



---

GRADO EN FARMACIA  
TRABAJO DE FIN DE GRADO  
CURSO 2017-2018

---

**“ACTIVIDAD ANALGÉSICA Y ANTIINFLAMATORIA  
DE ESPECIES VEGETALES ENDÉMICAS DE  
CANARIAS”**

Alumna: Eva Fernández Gómez

Tutora: Dra. Sandra Dévora Gutiérrez

## ÍNDICE

<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	3
MATERIAL VEGETAL .....	3
PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.....	3
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	3
ENSAYOS FARMACOLÓGICOS .....	4
ACTIVIDAD ANALGÉSICA .....	4
Prueba de torsión inducida por ácido acético.....	4
Test de la formalina.....	4
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.....	5
Test de Levy .....	5
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	5
<b>RESULTADOS</b> .....	6
ACTIVIDAD ANALGÉSICA.....	6
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA .....	8
<b>DISCUSIÓN</b> .....	9
<b>CONCLUSIONES</b> .....	11
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	12

## ABSTRACT.

Ethnopharmacological relevance: *Neochamaelea pulverulenta* is an endemic plant of the Canary Islands, popularly used as a natural therapeutic agent to treat different ailments including fever or rheumatism.

Objective: the general objective of this study is to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of an extract of *Neochamaelea pulverulenta* in rodents.

Materials and methods: antinociceptive effect has been evaluated in Swiss albino mice through oral administration of an aqueous extract of *Neochamaelea pulverulenta* with the acetic acid and formalin test. For the evaluation of the anti-inflammatory activity, the carrageenan test was used.

Results: oral administration of *Neochamaelea pulverulenta* significantly reduced the nociception caused by acetic acid (95.90 %;  $p < 0.001$ ) and formalin (78.01 % and 57.37 %;  $p < 0.01$  peripheral and central, respectively) at dose of 5000 mg kg<sup>-1</sup>. The anti-inflammatory activity fluctuated with time and different values could be obtained, using the carrageenan test. The dose of 2500 mg kg<sup>-1</sup> achieved the best value in this test (69.15%).

Conclusion: these data show for the first time that *Neochamaelea pulverulenta* has important peripheral and central analgesic effects as central. *Neochamaelea pulverulenta* possesses anti-inflammatory activity but more studies could be done to specify its variable activity.

## INTRODUCCIÓN.

La relación del ser humano con su entorno ha sido una constante hasta nuestros días. Ya en los inicios de la civilización no sólo se buscaba alimento en el entorno natural, sino que se utilizaban hierbas y determinados remedios con fines religiosos y curativos. Este es el origen de una medicina tradicional que se ha transmitido hasta nuestros días, sin una base científica más que la experiencia. La medicina, como hoy la conocemos, es una ciencia y, por ello, se basa en pruebas científicas para determinar la eficacia de un determinado compuesto, de ahí el interés por desmentir o corroborar estos remedios naturales [1].

*Neochamaelea pulverulenta* (Vent.) Erdtman (NP) es una especie endémica de Canarias perteneciente a la familia *Cneoraceae*. Su uso se remonta a tiempos de los aborígenes, siendo utilizada en los ritos funerarios por sus propiedades conservativas. Más adelante, ha tenido un papel interesante como planta medicinal [1,2]. A la infusión del tallo y sus sumidades se le atribuyen propiedades antipiréticas, antiasmáticas e hipoglucemiantes, además de ser usada como anticatarral. Asimismo, ha sido utilizada para paliar diferentes dolencias como el reuma o la artrosis [1,2].

Presente únicamente en las islas de Gran Canaria, Tenerife, La Gomera y El Hierro, es polinizada por hormigas y abejas pequeñas. Sus semillas forman parte de la dieta de lagartos endémicos (género *Gallotia*), que permiten su diseminación [3]. Existe controversia de si NP se encuentra en peligro de extinción puesto que la desaparición de estos lagartos, por la reducción de su hábitat y la introducción y proliferación de roedores, está dificultando su diseminación.

Vulgarmente se la conoce como leña santa, leña buena, leña blanca u orijama. Se trata de un arbusto de hasta 1,5 metros, de aspecto blanco grisáceo, con flores amarillas y frutos drupáceos formados por entre 2 a 4 cocas rojizas [2].



