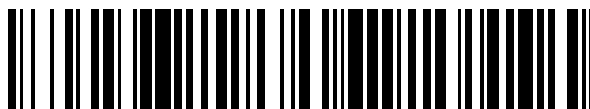


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 598**

51 Int. Cl.:

A61K 36/72	(2006.01) A61P 37/02	(2006.01)
A61K 9/52	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61K 9/48	(2006.01) A61P 31/18	(2006.01)
A61K 9/20	(2006.01) A61P 31/10	(2006.01)
A61K 9/14	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61K 9/12	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01) A61P 11/00	(2006.01)
A61K 9/06	(2006.01) A61P 9/14	(2006.01)
A61K 9/02	(2006.01)	
A61P 37/04	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.10.2014 PCT/CN2014/089895**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015 WO15062517**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2014 E 14858822 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3064212**

54 Título: **Extracto de Paliurus ramosissimus (Lour.) Poir y método de preparación y usos del mismo**

30 Prioridad:

31.10.2013 CN 201310528511
15.01.2014 CN 201410018576
15.01.2014 CN 201410019123
17.01.2014 CN 201410023850
23.01.2014 CN 201410030860
23.01.2014 CN 201410032900

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2020

73 Titular/es:

**SICHUAN ACADEMY OF CHINESE MEDICINE
SCIENCES (100.0%)
No.51 Section, 4 South Renmin Road, Wuhou
District
Chengdu, Sichuan 610041, CN**

72 Inventor/es:

**XU, CHAOQUN;
LI, DONGXIAO;
SHU, GUANGMING;
RUAN, JIA;
ZHAN, YAN y
TAN, LEI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 775 598 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir y método de preparación y usos del mismo

5 Campo técnico

La invención pertenece al campo de la medicina, en particular al extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y sus métodos de preparación y usos.

10 Antecedentes de la técnica

Paliurus ramosissimus (Lour.) Poir., un arbusto caducifolio, es una planta medicinal común. Se ha publicado que sus ramas, hojas, raíces y frutos pueden usarse como medicamento. Es amargo, simple y atóxico. Puede eliminar el resfriado y promover la circulación sanguínea, reducir la hinchazón, actuar como antipirético, tratar hematomas y lesiones y aliviar los dolores cardíacos y abdominales. Está incluido en el "Diccionario de Medicina Tradicional China" y en algunos registros locales de fármacos.

15

Durante el estudio, los inventores de la presente invención han identificado que *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y su extracto tiene buenas actividades antifibróticas, antifúngicas y antitumorales, trata la inflamación del tracto oral y digestivo o (y) enfermedades relacionadas con úlceras y tiene efectos inmunomoduladores bidireccionales.

20

Huang Weiming desvela en "Una composición medicinal china a base de hierbas para el tratamiento del cáncer gástrico", documento XP002767936, que se ha preparado una composición medicinal china a partir de *Herba Duchesneae Indicae*, DABAIGUO, *Paliurus ramosissimus*, raíz de *Helicteris* y semillas de ricino moliendo y mezclando con Mel para obtener una píldora.

25

Thomason Scientific, Londres, Reino Unido, desvela en la Base de datos WPI, Semana 200872, documento XP-002767937, una medicina a base de hierbas contra el cáncer que comprende paulownia, akebiaquinata, almizcle, *Artemisia argyi*, semilla curare de nuez vómica *Nux vomica*, sulfuro de arsénico, planta de la felicidad, papaya, *Angélica dahurica*, *Milletia pachycarpa* benth, huesos, mánido, *Oldenlandia diffusa*, ñame, *Paeonia lactiflora* pallas, exoesqueleto de muda cigarra, autocuración, ñame patata aérea, gramínea silvestre, corregüela gigante, *Artemisia scoparia*, *Aconitum chinense* Paxton, *Aconitum kusnezoffii*, *Eucommia*, *Croton*, raíz de *aconix brachypodi*, *Ophisaurus harti*, regaliz, dátiles rojos y cártamo.

30

Thomason Scientific, Londres, Reino Unido, desvela en la Base de datos WPI, Semana 200925, documento XP-002767938, un licor de hierbas medicinales chinas que comprende hojas de *Hibiscus mutabilis*, alcanfor, flor de *Hosta plantaginea*, nódulo de rizoma de loto, raíz de *paliurus* ramificado, semilla de plantago y alcohol isopropílico.

35

Kultur, Ş., 2007. *Medicinal plants used in Kirklareli province (Turkey)*. *Journal of Ethnopharmacology*, 111 (2), págs. 341-364, desvela 126 plantas medicinales tradicionales de la provincia de Kirklareli (Turquía).

40

Sargin, S.A., Akçicek, E. y Selvi, S., 2013. *An ethnobotanical study of medicinal plants used by the local people of Alasşehir (Manisa) in Turkey*. *Journal of ethnopharmacology*, 150(3), págs. 860-874, desvelan un total de 137 plantas medicinales pertenecientes a 58 familias en la región de Alasşehir (Manisa) en Turquía.

45

Schirarend, C. y Olabi, M.N., 1994. *Revision of the genus Paliurus Tourn. ex Mill.(Rhamnaceae)*. *Bot. Jahrb*, 116 (3), págs. 333-359, desvelan un bosquejo histórico y una descripción morfológica general de cinco especies del género euroasiático *Paliurus* reconocidas.

50 Sumario de la invención

Las realizaciones de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones independientes 1 y 3.

Las realizaciones preferidas de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones dependientes 2 y 4 a 12.

55 El primer problema técnico resuelto con la invención es proporcionar nuevos usos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Cuando se aplica *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., se usa la planta entera o cualquier parte; en donde, la parte medicinal puede ser cualquier parte o la mezcla de raíces, tallos, hojas, flores y frutos.

60

Específicamente, los nuevos usos medicinales de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. son sus usos en la preparación de fármacos con actividades antifibróticas, antifúngicas y antitumorales, para el tratamiento de la inflamación del tracto oral y digestivo o (y) enfermedades relacionadas con úlceras o con efectos inmunomoduladores bidireccionales.

65

El segundo problema técnico resuelto con la invención es proporcionar un nuevo extracto de *Paliurus ramosissimus*

(Lour.) Poir. Dada la facilidad de recolección y la conveniencia del almacenamiento de materiales medicinales, con el fin de facilitar la aplicación clínica, puede aplicarse *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. después de prepararse como extracto.

- 5 Específicamente, el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la presente invención se prepara a partir de la planta entera o de cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materias primas farmacéuticas, con métodos de extracción convencionales. Los ingredientes principales del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. obtenido en la presente invención incluye flavonoides, triterpenoides, alcaloides, cumarinas; incluyen además glucósidos e ingredientes monoméricos de los flavonoides descritos anteriormente, triterpenoides, alcaloides y
- 10 cumarinas; incluyen adicionalmente polisacáridos y celulosas.

El tercer problema técnico resuelto con la invención es proporcionar métodos para preparar extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la siguiente manera:

15 Método I:

A, con todo o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima para la extracción; y,

B, extraer las materias primas con disolvente y secar el material extraído;

- 20 En el esquema técnico anterior, las materias primas farmacéuticas mencionadas en la Etapa A de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. son sus productos frescos, productos liofilizados y productos de pretratamiento con disolventes orgánicos.

- 25 En el esquema técnico anterior, el disolvente mencionado en la Etapa B es metanol, etanol, isopropanol, acetato de etilo o éter de petróleo; preferentemente, metanol o etanol.

En el esquema técnico anterior, la extracción mencionada en la Etapa B es extracción por remojo, reflujo o percolación.

- 30 En el esquema técnico anterior, el secado mencionado en la Etapa B es secado a presión reducida, liofilización, secado por pulverización o secado por microondas.

Método II:

- 35 A, con todo o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima para la extracción;

B, extraer las materias primas con el disolvente "a" y concentrar la solución extraída para obtener el concentrado, y;

- 40 C, extraer el concentrado obtenido en la etapa B con el disolvente "b" y secar;

O, secar el concentrado obtenido en la Etapa B antes de extraerlo con el disolvente b y secar.

- 45 En el esquema técnico anterior, las materias primas farmacéuticas mencionadas en la Etapa A de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. son su forma fresca o liofilizada, o su forma pretratada con disolvente orgánico.

En el esquema técnico anterior, el disolvente a mencionado en la Etapa B es metanol, etanol, isopropanol; preferentemente, metanol o etanol.

