menezesc PMN, Silvac FS, Maia GLA. Traditional knowledge and uses of medicinal plants by the inhabitants of the islands of the São Francisco River, Brazil and preliminary analysis of *Rhaphiodon echinus* (Lamiaceae). Brazilian Journal of Biology. 2019;79(1):87-99. DOI: [10.1590/1519-6984.177447](https://doi.org/10.1590/1519-6984.177447)
8. Thampi R, Mercykutty MJ, Jalaja SM. Traditional knowledge on use of medicinal plants grown in homesteads as home remedies. Journal of Medicinal Plants Studies. 2019 ;7(2):01-04. [acceso 02/03/2017]. Disponible en: <https://www.plantsjournal.com/archives/?year=2019&vol=7&issue=2&part=A&Article=948>
9. Saidu K, Onah J, Orisadipe A, Olusola A, Wambebe C, Gamaniel K. Antiplasmodial, analgesic, and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the stem bark of *Erythrina senegalensis*. J. Ethnopharmacol. 2000;71(1-2):275-280.
10. Roig JT. Diccionario botánico de nombres vulgares cubanos. Tomo I. Cuarta edición. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 2014 p. 932-933.
11. MINSAP. NRSP 312. Norma Ramal. Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayo. Cuba: Ministerio de Salud Pública; 1992 p. 15-19.
12. Miranda MM, Cuéllar AC. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana, Cuba: Editorial Félix Varela; 2000. p. 25-49,74-79.
13. Chlopicka J, Pasko P, Gorinstein S, Jedryas A, Zagrodzki P. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. LWT-Food Science and Technology. 2012;46:548-55. DOI: [10.1016/j.lwt.2011.11.009](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.009)
14. Pourmorad F, Hosseinimerhr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 2006 [acceso 02/03/2017];5(11):1142-45. Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/42999>
15. OECD. Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo 423. Guidelines for testing of chemical. Paris: OECD; 2001.
16. Hayes W. Principles and Methods of Toxicology. Principles and Methods for Acute Toxicity and Eye Irritancy. N.Y: Ed. Raven Press, Ltd.; 1989:169-220.
17. Cipil HS, Kosar A, Kaya A, Uz B, Haznedaroglu IC, Goker H, *et al.* *In vivo* hemostatic effect of the medicinal plant extract ankaferd blood stopper in rats pretreated with warfarin.

Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis 2009; 15(3):270-76. DOI: [10.1177/1076029608329578](https://doi.org/10.1177/1076029608329578)

18. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, *et al.* A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. J. Appl. Toxicol. 2001;21(1):15-23. DOI: [10.1002/jat.727](https://doi.org/10.1002/jat.727)

19. Asociación Médica Mundial. Declaración de la AMM sobre el Uso de Animales en la Investigación Biomédica. Buenos Aires, Argentina:WMA; 2016 [acceso 02/03/2017]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policiess-post/declaracionde-la-amm-sobre-el-uso-de-animales-en-la-investigacionbiomedica/>

20. Balakrishna T, Vidyadhara S, Sasidhar RLC, Ruchitha B, Venkata PE. A review on extraction techniques. IAJPS. 2016 [acceso 02/03/2017];3(8):880-91. Disponible en: <http://www.iajps.com>

21. Zhang QW, Lin LG, Ye Wc. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. Chinese Medicine. 2018;13:26. DOI: [10.1186/s13020-018-0177-x](https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x)

22. Sobiesiak M. Chemical Structure of Phenols and Its Consequence for Sorption Processes. Chapter 1. In: Phenolic Compounds - Natural Sources, Importance and Applications Intech open Science. 2017. DOI: [10.5772/66537](https://doi.org/10.5772/66537)

23. Lock O. Investigación fitoquímica. Métodos para el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú: Fondo editorial; 1988. p. 58-87.

24. Hernández V, De Leo M, Cotugno R, Braca A, De Tommasi N, Severino L. New Tirucallane-Type Triterpenoids from *Guarea guidonia*. Planta Med. 2018;84(9-10):716-20. DOI: [10.1055/s-0044-100524](https://doi.org/10.1055/s-0044-100524)

25. Morrell TAM. Evaluación de la monografía de control de calidad del polvo obtenido de las hojas de la *Guarea guidonia* L. [tesis para optar por el título de Máster en Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural]. [Villa Clara]: Facultad de Química-Farmacia. Universidad Central Marta Abreu; 2015.