Imagen 1. *Neochamaelea pulverulenta*.

Según estudios fitoquímicos, contiene cumarinas, cromonas (derivado de las antraquinonas), neochamelina, pulverina, pulverocromenol, principios amargos y beta-sitosterol. La presencia de cumarinas y cromonas es interesante para este estudio debido a que poseen propiedades analgésicas, además de permitir la relajación muscular [2, 4].

Por todo lo expuesto, el presente trabajo de fin de grado trata de verificar, mediante ensayos en animales de experimentación, la posible actividad analgésica y antiinflamatoria de esta especie vegetal.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### MATERIAL VEGETAL.

*Neochamaelea pulverulenta* (Vent.) Erdtman (*Cneoraceae*) fue recolectada, en 2017, en el litoral de Juan Centellas (Icod de los Vinos, Tenerife, Islas Canarias) a 70 metros de altitud sobre el nivel del mar. La recolección e identificación fue llevada a cabo por el Dr. D. Pedro L. Pérez de Paz y el Dr. D. Vicente-Lope Lucía Sauquillo, del Departamento de Biología Vegetal, Universidad de La Laguna (Tenerife, España), lugar donde han sido depositadas muestras de esta especie (TFC 52.676 y 52.677).

### PREPARACIÓN DEL EXTRACTO.

*Neochamaelea pulverulenta* fue secada en un horno a 40 °C durante cuatro días y luego triturada y molida mediante molienda mecánica. El extracto acuoso se preparó al 5 %, para lo cual, se pesó 5 g de material vegetal pulverizado al que se añadió 100 ml de agua destilada hirviendo y se dejó reposar, a temperatura ambiente, durante 15 minutos para su posterior filtrado.

Para los estudios farmacológicos, se administró, por vía oral, 1 ml del extracto acuoso por cada 40 g de peso corporal del animal a las dosis de 1250, 2500, 3750 y 5000 mg kg<sup>-1</sup>.

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratones *Swiss* albino hembras de peso comprendido entre 20 y 30 g obtenidos del Estabulario de la Universidad de La Laguna. Los animales fueron alojados a 26 °C ± 1 °C bajo un ciclo de 12 h de luz / 12 h de oscuridad y con acceso a dieta comercial estándar y agua *ad libitum*. Los animales se mantuvieron en ayunas las 6 horas previas al ensayo y cada ratón fue sometido a sólo un ensayo en todo el estudio. Todos los procedimientos aquí descritos se han realizado de conformidad con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010 [5], relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, previa aprobación del Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal de la Universidad de La Laguna (CEIBA2017-0237).

Los animales fueron divididos en lotes de cinco ratones cada uno haciendo uso de jaulas de laboratorio, siendo estos lotes, para todos los ensayos:

- Control negativo: se administró agua destilada, por vía oral.
- Control positivo: se administró ibuprofeno (Acofarma, España) a 75 mg kg<sup>-1</sup>, por vía oral. El ensayo de formalina requirió, además, de otro lote para el control de la analgesia a nivel central, al que se administró morfina (Braun, España) a 10 mg kg<sup>-1</sup>, por vía intraperitoneal.
- Muestra de *Neochamaelea pulverulenta*: cuatro lotes a los que se administró el extracto acuoso a 1250, 2500, 3750 y 5000 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, por vía oral.

## ENSAYOS FARMACOLÓGICOS.

### ACTIVIDAD ANALGÉSICA.

#### Prueba de torsión inducida por ácido acético.

Esta prueba es útil para valorar la actividad analgésica periférica de una sustancia.

Cuarenta y cinco minutos después de la administración oral a cada lote, cada ratón fue administrado, intraperitonealmente, con una solución de ácido acético (Panreac, España) preparado al 0,7 %, y a la dosis de 10 ml kg<sup>-1</sup>. Inmediatamente después, cada animal fue colocado en una jaula de observación y se contó el número de estiramientos/retorcimientos durante 20 minutos [6-8].

La actividad analgésica se calculó haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = 100 - \bar{X} 100 / \bar{X}_{\text{CN}}$$

Siendo:

$\bar{X}$ : media de estiramientos de los lotes problema.

$\bar{X}_{\text{CN}}$ : media de estiramientos del control negativo.