- 50 En el esquema técnico anterior, el disolvente b mencionado en la Etapa C es acetato de etilo o éter de petróleo.

En el esquema técnico anterior, la extracción mencionada en la Etapa B y la Etapa C es el método de remojo, el método de reflujo, el método de percolación o el método de extracción.

- 55 En el esquema técnico anterior, el secado mencionado en la Etapa B y la Etapa C es secado a presión reducida, liofilización, secado por pulverización o secado por microondas.

- Para el extracto preparado con los métodos descritos anteriormente, si se prepara con el Método I, se nombra como el extracto correspondiente al disolvente utilizado en la Etapa B, tal como extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extracto isopropanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; si se prepara con el Método II, se nombra como el extracto correspondiente al disolvente b utilizado en la Etapa C, tal como extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., mientras que el extracto 1 obtenido en la Etapa C del Método II se nombra como el extracto correspondiente al disolvente utilizado en la Etapa B del Método II, tal como extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extracto metanólico de *Paliurus*
- 60
- 65

ramosissimus (Lour.) Poir. y extracto isopropanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

En el esquema técnico anterior, la relación de cantidad entre el disolvente utilizado en la Etapa B del Método I es que, la cantidad del disolvente es 1-20 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; preferentemente, la cantidad del disolvente es 5-15 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; adicionalmente, la cantidad del disolvente es 8-10 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

En el esquema técnico anterior, la relación de cantidad entre el disolvente a utilizado en la Etapa B del Método II es que, la cantidad del disolvente a es 1-20 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; preferentemente, la cantidad del disolvente a es 5-15 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; adicionalmente, la cantidad del disolvente a es 8-10 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Preferentemente, cuando el disolvente o disolvente a es metanol o etanol, la cantidad de metanol o etanol es 1-20 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; Preferentemente, la cantidad de metanol o etanol es 5-15 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; Adicionalmente, la cantidad de metanol o etanol es preferentemente 8-10 veces el peso de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

En donde, la concentración del etanol mencionado es del 10-95 %. Preferentemente, la concentración de etanol es del 50-95 %. Mucho más preferentemente, la concentración de etanol es del 95 %.

En el esquema técnico anterior, la materia prima *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. antes del tratamiento con disolventes orgánicos debe ser productos frescos o producto liofilizados. La razón es que, los inventores han descubierto que el producto secado al sol y al aire o el producto secado al horno no tienen las actividades correspondientes, por lo que se usa el producto fresco de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima. Sin embargo, el producto fresco no es bueno para el almacenamiento y el transporte, por lo que los inventores han identificado que *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. liofilizado y pretratado con disolvente orgánico conserva los principios activos, que tienen efectos equivalentes a los del producto fresco, cumple con los nuevos usos del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en la presente invención y es bueno para el almacenamiento y el transporte.

Específicamente, el método de tratamiento con disolvente orgánico es como se indica a continuación: tomar *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., remojar en un disolvente orgánico y secar.

En donde, el disolvente orgánico mencionado es etanol, metanol, acetato de etilo, éter de petróleo, isopropanol y similares; preferentemente metanol o etanol.

El extracto de la presente invención puede administrarse por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica) o parenteral (incluyendo inyección o infusión subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intravenosa o intradérmica). Estas preparaciones pueden prepararse con cualquier método conocido en tecnología farmacéutica, por ejemplo, pueden prepararse combinando el principio activo con el vehículo o excipiente.

El cuarto problema técnico resuelto con la invención es proporcionar preparaciones farmacéuticas preparadas a partir del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en la presente invención, es decir, una diversidad de preparaciones de diferentes vías de administración mediante la adición de un excipiente farmacéuticamente aceptable al extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en la presente invención. Por su facilidad de aplicación, el extracto de la presente invención puede prepararse para preparaciones orales convencionales, preparaciones inyectables y preparaciones tópicas mediante métodos convencionales. Estas preparaciones pueden prepararse con cualquier método conocido en tecnología farmacéutica, por ejemplo, pueden prepararse combinando el principio activo con el vehículo o excipiente. Por ejemplo, preparaciones administradas por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica) o parenteral (incluyendo inyección o infusión subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional, intravenosa o intradérmica). Tales como comprimidos, cápsulas, gránulos, microgránulos, microesferas, píldoras, preparaciones de liberación controlada, preparaciones de liberación sostenida o inyecciones.

Las preparaciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración oral pueden presentarse en forma de unidades individuales tales como cápsulas, comprimidos, polvos o gránulos; soluciones líquidas acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones líquidas de aceite en agua o emulsiones de agua en aceite. Puede prepararse en forma de líquidos orales en forma farmacéutica unitaria, tales como soluciones, jarabes y elixires. Los jarabes pueden prepararse disolviendo el compuesto en soluciones acuosas aromatizadas adecuadamente y los elixires se preparan con vehículos no tóxicos. También pueden añadirse agentes solubilizantes y emulsionantes (tales como alcohol isoestearílico etoxilado y éter de sorbitol polioxietilenado), conservantes, aditivos aromatizantes (tales como aceite de menta o edulcorantes naturales, o sacarina u otros edulcorantes artificiales), etc. Cuando sea adecuado, las preparaciones en forma farmacéutica que son adecuadas para la administración oral pueden microencapsularse y también pueden prepararse recubriendo o incrustando partículas de material en polímeros, cera o similares para la liberación prolongada o sostenida. También pueden administrarse en forma de sistema de entrega liposomal (tal como vesículas unilamelares pequeñas, vesículas unilamelares grandes y liposomas multilamelares); los liposomas pueden

formarse a partir de una diversidad de fosfolípidos, tales como colesterol, estearilamina o fosfatidilcolinas.

Las preparaciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración transdérmica pueden estar en forma de parches individuales destinados a permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un período de tiempo más largo. Las preparaciones farmacéuticas que son adecuadas para la administración tópica pueden formularse en forma de pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles, linimentos o aceites.

El quinto problema técnico resuelto con la invención es proporcionar los nuevos usos medicinales de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en la presente invención.

El extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., incluyendo el extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., el extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., el extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., el extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., tiene buenas actividades antifibróticas, antifúngicas y antitumorales, trata la inflamación del tracto oral y digestivo o (y) enfermedades relacionadas con úlceras y tiene efectos inmunomoduladores bidireccionales. Incluye los nuevos usos farmacéuticos anteriores del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. solo o combinación de fármacos con el principio activo principal del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

En donde:

Cuando se aplica el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la presente invención para preparar fármacos antitumorales, puede añadirse una combinación de otros medicamentos tradicionales chinos y medicamentos occidentales con efectos terapéuticos antitumorales, incluyendo radioterapia, inmunoterapia, agentes quimioterápicos que dañan el ADN, agentes quimioterápicos que interfieren con la replicación celular, fármacos inmunomoduladores, específicamente inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, agentes alquilantes, agentes quiméricos de ADN, agentes intercalantes de ADN y agentes generadores de radicales, agentes quimioterápicos que interfieren con la replicación celular, inhibidores de proteína tirosina cinasas, inhibidores de proteasas, anticuerpos, proteínas o inhibidores enzimáticos que se unen a proteínas sobreexpresadas en el tumor y que regulan negativamente la replicación celular. Pueden seleccionarse otros medicamentos tradicionales chinos y medicamentos occidentales entre: irinotecán, topotecán, camptotecina y análogos o metabolitos, doxorrubicina, etopósido, tenipósido, daunorrubicina, melfalán, clorambucilo, busulfán, tespamina, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozotocina, dacarbazina, metotrexato, mitomicina C, ciclofosfamida, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, bleomicina, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina, hidroxiurea, paclitaxel, docetaxel y análogos relacionados, vincristina, vinblastina y análogos relacionados, talidomida y análogos relacionados, mesilato de imatinib, gefitinib, bortezomib, trastuzumab, rituximab, cetuximab, bevacizumab, cinobufotalina, *Agaricus blazei*, extracto en acetato de etilo de corteza de árbol *Sorbaria sorbifolia*, extracto acuoso de Lichi, tripterina, polisacárido de *Grifolia*, carboximetil polisacárido de esclerocio de *Poria cocos*, concentrados de extracto de alisol, polisacárido de regaliz, polisacáridos totales de angélica, psoraleno y polisacárido de chinensis.