26. Aryal S, Kumar BM, Danekhu K, Kunwar P, Gurung R and Koirala N. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. Plants. 2019;8(96):1-12. DOI: [10.3390/plants8040096](https://doi.org/10.3390/plants8040096)

27. Shashank K, Abhay KP. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. The World Journal. 2013;2013:162750. DOI: [10.1155/2013/162750](https://doi.org/10.1155/2013/162750)

28. Ginwala R, Bhavsar R, Chigbu DeGaulle I, Jain P and Khan ZK. Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin. *Antioxidants* 2019;8(35):1-30. DOI:[10.3390/antiox8020035](https://doi.org/10.3390/antiox8020035)
29. Arunachalam K, Parimelazhagan T, Manian S. Analgesic and Antiinflammatory effects of *Merremia tridentata* (L.) Hallier F. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011 [acceso 02/03/2017];3(1):75-9. Disponible en: <https://innovareacademics.in/journal/ijpps/Vol3Issue1/968.pdf>
30. Dandjesso C, Klotoé JR, Dougnon TV, Sègbo J, Atègbo JM, Gbaguidi F, *et al*. Phytochemistry and hemostatic properties of some medicinal plants sold as anti-hemorrhagic in Cotonou markets (Benin). *Indian Journal of Science and Technology* 2012 [acceso 02/03/2017];5(8). Disponible en: https://www.academic.edu/26474464/Phytochemistry_and_hemostatic_properties_of_some_medicinal_plants_sold_as_anti_hemorrhagic_in_Cotonou_markets_Benin
31. Manjusha B, Ujjwala K, Bhagwat D, Yashavant D. Hemostatic activity of the various extracts of the flower of *tridax procumbens* on the human blood clotting time: a comparative *in vitro* study. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2017 [acceso 02/08/2017];6:871-78. Disponible en: https://www.wjpps.com/Wjpps_controller/abstract_id/8207
32. Bermúdez Toledo D, Monteagudo Jiménez E, Boffill Cárdenas M, Díaz Costa LE, Roca Simeón A, Betancourt Morgado E, *et al*. Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. *Revista electrónica de Veterinaria*. 2007;VIII(3):1-7. Disponible en: <https://redalyc.org/articulo.oa?id=63613302006>
33. Ohkura N, Yokouchi H, Mimura M, Nakamura R, Atsumi G. Screening for hemostatic activities of popular Chinese medicinal herbs *in vitro*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*. 2015 [acceso 02/08/2017];4(1):19-23. DOI: [10.5455/jice.20141128032845](https://doi.org/10.5455/jice.20141128032845)
34. Ebrahimi F, Torbati M, Mahmoudic J, Valizadehd H. Medicinal plants as potential hemostatic agents. *J Pharm Pharm Sci*. 2020;23(1):10-23. DOI: [10.18433/jpps30446](https://doi.org/10.18433/jpps30446)

35. Chamara AMR, Thiripuranathar G. Assessment of haemostatic activity of medicinal plants using in vitro methods: A Concise Review. Journal Of Pharmacy And Biological Sciences 2020; 15(1) Ser. II.26-34. DOI: [10.9790/3008-1501022634](https://doi.org/10.9790/3008-1501022634)
36. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: fisiología de la activación y la inhibición. Rev. Esp. Cardiol. Supl. 2013;13(Supl. B):2-7. DOI: [10.1016/S1131-3587\(13\)70073-6](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(13)70073-6)
37. Garcez FR, Núñez CV, Garcez WS, Almeida RM, Roque NF. Sesquiterpenes, Limonoids and Coumarin from the Wood Bark of *Guarea Guadonina*. Planta Medica 1998;64:79-80.
38. Brochini C, Roque N. Two new cneorubin related diterpenes from the leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). J Brz Chem Soc. 2000;11:361-364. DOI: [10.1590/S0103-50532000000400006](https://doi.org/10.1590/S0103-50532000000400006)
39. Bipat R. From Rat Poison to Medicine: Medical Applications of Coumarin Derivatives. In: Phytochemicals in Human Health. IntechOpen 2019;1-14. DOI: [10.5772/intechopen.89765](https://doi.org/10.5772/intechopen.89765).
40. Kasperkiewicz K, Ponczek MB, Owczarek J, Guga P and Budzisz E. Antagonists of Vitamin K - popular coumarin drugs and new synthetic and natural coumarin derivatives. Molecules 2020; 25. DOI:[10.3390/molecules25061465](https://doi.org/10.3390/molecules25061465)

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no presentan conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Yamilet Irene Gutiérrez Gaitén: conceptualización; análisis formal; investigación; metodología; administración de proyecto; supervisión; redacción - revisión y edición; redacción - borrador original.

Ramón Scull Lizama: investigación; metodología; redacción – revisión.

Marianelys Hernández Martínez: investigación; metodología; redacción – revisión.

Alejandro Felipe González: curación de datos; análisis formal.

Regla Maité Casanova Orta: metodología; recursos.

Gastón García Simón: metodología; recursos.