#### Test de la formalina.

Este test es ampliamente utilizado para estudiar la actividad analgésica periférica y central de una sustancia. Por ello, se utilizan dos lotes control positivo: un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) como referencia de la actividad analgésica periférica y un opiáceo como control de la actividad analgésica a nivel central.

Una hora después de la administración oral de cada lote y treinta minutos después de la administración intraperitoneal de morfina se inyectó, en la pata trasera izquierda de los animales, 10 µl de formaldehído al 2,5 % (Panreac, España), en solución buffer. El número de sacudidas en la primera fase (0 - 5 min) y el tiempo en segundos que pasaron los ratones lamiendo o mordiendo la pata inyectada en la segunda fase (15 - 30 min) se registró y se tomó como un indicador de la respuesta al dolor central y periférico, respectivamente [7-10]. El porcentaje de inhibición de respuesta al dolor se calculó, en cada fase, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = 100 - \bar{X} 100 / \bar{X}_{\text{CN}}$$

Siendo:

$\bar{X}$ : media de sacudidas/lamidas de los lotes problema.

$\bar{X}_{\text{CN}}$ : media de sacudidas/lamidas del control negativo.

## ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

### Test de Levy.

Treinta minutos después de la administración oral a cada lote se indujo el edema, en la pata trasera izquierda del animal de experimentación, administrando 25 µl de carragenina (Merck, España) suspendida en solución buffer. La inflamación se cuantificó midiendo el grosor de cada pata trasera, con un calibrador, a las 4 h después de la inyección de carragenina [8, 11]. Los resultados se expresan como variación en el espesor entre las patas derecha e izquierda a las 4 h según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ INHIBICIÓN} = 100 - \bar{X} 100 / \bar{X}_{\text{CN}}$$

Siendo:

$\bar{X}$ : media de la diferencia de grosor de las patas traseras de los lotes problema.

$\bar{X}_{\text{CN}}$ : media de la diferencia de grosor de las patas traseras del control negativo.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados están expresados como  $\bar{X}$  (la media)  $\pm$  EEM (error estándar de la media). La evaluación estadística se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la diferencia entre las medias de los grupos de tratamiento y del grupo control negativo fue evaluada a través del Student's *t*-test. Los valores de *p* inferiores a 0,05 son considerados estadísticamente significativos. El programa informático utilizado fue el Microsoft Excel 2010 [13].

## RESULTADOS.

### ACTIVIDAD ANALGÉSICA.

El efecto analgésico del extracto acuoso de *Neochamaelea pulverulenta* (NP) se evaluó mediante las pruebas de torsión inducida por ácido acético y la prueba de formalina.

La prueba de torsión inducida por ácido acético (Tabla 1) dio como resultado unos porcentajes de analgesia comprendidos entre el 9,13 y el 95,90 %. Así, todas las dosis del extracto acoso de NP redujeron la torsión inducida por el ácido acético de manera dependiente de la dosis, salvo con la correspondiente a 1250 mg kg<sup>-1</sup>. Destaca la dosis más alta de extracto acuoso, 5000 mg kg<sup>-1</sup>, con una inhibición del estímulo doloroso correspondiente a un 95,90 % ( $p < 0,001$ ), comparable al producido por el control positivo.

Tabla 1. Resultados del test de torsión inducido por ácido acético.

LOTE	DOSIS (mg kg <sup>-1</sup> p.o.)	$\bar{X} \pm \text{EEM}$	INHIBICIÓN (%)
Control (-)	-	89,50 $\pm$ 6,40	-
Ibuprofeno	75	0,00 $\pm$ 0,00***	100,00
Extracto acuoso NP	1250	72,25 $\pm$ 7,68**	19,27
Extracto acuoso NP	2500	81,33 $\pm$ 6,66**	9,13
Extracto acuoso NP	3750	68,67 $\pm$ 6,81**	23,27
Extracto acuoso NP	5000	3,67 $\pm$ 0,58***	95,90

$\bar{X}$ : media de las contracciones/estiramientos; EEM: error estándar de la media.

\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$

Los resultados de los efectos antinociceptivos de NP sobre la respuesta al dolor producido por formalina se presentan en las Tablas 2 y 3.



Tabla 2. Resultados de la primera fase del test de la formalina.