Cuando se aplica el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la presente invención para preparar fármacos antifibróticos, puede añadirse una combinación de otros medicamentos tradicionales chinos y medicamentos occidentales con efectos terapéuticos contra la fibrosis. Se seleccionan otros medicamentos chinos y medicamentos occidentales con efectos terapéuticos contra la fibrosis entre: saponinas de *Panax notoginseng*, ligustrazina, *Salvia miltiorrhiza*, inyección de *Acanthopanax*, inyección de ligustrazina, inyección de cártamo, glucósidos de flavonol de *Ginkgo*, Shengmai, inyección de *Salvia miltiorrhiza*, Shuanghuanglian, inyección de Xiangdan, gránulos de Yiqihuoxue, gránulos de Kangxian, gránulos de Feikang, píldoras antiflogísticas de compuestos de lirio, *Cordyceps* en polvo, píldoras de geco y ginseng, astrágalo, azafrán, raíz de *Rehmanniae*, *Panax notoginseng*, *Gynostemma pentaphylla*, *Curcuma longa*, abelmosco, amigdalina, tetrandrina, emodina, entecavir, lamivudina, β -caroteno, vitamina E, fosfatidilcolina, S-adenosilmetionina, alprostadilo, dinoprostona, colchicina alcalina, estrógeno, bloqueantes de los receptores de la angiotensina II, inhibidores del sistema nervioso simpático, interferones, inhibidores de la prolil-4-hidroxilasa, heparina, silimarina y ácido ursodesoxicólico. Dicha fibrosis incluye fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática y fibrosis miocárdica.

Cuando se aplica el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la presente invención para preparar fármacos con efectos inmunomoduladores bidireccionales, se hace referencia específicamente a la aplicación para preparar fármacos para la función inmunitaria comprometida o (y) enfermedades autoinmunitarias, especialmente la función inmunitaria comprometida o (y) enfermedades autoinmunitarias provocadas por disfunción inmunitaria. En donde dicha función inmunitaria comprometida provocada por disfunción inmunitaria incluye susceptibilidad a resfriados, debilidad, cáncer y SIDA, y dichas enfermedades autoinmunitarias provocadas por disfunción inmunitaria incluyen artritis reumatoide, lupus, esclerodermia, hipertiroidismo, diabetes juvenil, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, colitis ulcerosa y enfermedad hepática crónica.

En el esquema técnico anterior, cuando se aplica el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. para preparar fármacos antitumorales, puede usarse la planta entera o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima farmacéutica, preferentemente la hoja como materia prima farmacéutica.

Cuando se usa la planta entera, incluyendo la raíz, el tallo y la hoja enteros, o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima farmacéutica, puede prepararse extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. usando el siguiente método: tomar el producto fresco o liofilizado de la planta entera incluyendo la raíz, el tallo y la hoja enteros, o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pretratar el producto fresco o liofilizado de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. con un disolvente orgánico para su uso futuro; cuando se prepara, extraer el producto fresco o liofilizado de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. pretratado anteriormente con un disolvente orgánico. O extraer directamente el producto fresco o liofilizado de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. con un disolvente orgánico para obtener extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Los métodos de extracción con disolventes orgánicos incluyen, pero sin limitación, métodos de extracción convencionales en el campo, tales como el método de remojo, el método de reflujo y el método de percolación.

Dicho *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. antes del tratamiento con disolvente orgánico es preferentemente un producto fresco o liofilizado.

Dicho disolvente orgánico se selecciona entre metanol, etanol, isopropanol, acetato de etilo y éter de petróleo, preferentemente etanol al 50-95 %, más preferentemente etanol al 95 %.

Se prepara preferentemente extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. usando el siguiente método: tomar la planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. fresco, añadir etanol al 95 % a 8-10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar el *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 6-10 veces el peso, remojar durante 2-3 días, recoger el extracto líquido, recuperar el disolvente a presión reducida para obtener extracto líquido concentrado y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. En donde, los métodos de secado incluyen, pero sin limitación, secado a presión reducida, liofilización, secado por pulverización y secado por microondas.

Más preferentemente, tomar tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. fresco, añadir etanol al 95 % a 8 veces el peso, remojar durante un día, después triturar el *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, someter a reflujo para extraer, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 60 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol para obtener extracto líquido concentrado y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Más preferentemente, tomar tallos y hojas frescas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol a 8 veces el peso, remojar durante un día, después triturar el *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol a 10 veces el peso, someter a reflujo para extraer, recoger el extracto líquido, recuperar el metanol a 60 °C a presión reducida para obtener extracto líquido concentrado y secar para obtener extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Adicionalmente, dispersar extracto etanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extracto en éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, y concentrar y secar para obtener extracto en éter de petróleo o extracto en acetato de etilo.

Adicionalmente, las etapas específicas de dicha extracción alcohólica son las siguientes:

(1) Tomar las hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 50 %-95 % a 5-15 veces el peso y remojar;

(2) triturar las hojas, añadir etanol al 50 %-95 % a 5-15 veces el peso para extraer ingredientes solubles en alcohol;

(3) recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 30-70 °C a presión reducida hasta que no haya olor a alcohol para obtener el extracto;

(4) liofilizar el extracto líquido concentrado para obtener extracto alcohólico de hoja de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Adicionalmente, extraer dicho extracto de medicina tradicional china con éter de petróleo o acetato de etilo. Extraer dicho extracto de medicina tradicional china con éter de petróleo, acetato de etilo y n-butanol en secuencia, recuperar los disolventes y liofilizar para obtener extractos en tres partes polares, disolver en isopropanol y someter a ensayo su efecto inhibitorio sobre células tumorales. Los resultados son que los extractos de medicina tradicional china en la parte de éter de petróleo y la parte de acetato de etilo tienen buena actividad antitumoral, mientras que el extracto en la parte de n-butanol no tiene actividad antitumoral, y el extracto en la parte de acetato de etilo tiene una actividad antitumoral mejor.

Adicionalmente, los ingredientes principales del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. incluyen triterpenoides, flavonoides, alcaloides y cumarinas.

En el esquema técnico anterior, cuando se aplica el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la presente

invención para preparar fármacos antifibróticos, puede usarse la planta entera o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima farmacéutica, preferentemente la hoja como materia prima farmacéutica.

5 Cuando se usa la planta entera, incluyendo la raíz, el tallo y la hoja enteros, o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima farmacéutica, puede prepararse extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. usando el siguiente método: tomar el producto fresco o liofilizado de la planta entera incluyendo la raíz, el tallo y la hoja enteros, o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pretratar el producto fresco o liofilizado de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. con un disolvente orgánico para su uso futuro; cuando se prepara, extraer el
10 producto fresco o liofilizado de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. pretratado anteriormente con un disolvente orgánico. O extraer directamente el producto fresco o liofilizado de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. con un disolvente orgánico para obtener extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Los métodos de extracción con disolventes orgánicos incluyen, pero sin limitación, métodos de extracción convencionales en el campo, tales como el método de remojo, el método de reflujo y el método de percolación.

15 Dicho *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. antes del tratamiento con disolvente orgánico es preferentemente un producto fresco o liofilizado.

20 Dicho disolvente orgánico se selecciona entre metanol y etanol al 10-100 %, preferentemente etanol al 95 %.

Se prepara preferentemente extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. usando el siguiente método: tomar la planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. fresco, añadir etanol al 95 % a 8-10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar el *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 6-10 veces el peso, remojar durante 2-3 días, recoger el extracto líquido, recuperar el disolvente a presión reducida para obtener extracto líquido
25 concentrado y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. En donde, los métodos de secado incluyen, pero sin limitación, secado a presión reducida, liofilización, secado por pulverización y secado por microondas.

30 Más preferentemente, tomar tallos y hojas frescas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 8 veces el peso, remojar durante un día, después triturar el *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, someter a reflujo para extraer, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 60 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol para obtener extracto líquido concentrado y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

35 Más preferentemente, tomar tallos y hojas frescas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol a 8 veces el peso, remojar durante un día, después triturar el *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol a 10 veces el peso, someter a reflujo para extraer, recoger el extracto líquido, recuperar el metanol a 60 °C a presión reducida para obtener extracto líquido concentrado y secar para obtener extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

40 Adicionalmente, dispersar extracto etanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extracto en éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, y concentrar y secar para obtener extracto en éter de petróleo o extracto en acetato de etilo.

45 En el esquema técnico anterior, cuando se aplica el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. para preparar fármacos antifúngicos, puede usarse la planta entera o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima farmacéutica, preferentemente la hoja como materia prima farmacéutica.

Se prepara extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. usando el siguiente método: tomar la planta entera o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol o etanol a 1-20 veces su volumen o extraer
50 adicionalmente extracto metanólico o etanólico con acetato de etilo o éter de petróleo; concentrar el extracto líquido y secar para obtener extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Dicho *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. es preferentemente un producto fresco, un producto liofilizado, o metanol, o producto tratado con etanol; dichos métodos de extracción incluyen remojo, reflujo y percolación; dichos métodos de
55 secado incluyen secado a presión reducida, liofilización, secado por pulverización y secado por microondas.

Dicho extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. incluye triterpenoides, flavonoides, alcaloides, cumarinas y glucósidos, y monómeros de los triterpenoides, flavonoides, alcaloides, cumarinas.

60 Dichas diversas preparaciones de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. incluyen comprimidos, gránulos, pomadas, geles, plásticos, linimentos, lociones y pulverizaciones de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

La invención proporciona extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y preparaciones con actividad antifúngica en la aplicación de actividad antifúngica. Dicho extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. incluye extracto en metanol, etanol, acetato de etilo, éter de petróleo o disolventes similares de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Se
65 usa producto fresco, producto liofilizado, producto pretratado con metanol (etanol) u otro disolvente orgánico de

Paliurus ramosissimus (Lour.) Poir. como materia prima para garantizar la estabilidad de los principios activos.

En el esquema técnico anterior, cuando se aplica el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. para preparar fármacos para la función inmunitaria comprometida o (y) enfermedades autoinmunitarias, puede usarse la planta entera o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima farmacéutica, preferentemente la hoja como materia prima farmacéutica.

Se prepara extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. usando el siguiente método: tomar la planta entera o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol o etanol a 1-20 veces su volumen o extraer adicionalmente extracto metanólico o etanólico con acetato de etilo o éter de petróleo; concentrar el extracto líquido y secar para obtener extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Dicho extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. es preferentemente un producto fresco, un producto liofilizado o producto pretratado con metanol, etanol o isopropanol; los métodos de extracción incluyen remojo, reflujo y percolación; los métodos de secado incluyen secado a presión reducida, liofilización, secado por pulverización y secado por microondas.

Dichos ingredientes del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. incluyen triterpenoides, flavonoides, alcaloides, cumarinas, polisacáridos, celulosas y glucósidos y monómeros de triterpenoides, flavonoides, alcaloides y cumarinas.

Dichas preparaciones de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. incluyen comprimidos, cápsulas, pastas, gránulos, inyecciones, supositorios, pomadas, geles, plásticos, linimentos, lociones y pulverizaciones de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Dicho extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., se usa en la preparación de fármacos para enfermedades relacionadas con la función inmunitaria comprometida o (y) enfermedades autoinmunitarias, incluyendo el uso de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. solo o compuestos medicinales con extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como principio activo principal en la aplicación de la preparación de fármacos para enfermedades relacionadas con la función inmunitaria comprometida o (y) enfermedades autoinmunitarias.

En el esquema técnico anterior, cuando se aplica extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. para preparar fármacos para el tratamiento de la inflamación del tracto oral y digestivo o (y) úlcera, puede usarse la planta entera o cualquier parte de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima farmacéutica, preferentemente la hoja como materia prima farmacéutica.

Se prepara extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. usando el siguiente método: tomar producto fresco de hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. o planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol o etanol a 1-20 veces su volumen para extraer; o extraer adicionalmente extracto metanólico o etanólico con acetato de etilo o éter de petróleo; concentrar el extracto líquido y secar para obtener extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; los ingredientes incluyen triterpenoides, flavonoides, alcaloides, cumarinas, polisacáridos, celulosas y glucósidos y monómeros de triterpenoides, flavonoides, alcaloides y cumarinas.

Dicho extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extraer producto fresco o producto liofilizado de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. directamente con disolventes orgánicos, o extraer después de pretratar producto fresco *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. con disolventes orgánicos; los disolventes orgánicos incluyen metanol, etanol, isopropanol, acetato de etilo, éter de petróleo; dichos métodos de extracción incluyen remojo, reflujo o percolación; dichos métodos de secado incluyen secado a presión reducida, liofilización, secado por pulverización o secado por microondas.

Dichas preparaciones de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. incluyen comprimidos, cápsulas, pastas, gránulos, inyecciones, supositorios, pomadas, geles, plásticos, linimentos, lociones y pulverizaciones.

La aplicación de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. incluye usar extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. solo o compuestos medicinales con extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. como principio activo principal en la aplicación de la preparación de fármacos para el tratamiento de la inflamación del tracto oral y digestivo o (y) úlcera.

Descripción detallada

La siguiente descripción detallada, en la forma de realización, describe adicionalmente el contenido mencionado anteriormente en la presente invención en detalles, e ilustra pero no limita la invención.

El estudio sobre los ingredientes del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. es como se indica a continuación.

Preparación de la solución de ensayo de muestra: tomar 1 g de la muestra de extracto, disolver en 25 ml de etanol

anhidro y centrifugar. Tomar 2 ml del sobrenadante, diluir 5 veces con etanol a una concentración final de 0,008 g/ml.

(1) Identificación de triterpenoides

5 A. Reacción L-B

Disolver la muestra en anhídrido acético, añadir unas gotas de ácido sulfúrico concentrado - anhídrido acético (1:20), aparecen cambios de color amarillo → rojo → púrpura → azul, y el color por último se desvanece, lo que indica la presencia de triterpenoides.

10

B. Reacción de Kahlenberg

Aplicar como una mancha la muestra en solución de cloroformo o alcohol sobre papel de filtro, pulverizar pentacloruro de antimonio al 20 % en solución de cloroformo (o tricloruro de antimonio saturado en solución de cloroformo), calentar a 60-70 °C después del secado, aparece color azul, lo que indica la presencia de triterpenoides.

15

C. Reacción H-R

Aplicar como una mancha solución de ensayo de muestra sobre papel de filtro, pulverizar ácido tricloroacético al 25 % en solución etanólica, calentar a 100 °C, aparece color rojo y gradualmente se vuelve de color púrpura, lo que indica la presencia de triterpenoides.

20

D. Reacción de Salkowski

Disolver la muestra en cloroformo, añadir ácido sulfúrico concentrado, la capa de ácido sulfúrico aparece de color rojo o azul y en la capa de cloroformo aparece fluorescencia de color verde, indicando triterpenoides.

25

E. Reacción de Tschugaeff

Disolver la muestra en ácido acético glacial, añadir unas gotas de cloruro de acetilo y unos granos de cristal de cloruro de cinc, calentar ligeramente, aparece color rosa pálido o púrpura, lo que indica la presencia de triterpenoides.

30

(2) Identificación de flavonoides

35 A. Reacción de reducción de ácido clorhídrico - magnesio (reacción de reducción cromógena)

Disolver una pequeña cantidad de muestra en 1 ml de etanol y añadir un poco de polvo de magnesio y ácido clorhídrico concentrado, agitar durante un momento y aparece color púrpura, lo que indica la presencia de flavonoides.

40 B. Reacción de tricloruro de aluminio (formación de complejos de iones metálicos cromógenos)

Aplicar la solución de ensayo de muestra sobre papel de filtro con una varilla de vidrio, soplar hasta sequedad, pulverizar cloruro de aluminio al 1 % en solución etanólica, soplar hasta sequedad, colocar debajo de una lámpara UV y aparece color amarillo brillante, lo que indica la presencia de flavonoides.

45

C. Reacción de cloruro férrico (formación de complejos de iones metálicos cromógenos)

Aplicar la solución de ensayo de muestra sobre papel de filtro con una varilla de vidrio, soplar hasta sequedad, observar la fluorescencia con luz ultravioleta, pulverizar cloruro férrico al 3 % en solución etanólica, soplar hasta sequedad, aparece una mancha fluorescente de color azul de color oscuro y se convierte en una mancha fluorescente de color marrón después de ahumarse en amoníaco, lo que indica la presencia de flavonoides.

50

D. Reacción cromógena con reactivo alcalino

Aplicar la solución de ensayo de muestra sobre papel de filtro con una varilla de vidrio, secar, pulverizar solución de hidróxido de sodio o exponer a vapores de amoníaco, observar bajo la luz del sol y el vapor de amoníaco vuelve la mancha de la muestra de color amarillo brillante, lo que indica la presencia de flavonoides.