LOTE	DOSIS (mg kg <sup>-1</sup> p.o.)	$\bar{X} \pm \text{EEM}$	INHIBICIÓN (%)
Control (-)	-	46,33 $\pm$ 7,02	-
Morfina	10 (i.p.)	10,75 $\pm$ 2,87**	76,80
Ibuprofeno	75	27,33 $\pm$ 7,09*	41,01
Extracto acuoso NP	1250	27,33 $\pm$ 3,06**	41,01
Extracto acuoso NP	2500	38,67 $\pm$ 13,50	16,53
Extracto acuoso NP	3750	16,33 $\pm$ 4,16**	35,25
Extracto acuoso NP	5000	19,75 $\pm$ 6,99**	57,37

$\bar{X}$ : media de las sacudidas de la pata posterior izquierda del ratón; EEM: error estándar de la media.  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

La Tabla 2 muestra los resultados de la primera fase del test de la formalina, que es la que se refiere al dolor neurogénico. Todas las dosis del extracto redujeron el número de sacudidas de la pata. Se observa, de forma general, un incremento de la analgésica conforme aumenta la dosis, aunque no de forma lineal, pues la inhibición con las dosis de 1250 y 5000 mg kg<sup>-1</sup> han sido las más representativas. De hecho, estas dosis igualan e incluso mejoran la analgesia observada con ibuprofeno (41,01 y 57,37 % vs 41,01 %), aunque no con el opiáceo usado como control positivo (76,80 %) y de referencia en esta fase del procedimiento.

La segunda fase del test de la formalina se muestra en la Tabla 3 y están relacionados con la actividad analgésica periférica. Se observa que todos los lotes de NP poseen actividad analgésica, y sigue el mismo patrón dosis dependiente salvo con la dosis de 1250 mg kg<sup>-1</sup>. Destaca, al igual con el test del ácido acético, la dosis más elevada, pues su inhibición del dolor (78,01 %) resultó ser próxima a la obtenida por el ibuprofeno (82,32 %).

Tabla 3. Resultados de la segunda fase del test de la formalina.

LOTE	DOSIS (mg kg <sup>-1</sup> p.o.)	$\bar{X} \pm$ EEM	INHIBICIÓN (%)
Control (-)	-	216,00 $\pm$ 21,21	-
Morfina	10 (i.p.)	12,75 $\pm$ 5,45**	94,10
Ibuprofeno	75	42,50 $\pm$ 10,61**	82,32
Extracto acuoso NP	1250	122,33 $\pm$ 4,04**	43,37
Extracto acuoso NP	2500	129,67 $\pm$ 43,73*	39,97
Extracto acuoso NP	3750	88,00 $\pm$ 7,81**	59,26
Extracto acuoso NP	5000	47,50 $\pm$ 9,19**	78,01

$\bar{X}$ : media del tiempo lamiendo o mordiendo la pata inyectada; EEM: error estándar de la media.  
\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

#### ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

Los resultados del test de Levy se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados del test de Levy.

LOTE	DOSIS (mg kg <sup>-1</sup> p.o.)	$\bar{X}_{4h} \pm$ EEM	INHIBICIÓN <sub>4h</sub> (%)
Control (-)	-	0,5267 $\pm$ 0,2654	-
Ibuprofeno	75	0,1900 $\pm$ 0,1577	63,92
Extracto acuoso NP	1250	0,1833 $\pm$ 0,1060	65,20
Extracto acuoso NP	2500	0,1625 $\pm$ 0,1323	69,15
Extracto acuoso NP	3750	0,1633 $\pm$ 0,1557	68,99
Extracto acuoso NP	5000	0,2767 $\pm$ 0,0907	47,47

$\bar{X}$ : media la diferencia de grosor de las patas 4 h después de la inyección; EEM: error estándar de la media.

Todos los extractos muestran actividad antiinflamatoria. De hecho, 4 horas después de la inyección, las dosis de 1250, 2500 y 3750 mg kg<sup>-1</sup> reducen la inflamación en mayor medida que el AINE de referencia (65,20; 69,15 y 68,99 % vs 63,92 %). Al contrario que en el test del ácido acético y el de la formalina, en este caso la dosis más elevada es la que presenta menor actividad antiinflamatoria.