55

(3) Identificación de alcaloides

60

A. Método modificado de yoduro de potasio y bismuto (Dragendorff)

①Disolver 0,85 g de nitrato de bismuto en 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua; ②Disolver 8 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua. Mezclar la misma cantidad de soluciones de ensayo ① ②, colocar en una botella de color marrón como solución madre. Antes de su uso, mezclar 1 ml de la solución madre, 4 ml de ácido acético glacial y 12 ml de agua. Añadir la solución de ensayo de muestra en el reactivo anterior, la solución se vuelve de color marrón

65

rojizo y, después de añadir agua destilada y agitar, se forma un precipitado, lo que indica la presencia de alcaloides.

B. Método de yodo - yoduro de potasio (Wagner)

- 5 Disolver 1 g de yodo y 10 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua, añadir 2 ml de ácido acético y añadir agua hasta 100 ml. Tomar la cantidad adecuada del reactivo anterior, añadir 1 ml de la solución de ensayo de muestra y la solución se vuelve de color marrón, lo que indica la presencia de alcaloides.

C. Método del ácido silicowolfrámico (Bertrand)

- 10 Disolver 5 g de ácido silicowolfrámico en 100 ml de agua, añadir una pequeña cantidad de ácido clorhídrico concentrado para ajustar el pH a aproximadamente 2. Tomar la cantidad adecuada del reactivo anterior, añadir 1 ml de la solución de ensayo de muestra y la solución se vuelve de color marrón, lo que indica la presencia de alcaloides.

15 (4) Identificación de cumarinas

A. Reacción de hidroxamato de hierro

- 20 ①a. Disolver 20 g de clorhidrato de hidroxilamina en 50 ml de agua, diluir hasta 200 ml con etanol, almacenar en un lugar fresco; b. disolver 50 g de hidróxido de potasio en un poco de agua, añadir 500 ml de etanol. ②Disolver 10 g de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en 20 ml de solución de ácido clorhídrico al 36 %, añadir 200 ml de etil éter, agitar bien y almacenar en un recipiente sellado. Cuando se use, mezclar una porción de ①a. y 2 porciones de ①b., filtrar el precipitado y almacenar el filtrado en un frigorífico. Aplicar la solución de ensayo de muestra sobre papel de filtro con una varilla de vidrio, pulverizar a. b. mezclar solución de ensayo, secar ligeramente, después pulverizar la solución de ensayo ② y aparece color rojo, lo que indica la presencia de cumarinas.

B. Reacción de diazotación

- 30 ①Disolver 0,35 g de paranitroanilina en 5 ml de ácido clorhídrico concentrado, añadir agua hasta 50 ml; ②añadir 50 ml de agua a 5 g de nitrito de sodio. Tomar la misma cantidad de soluciones ①, ② y mezclar en un baño de agua con hielo para su uso futuro. Tomar una pequeña cantidad de la muestra, añadir reactivo de diazonio gota a gota y aparece color rojo anaranjado, lo que indica la presencia de cumarinas.

- 35 Estos estudios han identificado que los ingredientes principales del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en la presente invención incluyen flavonoides, triterpenoides, alcaloides, cumarinas y glucósidos, y monómeros de los flavonoides, triterpenoides, alcaloides, cumarinas anteriores, así como polisacáridos y celulosas.

I. La actividad antitumoral de extracto de hoja de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

40 1. Extracción de hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

- 45 (1) Tomar 1 kg de hojas frescas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir 8-10 veces de etanol al 95 % durante 1-2 días (propósito: 1. desactivar la actividad de las enzimas en las hojas frescas, evitando de este modo la destrucción de los principios activos; 2. aumentar la dureza de las hojas frescas, facilitando de este modo el siguiente proceso de trituración), triturar las hojas frescas, después añadir 10 veces de etanol al 95 % (extracción de etanol al 60-100 %), remojar durante tres días para extraer los ingredientes solubles en alcohol. Recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 30-40 °C a presión reducida hasta que no haya olor a alcohol y liofilizar adicionalmente el extracto líquido concentrado para obtener extracto etanólico de hoja fresca de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

- 50 (2) Secar el residuo de extracción, añadir de 8 a 10 veces de agua, remojar durante tres días para extraer los ingredientes hidrosolubles, recoger el extracto líquido y liofilizar para obtener extracto acuoso de hoja fresca de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

- 55 (3) Extraer productos secos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (secado natural a temperatura ambiente) como en el método descrito anteriormente para obtener extracto alcohólico y extracto acuoso de producto seco de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

- 60 (4) Remojar hojas frescas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en etanol, secar en un lugar oscuro para obtener hojas secas y extraer las hojas secas obtenidas después de remojar en etanol y secar como en el método descrito anteriormente para obtener extracto alcohólico y extracto acuoso.

2. Actividad antitumoral

- 65 El estudio compara la actividad antitumoral de extracto de hoja de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Tomar una diversidad de células tumorales en fase de crecimiento logarítmico (las estirpes celulares tumorales utilizadas son las

siguientes: estirpe celular de carcinoma de útero Hela; estirpe celular de hepatoma humano SMMC-7721; estirpe celular de carcinoma de pulmón humano A549; estirpe celular de carcinoma de colon humano Caco-2; estirpe celular de leucemia K562; estirpe celular de carcinoma gástrico MGC-803;), centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, ajustar la concentración de células del precipitado de la suspensión celular a 1×10^5 células/ml con el medio de cultivo correspondiente que contiene suero fetal bovino al 10 % y células de semillas en placas de cultivo de 96 pocillos. A cada pocillo, añadir 200 µl de suspensión celular, añadir respectivamente solución de extracto estéril de determinada concentración para hacer que la concentración final de extracto en cada pocillo sea 0,02, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,8, 1,0, 2,0 mg/ml, mezclar bien, colocar en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h, precipitar el cultivo, lavar dos veces con PBS, a cada pocillo, añadir 20 µl de tampón de fosfato MTT 5 mg/ml y 150 µl de medio de cultivo, cultivar en las mismas condiciones durante 4 h y después terminar el cultivo. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, después desechar el medio de cultivo en los pocillos, a cada pocillo, añadir 150 µl de DMSO, agitar durante 10 min de manera que las partículas de formazán formadas se disuelvan totalmente y determinar la absorbancia con el lector de microplacas. Seleccionar 570 nm como la longitud de onda de medición. Calcular la CI50 del extracto con respecto a las células tumorales. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Efectos de inhibición de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre diferentes células tumorales:

Estirpe celular	Hela	SMMC-7721	A549	Caco-2	MGC-803
Extracto alcohólico de hojas frescas de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.	0,0473 mg/ml	0,1957 mg/ml	0,0126 mg/ml	0,1174 mg/ml	0,2367 mg/ml
Extracto acuoso de hojas frescas de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.	-	-	-	-	-
Extracto alcohólico de hojas secas de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.	-	-	-	-	-
Extracto acuoso de hojas secas de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.	-	-	-	-	-
Extracto alcohólico de hoja de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir. remojada en etanol y secada al aire	0,0442 mg/ml	0,2038 mg/ml	0,0175 mg/ml	0,1060 mg/ml	0,2512 mg/ml
Extracto acuoso de hoja de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir. remojada en etanol y secada al aire	-	-	-	-	-

Los resultados han demostrado que el extracto alcohólico de hojas frescas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y el extracto alcohólico de hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. empapadas en etanol y secadas al aire tienen una buena actividad antitumoral, mientras que otros extractos no tienen actividad antitumoral. Las razones pueden estar relacionadas con la solubilidad y la estabilidad del extracto activo.

3. Determinación del contenido de ingredientes en extracto alcohólico de hoja de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

(1) Determinación del contenido de triterpenoides

Tomar tres porciones de aproximadamente 0,1 g del polvo grueso de este producto, colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto alcohólico contiene $0,052 \pm 0,010$ g de triterpenoides.

(2) Determinación del contenido de flavonoides

Tomar tres porciones de aproximadamente 0,1 g (equivalente a 2 g de materia prima) del polvo grueso de este producto, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia y calcular el contenido total de flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto alcohólico contiene $0,325 \pm 0,043$ g de flavonoides.

(3) Determinación del contenido de alcaloides

Tomar tres porciones de aproximadamente 1 g del polvo grueso de este producto, pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmolL⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto alcohólico contiene 0,028 ± 0,007 g de alcaloides.

(4) Determinación del contenido de cumarinas

Se determina que el contenido de cumarinas es del 1 % al 10 %.

4. Estudios sobre la actividad antitumoral de extracto alcohólico de hoja de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en tres partes polares

Extraer extracto alcohólico de hoja de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. con éter de petróleo, acetato de etilo y n-butanol en secuencia, recuperar los disolventes y liofilizar para obtener extractos en tres partes polares y disolver en isopropanol. Tomar una diversidad de células tumorales en fase de crecimiento logarítmico (las estirpes celulares tumorales utilizadas son las siguientes: estirpe celular de carcinoma de útero Hela; estirpe celular de hepatoma humano SMMC-7721; estirpe celular de carcinoma de pulmón humano A549; estirpe celular de carcinoma de colon humano Caco-2; estirpe celular de leucemia K562; estirpe celular de carcinoma gástrico MGC-803;), centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, ajustar la concentración de células del precipitado de la suspensión celular a 1 x 10⁵ células/ml con el medio de cultivo correspondiente que contiene suero fetal bovino al 10 % y células de semillas en placas de cultivo de 96 pocillos. A cada pocillo, añadir 200 µl de suspensión celular, añadir respectivamente solución de extracto estéril de determinada concentración para hacer que la concentración final de extracto en cada pocillo sea 0,002, 0,01, 0,02, 0,04, 0,05, 0,08, 0,1, 0,2 mg/ml, mezclar bien, colocar en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h, precipitar el cultivo, lavar dos veces con PBS, a cada pocillo, añadir 20 µl de tampón de fosfato MTT 5 mg/ml y 150 µl de medio de cultivo, cultivar en las mismas condiciones durante 4 h y después terminar el cultivo. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, después desechar el medio de cultivo en los pocillos, a cada pocillo, añadir 150 µl de DMSO, agitar durante 10 min de manera que las partículas de formazán formadas se disuelvan totalmente y determinar la absorbancia con el lector de microplacas. Seleccionar 570 nm como la longitud de onda de medición. Calcular la CI50 del extracto con respecto a las células tumorales. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los resultados son que el extracto alcohólico de hoja de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en la parte de éter de petróleo y la parte de acetato de etilo tiene buena actividad antitumoral, especialmente el extracto en la parte de acetato de etilo tiene una actividad mejor, mientras que la CI50 del extracto en la parte de n-butanol no puede calcularse dentro del intervalo de concentraciones del experimento. Los inventores estudiaron adicionalmente la parte de acetato de etilo.

Tabla 2 Efectos de inhibición de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en diferentes partes polares sobre las células tumorales:

Estirpe celular	Parte de éter de petróleo	Parte de acetato de etilo	Parte de N-butanol
Hela	0,0492 mg/ml	0,0139 mg/ml	-
SMMC-7721	0,0993 mg/ml	0,0365 mg/ml	-
A549	0,0142 mg/ml	0,0075 mg/ml	-
Caco-2	0,0545 mg/ml	0,0778 mg/ml	-
MGC-803	0,0702 mg/ml	0,0305 mg/ml	-

5. Estudios sobre los efectos de la parte polar de acetato de etilo en ratones portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Inhibición del tumor trasplantado en ratones S180:

Tomar ratones Kunming, inyectar por vía subcutánea 0,2 ml de suspensión S180 (aproximadamente 1 x 10⁶ células tumorales) de manera rutinaria en el lóbulo anterior derecho. 24 horas después de la inyección, los ratones se agrupan aleatoriamente y se numeran. Hay 10 ratones en los grupos de control y 10 ratones en cada uno de los grupos de ensayo de dosis alta, dosis media y dosis baja. Los ratones de cada grupo reciben fármacos a través de administración intragástrica una vez al día por un total de 14 veces. En el grupo de control positivo, se administra ciclofosfamida (85 mg/kg) a diario y la dosis, la frecuencia, y el tiempo son idénticos a los de los grupos de ensayo. 24 horas después

de la última administración, sacrificar los animales, pesar el peso corporal, retirar totalmente el bulto tumoral, pesar y calcular la tasa de inhibición tumoral, los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 Efectos de la parte polar de acetato de etilo en ratones portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Grupo	Grupo de control	Parte polar de acetato de etilo (dosis baja)	Parte polar de acetato de etilo (dosis media)	Parte polar de acetato de etilo (dosis alta)
Tasa de inhibición tumoral	38,45 ± 3,62 %	13,85 ± 4,59 %	40,76 ± 5,40 %	76,13 ± 8,32 %*
*: Comparado con el grupo de control, P <0,05; la diferencia es estadísticamente significativa.				

5

II. La actividad antitumoral del extracto de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Realización 1

- 10 Tomar 1 kg de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 8 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, remojar durante 2 días, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 50 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

15 Realización 2

- Tomar 1 kg de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso para la extracción por reflujo, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 60 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Dispersar extracto etanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extraer con éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, para obtener extracto en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo.

Realización 3

- 25 Tomar 1 kg de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol a 10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir metanol a 8 veces el peso, remojar durante 2 días, recoger el extracto líquido, recuperar el metanol a 40 °C a presión reducida y secar para obtener extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Dispersar extracto metanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extraer en éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, para obtener extracto en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo.

Realización 4

- 35 Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 23 mg de triterpenoides.

- 45 Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y calcular el contenido total de flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 103 mg de flavonoides.

- 55 Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de

hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmol-L⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 21 g de alcaloides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir 70 % de etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y calcular el contenido total de cumarinas en la solución de ensayo de muestra (cumarinas en forma de umbeliferona). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 10,2 mg de cumarinas totales.

Realización 5

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 108 g de triterpenoides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y calcular el contenido total de flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 497 mg de flavonoides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmol-L⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 107 mg de alcaloides. Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir 70 % de etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y calcular el contenido total de cumarinas en la solución de ensayo de muestra (cumarinas en forma de umbeliferona). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 186 mg de cumarinas.

1. Estudios sobre la actividad antitumoral *in vitro* de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Tomar una diversidad de células tumorales en fase de crecimiento logarítmico (las estirpes celulares tumorales utilizadas son las siguientes: estirpe celular de carcinoma de útero Hela; estirpe celular de hepatoma humano SMMC-7721; estirpe celular de carcinoma de pulmón humano A549; estirpe celular de carcinoma de colon humano Caco-2; estirpe celular de leucemia K562; estirpe celular de carcinoma gástrico MGC-803;), centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, ajustar la concentración de células del precipitado de la suspensión celular a 1×10^5 células/ml con el medio de cultivo correspondiente que contiene suero fetal bovino al 10 % y células de semillas en placas de cultivo de 96 pocillos. A cada pocillo, añadir 200 µl de suspensión celular, añadir respectivamente solución de extracto estéril de determinada concentración para hacer que la concentración final de extracto en cada pocillo sea 0,02, 0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 0,8, 1,0, 2,0 mg/ml, mezclar bien, colocar en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h, precipitar el cultivo, lavar dos

veces con PBS, a cada pocillo, añadir 20 µl de tampón de fosfato MTT 5 mg/ml y 150 µl de medio de cultivo, cultivar en las mismas condiciones durante 4 h y después terminar el cultivo. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, después desechar el medio de cultivo en los pocillos, a cada pocillo, añadir 150 µl de DMSO, agitar durante 10 min de manera que las partículas de formazán formadas se disuelvan totalmente y seleccionar 570 nm como la longitud de onda de medición, determinar la absorbancia con un lector de microplacas. Calcular la CI50 del extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la realización 1 con respecto a las células tumorales. Los resultados se muestran en la Tabla 4. Los resultados han demostrado que, el extracto de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir tiene un efecto antitumoral bueno.