## DISCUSIÓN.

La acción antipirética descrita para NP hace sospechar que pudiera poseer una acción analgésica y antiinflamatoria similar a los AINEs [1, 2]. La forma más común de consumo de las plantas medicinales es como infusión o “agüitas”, de ahí que se haya estudiado el extracto acuoso de esta especie vegetal en tres tests, ampliamente utilizados, para comprobar si una sustancia posee actividad analgésica y/o antiinflamatoria.

La actividad analgésica fue valorada mediante el test de torsión inducida por ácido acético y por el test de la formalina [12, 14]. La prueba de torsión inducida por ácido acético es utilizada para evaluar los efectos antinociceptivos periféricos de nuevos compuestos y se considera un modelo de dolor visceral. Esta prueba se basa en la estimulación de las neuronas nociceptivas mediante la liberación de mediadores como histamina, serotonina, citoquinas, eicosanoides y, especialmente, la prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> en el líquido peritoneal. La activación y sensibilización de los receptores nociceptivos quimiosensibles periféricos por este mediador conducen a constricciones de la pared abdominal y torsiones del tronco seguidas de la extensión de las extremidades posteriores, asociadas al desarrollo de inflamación periférica [8, 12]. El extracto acuoso de NP ha reducido de forma significativa, el dolor inducido por el ácido acético, en comparación con el grupo control, lo que indica que tiene un efecto analgésico sobre el dolor inflamatorio. Esta actividad observada puede estar relacionada con la reducción de la liberación de mediadores inflamatorios o con un bloqueo directo de los receptores[12].

La prueba de formalina se realizó para obtener otra evidencia más de la actividad nociceptiva de NP. Este test se utiliza para medir la capacidad de una sustancia para atenuar el dolor moderado generado por el tejido lesionado. El efecto analgésico en este estudio se midió utilizando indicadores de comportamiento (sacudidas y tiempo lamiendo la pata). Se considera que las fases temprana y tardía de la nocicepción producidas por la formalina representan el comportamiento neurogénico y el comportamiento inflamatorio del dolor, respectivamente [8, 9, 12]. La primera fase (dolor neurogénico) es aguda y representa la estimulación química directa de los nociceptores causada por un efecto directo de la formalina sobre las fibras C sensoriales, y se cree que incluye la sustancia P, el glutamato y la bradiquinina. La segunda fase (dolor inflamatorio) parece depender de la combinación de una sensibilización central y una reacción inflamatoria en el tejido periférico, que libera mediadores nociceptivos incluyendo histamina, serotonina, PGs y bradicinina [12]. Los fármacos de acción central, como la morfina, inhiben ambas fases del dolor, mientras que los fármacos de acción periférica, como los AINEs, inhiben principalmente la segunda fase. Los resultados observados en este test hacen concluir que la administración oral del extracto acuoso de NP reduce significativamente el número de sacudidas de la pata en función de la dosis, sobre todo en la segunda fase de la prueba de la formalina, lo que indica que se trata de una sustancia predominantemente de acción periférica.

Los resultados obtenidos sugieren, por tanto, que este extracto de NP puede actuar eminentemente a través del dolor inflamatorio, por lo que se estudió sus efectos en un modelo experimental estándar de inflamación aguda: el edema inducido por carragenina. La carragenina se ha utilizado ampliamente como cribado de compuestos con actividad antiinflamatoria [15]. Este agente, cuando se inyecta localmente en la pata del animal de experimentación, produce una reacción inflamatoria severa, que es perceptible en 30 minutos. Además, este test es conocido por ser un modelo de

inflamación aguda sensible a los inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), de ahí que se haya utilizado para evaluar el efecto de los AINEs, pues éstos inhiben principalmente la COX implicada en la síntesis de PGs [8, 12].

La inyección subcutánea de carragenina en la pata del ratón produce inflamación como resultado de la liberación de varios mediadores inflamatorios. La histamina, la serotonina y la bradicinina son los primeros mediadores detectables en la fase temprana de la inflamación inducida por carragenina; las PGs están implicadas en el aumento de la permeabilidad vascular y son detectables en la fase tardía de la inflamación. Además, la inflamación local y/o sistémica está asociada con las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 [8, 12]. La fase inicial del edema, que no es inhibida por AINEs, comienza inmediatamente después de la inyección de carragenina y disminuye en 2 h. Se ha atribuido a la liberación de histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT) y bradiquinina [12, 15]. La segunda fase de aceleración de la hinchazón comienza al final de la primera fase y se mantiene hasta 4 h. Se ha correlacionado con la elevada producción de PGs, proteasa y lisosoma. Esta fase puede ser bloqueada por los AINEs [12].