10 Tabla 4 Los efectos de inhibición de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en diferentes células tumorales

Estirpe celular	Extracto etanólico de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.
Hela	0,0216 mg/ml
SMMC-7721	0,1452 mg/ml
A549	0,0101 mg/ml
Caco-2	0,0875 mg/ml
MGC-803	0,1862 mg/ml

2. Estudios sobre la actividad antitumoral *in vitro* de 3 extractos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2

15 Extraer extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 1 con éter de petróleo, acetato de etilo y n-butanol en secuencia, recuperar los disolventes y liofilizar para obtener extracto en éter de petróleo, extracto en acetato de etilo y extracto en n-butanol de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y disolver en isopropanol. Tomar una diversidad de células tumorales en fase de crecimiento logarítmico (las estirpes celulares tumorales utilizadas son las siguientes: estirpe celular de carcinoma de útero Hela; estirpe celular de hepatoma humano SMMC-7721; estirpe celular de carcinoma de pulmón humano A549; estirpe celular de carcinoma de colon humano Caco-2; estirpe celular de leucemia K562; estirpe celular de carcinoma gástrico MGC-803;), centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, ajustar la concentración de células del precipitado de la suspensión celular a 1×10^5 células/ml con el medio de cultivo correspondiente que contiene suero fetal bovino al 10 % y células de semillas en placas de cultivo de 96 pocillos. A cada pocillo, añadir 200 µl de suspensión celular, añadir respectivamente solución de extracto estéril de determinada concentración para hacer que la concentración final de extracto en cada pocillo sea 0,002, 0,01, 0,02, 0,04, 0,05, 0,08, 0,1, 0,2 mg/ml, mezclar bien, colocar en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 h, precipitar el cultivo, lavar dos veces con PBS, a cada pocillo, añadir 20 µl de tampón de fosfato MTT 5 mg/ml y 150 µl de medio de cultivo, cultivar en las mismas condiciones durante 4 h y después terminar el cultivo. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 min, después desechar el medio de cultivo en los pocillos, a cada pocillo, añadir 150 µl de DMSO, agitar durante 10 min de manera que las partículas de formazán formadas se disuelvan totalmente y seleccionar 570 nm como la longitud de onda de medición, determinar la absorbancia con un lector de microplacas. Calcular la CI50 del extracto con respecto a las células tumorales. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Los resultados son que el extracto en éter de petróleo y el extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir tienen una actividad antitumoral buena, especialmente el extracto en la parte de acetato de etilo tiene una actividad mejor, mientras que la CI50 del extracto en n-butanol no puede calcularse dentro del intervalo de concentraciones del experimento.

Tabla 5 Los efectos de inhibición de diferentes extractos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre células tumorales

Estirpe celular	Extracto en éter de petróleo	Extracto en acetato de etilo	Extracto en N-butanol
Hela	0,0357 mg/ml	0,0102 mg/ml	-
SMMC-7721	0,1242 mg/ml	0,0357 mg/ml	-
A549	0,0156 mg/ml	0,0064 mg/ml	-
Caco-2	0,0915 mg/ml	0,0623 mg/ml	-
MGC-803	0,0812 mg/ml	0,0487 mg/ml	-
"-": la CI50 no puede calcularse dentro del intervalo de concentraciones del experimento			

40 3. Efectos de extractos etanólicos, metanólicos, en éter de petróleo y en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en ratones portadores de S180

45 Elegir ratones que estén en buenas condiciones de salud y que hayan recibido una inyección de tumor S180 hace 8 días, desinfectar la piel abdominal, extraer la ascitis, mezclar con solución salina normal en relación 1:4 (volumen de ascitis: volumen de solución salina normal) para preparar la suspensión. Tomar 82 ratones Kunming machos, con un peso de 18 a 20 g, dividirlos aleatoriamente en 7 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de modelo (mucilago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (ciclofosfamida, CTX), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de

extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. En todos los grupos, inyectar por vía subcutánea 0,2 ml de la suspensión mencionada anteriormente en el lóbulo anterior derecho. 2 horas después de la inyección, los ratones en el grupo de control y en los grupos de fármacos reciben sustancia o suspensión de ensayo a través de administración intragástrica una vez al día durante 14 días consecutivos. En el grupo de control positivo, se administra CTX por vía intraperitoneal una vez cada dos días por un total de 7 veces. 24 h después de la última administración, sacrificar los ratones mediante dislocación cervical, retirar el bulto tumoral, pesar y calcular la tasa de inhibición ((1 - peso tumoral promedio en el grupo experimental/peso tumoral promedio en el grupo de control de modelo) * 100 %). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

10 Tabla 6 Efecto del extracto de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre ratones portadores de S180 ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Número de animales	Dosis	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
Control de modelo	11	-	1,20 $\pm$ 0,45	-
Control positivo (ctx)	9	40 mg/kg	0,35 $\pm$ 0,58**	70,8
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	12	0,4 g/kg	1,14 $\pm$ 0,46	5,0
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	12	1,6 g/kg	0,34 $\pm$ 0,43**	71,7
Extracto metanólico	12	4,8 g/kg	0,57 $\pm$ 0,45**	52,5
Extracto en éter de petróleo	12	4,8 g/kg	0,39 $\pm$ 0,23**	67,5
Extracto etanólico	12	4,8 g/kg	0,44 $\pm$ 0,29**	63,3

*: En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01

Los resultados experimentales han demostrado que la administración intraperitoneal de 1,6 g/kg de extracto en acetato de etilo de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. puede inhibir significativamente el crecimiento de S180 en ratones y la potencia de dosis de 1,6 g/kg es similar a la administración intraperitoneal de 40 mg/kg de ciclofosfamida cada dos días; 4,8 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo también pueden reducir eficazmente el peso tumoral y la tasa de inhibición tumoral es superior al 50 %, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen una actividad antitumoral buena.

20 4. Efectos de extractos etanólicos, metanólicos, en éter de petróleo y en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en ratones portadores de tumor ascítico de Ehrlich

Elegir ratones que estén en buenas condiciones de salud y que hayan recibido la inyección de tumor ascítico de Ehrlich hace 8 días, desinfectar la piel abdominal, extraer la ascitis, mezclar con solución salina normal a 4×10^6 /ml para su uso futuro. Tomar 82 ratones Kunming machos, con un peso de 18 a 20 g, dividirlos aleatoriamente en 7 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (ciclofosfamida, CTX), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. En todos los grupos, inyectar por vía subcutánea 0,2 ml de la suspensión mencionada anteriormente en el lóbulo anterior derecho. 2 horas después de la inyección, los ratones en el grupo de control y en los grupos de fármacos reciben sustancia o suspensión de ensayo a través de administración intragástrica una vez al día, administrar de forma continua hasta que el animal muera. En el grupo de control positivo, se administra CTX por vía intraperitoneal una vez cada dos días por un total de 7 veces. Cuando el animal esté muriendo, sacrificarlo mediante dislocación cervical; el día de la muerte se calcula como el tiempo de supervivencia; después de la muerte, pesar, evacuar la ascitis, pesar de nuevo y la diferencia es el peso de la ascitis. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 Efecto del extracto de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre ratones portadores de tumor ascítico de Ehrlich ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Número de animales	Tiempo de supervivencia (Día)	Peso de ascitis
Control de modelo	-	12	16,3 $\pm$ 2,5	21,4 $\pm$ 1,8
Control positivo (ctx)	40 mg/kg	12	17,2 $\pm$ 2,3	15,9 $\pm$ 1,5**
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	12	19,9 $\pm$ 3,9*	17,3 $\pm$ 1,8**
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	1,6 g/kg	12	20,5 $\pm$ 2,7**	14,2 $\pm$ 2,0**
Extracto metanólico	4,8 g/kg	12	19,0 $\pm$ 3,1*	16,9 $\pm$ 2,5**
Extracto en éter de petróleo	4,8 g/kg	12	19,6 $\pm$ 2,2**	15,5 $\pm$ 1,1**
Extracto etanólico	4,8 g/kg	12	20,1 $\pm$ 2,9**	17,2 $\pm$ 2,2**

(continuación)

Grupo	Dosis	Número de animales	Tiempo de supervivencia (Día)	Peso de ascitis
En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01				

Los resultados experimentales han demostrado que la administración intraperitoneal de 0,4 g/kg y superior de extracto en acetato de etilo de planta entera *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. puede inhibir significativamente el crecimiento del tumor ascítico de Ehrlich en ratones y prolongar el tiempo de supervivencia de los animales; la potencia de la dosis de 1,6 g/kg es similar a la de la ciclofosfamida en la inhibición de la cantidad de ascitis, pero esta última no puede prolongar el tiempo de supervivencia de los animales, lo que sugiere determinadas ventajas únicas; 4,8 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo también pueden prolongar eficazmente el tiempo de supervivencia e inhibir la formación de ascitis, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen una actividad antitumoral buena.