La actividad antiinflamatoria *in vivo* del extracto de NP contra el edema inducido por carragenina se confirma con una reducción del volumen de la pata de la misma manera que los AINEs.

Los datos actuales obtenidos demuestran, por tanto, el interesante efecto analgésico y el antiinflamatorio, del extracto acuoso de esta especie vegetal, pudiendo ser algunos de los compuestos responsables las cumarinas y las cromonas que forman parte de su composición fitoquímica.

## CONCLUSIONES.

1. Este trabajo de fin de grado pone en evidencia, por primera vez, que la ingesta oral por parte de animales de experimentación del extracto acuoso de NP produce, de manera segura, significantes efectos antinociceptivos en dos modelos experimentales de nocicepción.
2. Los resultados de la prueba de torsión inducida por ácido acético y la prueba de formalina indican que el extracto de NP actúa más a nivel periférico que central para lograr el alivio del dolor.
3. Asimismo, este extracto acuoso también ha producido un efecto antiinflamatorio.
4. Los datos obtenidos permiten afirmar que NP posee actividad analgésica y antiinflamatoria en animales de experimentación, lo que contribuye a la información etnomedicinal disponible sobre esta especie.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] CRUZ SUÁREZ, S.J. *Más de 100 plantas medicinales en medicina popular Canaria*. Primera edición: octubre 2007. Las Palmas de Gran Canaria: Obra Social de la Caja de Canarias, 2007, pág. 353-356.
- [2] PÉREZ DE PAZ, P.L., HERNÁNDEZ PADRÓN, C.E. *Plantas medicinales o útiles en la flora canaria*. Tenerife, La Laguna: Francisco Lemus, 1999, pág. 97-98, 205.
- [3] PÉREZ DE PAZ, J., FEBLES- HERNÁNDEZ, R., et al. Evolución y vías de acceso a la dioecia en la Flora Canaria: *Neochamaelea pulverulenta* (Cneoraceae) un ejemplo desde heterodicogamia y androdiaecia. *Vieraea*, 2013, vol. 41, pág. 269- 292.
- [4] BRAMWELL, D. *Medicinal plants of the Canary Islands*. Madrid: editorial Rueda, 2004, pág. 64-65.
- [5] Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.
- [6] ADEDAPO, A., ADEWUYI, T., et al. Actividades fitoquímicas, antiinflamatorias y analgésicas del extracto acuoso de la hoja de *Lagenaria breviflora* (Cucurbitaceae) en animales de laboratorio. *Revista de Biología Tropical*, 2013, vol. 61, nº 1, pág. 281-290.
- [7] BULUS, A., BARAU AMIZAN, M., et al. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of standardised rootbark extract of *Xeromphis nilotica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, vol. 158, pág. 271- 275.
- [8] T. BASTING, R., NISHIJIMA, C.M., et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, vol. 157, pág. 257- 267.
- [9] HUNSKAAR, S., FASMER, O.B., et al. Formalin test in mice: a useful technique for evaluating wild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods*, 1985, vol. 4, pág. 69-76
- [10] BENTLEY, G.A., NEWTON, S.H., et al. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve ending in the mouse peritoneum. *British Journal of Pharmacology*, 1981, vol. 73, pág. 325- 332.
- [11] YUEQIN, Z. *Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias*. Tesis doctoral, Universitat de València, 2006. ISBN: 9788437066769.
- [12] DÉVORA, Sandra. *Estudio químico y farmacológico de especies botánicas endémicas canaria*. Tesis doctoral, Universidad de La Laguna, 2011. ISBN: 978-84-15910-00-8.

- [13] ABDALA, S., DÉVORA, S., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of *Sambucus palmensis* link, an endemic Canary Island species. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, vol. 155, pág. 626- 632.
- [14] TJOLSE, A., BERGE, O.G., et al. The formalin test an evaluation of the method. *Pain*, 1992, vol. 51, pág. 5-17.
- [15] HENRIQUES, M.G., SILVA, P.M., et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, 1987, vol. 20, pág. 243-249.