5. Efectos del extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en combinación de paclitaxel y cinobufotalina sobre ratones portadores de S180

Elegir ratones que estén en buenas condiciones de salud y que hayan recibido una inyección de tumor S180 hace 8 días, desinfectar la piel abdominal, extraer la ascitis, mezclar con solución salina normal en relación 1:4 (volumen de ascitis: volumen de solución salina normal) para preparar la suspensión. Tomar 84 ratones Kunming machos, con un peso de 18 a 20 g, dividirlos aleatoriamente en 7 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (ciclofosfamida, CTX), grupo de extracto en acetato de etilo, grupo de paclitaxel, grupo de cinobufotalina, en combinación con el grupo de paclitaxel, en combinación con el grupo de cinobufotalina. En todos los grupos, inyectar por vía subcutánea 0,2 ml de la suspensión mencionada anteriormente en el lóbulo anterior derecho. 2 horas después de la inyección, los ratones en el grupo de control y los grupos de fármacos reciben sustancia o suspensión de ensayo a través de administración intragástrica o intravenosa una vez al día durante 14 días consecutivos; En el grupo de control positivo, se administra CTX por vía intraperitoneal una vez cada dos días por un total de 7 veces. 24 h después de la última administración, sacrificar los ratones mediante dislocación cervical, retirar el bulto tumoral, pesar y calcular la tasa de inhibición ((1 - peso tumoral promedio en el grupo experimental/peso tumoral promedio en el grupo de control de modelo) * 100 %). Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8 Efecto del extracto en acetato de etilo de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en combinación de paclitaxel y cinobufotalina sobre ratones portadores de S180 ($\bar{x} \pm s$)

Grupo	Número de animales	Dosis	Peso tumoral (g)	Tasa de inhibición tumoral (%)
Control de modelo	11	-	1,30 ± 0,55	-
Control positivo (CTX)	12	40 mg/kg	0,48 ± 0,41**	63,1
Extracto en acetato de etilo	12	0,4 g/kg	1,04 ± 0,40	20,0
Paclitaxel	12	5 mg/kg	0,85 ± 0,38*	34,6
En combinación con paclitaxel	12	Extracto en acetato de etilo 0,4 g/kg + paclitaxel 5 mg/kg	0,52 ± 0,26** @	60,0
Cinobufotalina	12	1 ml/kg	0,73 ± 0,42*	43,8
En combinación con cinobufotalina	12	Extracto en acetato de etilo 0,4 g/kg + cinobufotalina 1 ml/kg	0,37 ± 0,18**#	71,5
En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01; En comparación con el grupo de paclitaxel, @P<0,05; En comparación con el grupo de cinobufotalina, #P<0,05;				

Los resultados experimentales han demostrado que la administración intraperitoneal de 0,4 g/kg de extracto en acetato de etilo de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. no tiene un efecto de inhibición significativo sobre el crecimiento de S180 en ratones, mientras que 5 mg/kg de paclitaxel y 1 ml/kg de cinobufotalina muestran ciertos efectos. Sin embargo, la combinación de la misma dosis de extracto en acetato de etilo de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y 5 mg/kg de paclitaxel y 1 ml/kg de cinobufotalina puede mejorar significativamente la tasa de inhibición de paclitaxel, lo que sugiere que la combinación de extracto de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y otros fármacos antitumorales puede mejorar la eficacia de estos fármacos.

III. Actividad antifibrótica de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Realización 1

Tomar 1 kg de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 8 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, remojar durante 2 días, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 50 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

5 Realización 2

10 Tomar 1 kg de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso para la extracción por reflujo, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 60 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Dispersar extracto etanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extraer con éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, para obtener extracto en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo.

15 Realización 3

20 Tomar 1 kg de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol a 10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir metanol a 8 veces el peso, remojar durante 2 días, recoger el extracto líquido, recuperar el metanol a 40 °C a presión reducida y secar para obtener extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Dispersar extracto metanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extraer en éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, para obtener extracto en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo.

Realización 4

25 Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 30 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 23 g de triterpenoides.

35 Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y calcular el contenido total de 40 flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 103 mg de flavonoides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, 45 añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, 50 transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmol-L⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 21 g de alcaloides. 55

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir 70 % de etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y calcular el contenido total de cumarinas en la solución de ensayo de muestra (cumarinas en forma de umbeliferona). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 10,2 mg de cumarinas totales.

65 Realización 5

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 108 g de triterpenoides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y calcular el contenido total de flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 497 mg de flavonoides totales.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmol-L⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 107 mg de alcaloides. Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de la Realización 2, pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir 70 % de etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y calcular el contenido total de cumarinas en la solución de ensayo de muestra (cumarinas en forma de umbeliferona). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 186 mg de cumarinas.

1. Efecto sobre la fibrosis hepática en ratas

Tomar 60 ratas SD (200-240 g, machos), dividir las aleatoriamente en grupo de control de blanco (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (dexametasona, 1 mg/kg), grupo de dosis baja de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (preparado de acuerdo con la Realización 1) (0,4 g/kg), grupo de dosis media de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (0,8 g/kg) y grupo de dosis alta de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (1,6 g/kg) con estratificación de peso corporal. Excepto por el grupo de control de blanco, las ratas en otros grupos reciben una inyección subcutánea de 1 ml/kg de tetracloruro de carbono al 40 % en solución de aceite vegetal, 2 veces por semana durante 3 meses consecutivos, mientras reciben una dieta rica en grasas y una solución acuosa de etanol al 5 %. La sustancia de ensayo se administra a través de administración intragástrica una vez al día durante 3 meses consecutivos. Al día siguiente después de la administración del fármaco, extraer sangre aórtica abdominal, separar el plasma, determinar los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), procolágeno III (PC-III), ácido hialurónico (HA) y laminina (LH); sacrificar los animales y tomar el hígado para un examen patológico. Los resultados de los ensayos bioquímicos en suero se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9 Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre la fibrosis hepática experimental de hígado de rata y los índices bioquímicos sanguíneos (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	ALT (U/l)	PC-III (μg/l)	HA (μg/l)	LN (μg/l)
Control normal	43 ± 4**	9,5 ± 1,7**	131 ± 29**	12 ± 2**
Control de modelo	678 ± 123	32,2 ± 6,9	319 ± 71	86 ± 19
Control positivo	456 ± 98**	20,8 ± 3,1**	280 ± 54	62 ± 20*
Extracto de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir. (0,4 g/kg)	617 ± 107	30,5 ± 6,2	289 ± 62	80 ± 23

(continuación)

Grupo	ALT (U/l)	PC-III (µg/l)	HA (µg/l)	LN (µg/l)
Extracto de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir. (0,8 g/kg)	412 ± 126**	25,1 ± 4,2*	263 ± 69	59 ± 17*
Extracto de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir. (1,6 g/kg)	335 ± 138**	18,5 ± 4,8**	217 ± 58**	41 ± 9**
En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01				

Los resultados han demostrado que, en comparación con el grupo modelo, 0,8 g/kg y 1,6 g/kg de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. tienen una función protectora en la lesión hepática en rata por fibrosis experimental inducida por tetracloruro de carbono; en particular en dosis más altas, cada índice mejora significativamente.

El examen patológico ha demostrado que las células hepáticas de ratas en el grupo modelo muestran degeneración acuosa evidente, necrosis hepática y degeneración grasa evidentes, con manifestaciones de fibrosis hepática evidentes; en comparación con el grupo modelo, en grupo de dosis alta y el grupo de dosis media de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., el grado de degeneración acuosa y degeneración grasa de las células hepáticas es significativamente menor, lo que sugiere que tiene un buen efecto inhibidor sobre la fibrosis hepática.

2. Efecto sobre la fibrosis pulmonar en ratas

Tomar 60 ratas SD (200-240 g, machos), dividir las aleatoriamente en grupo de control de operación simulada (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (dexametasona, 1 mg/kg), grupo de dosis baja de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (preparado de acuerdo con la Realización 1) (0,4 g/kg), grupo de dosis media de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (0,8 g/kg) y grupo de dosis alta de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (1,6 g/kg) con estratificación de peso corporal. Todos los animales reciben separación de la tráquea con anestesia mediante inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 10 % (350 mg/kg). Excepto el grupo de control de operación simulada, las ratas de los otros grupos reciben una inyección de 5 mg/kg de bleomicina en 0,4 ml de solución salina normal, mientras que las ratas en el grupo de control de operación simulada reciben solamente solución salina normal. A partir del día siguiente después de la cirugía, se administra sustancia de ensayo a diario durante 30 días consecutivos. Sacrificar a los animales mediante dislocación cervical y tomar los pulmones; algunos órganos se homogenizan para la determinación del contenido de hidroxiprolina y otros para el examen patológico. Los resultados del contenido de hidroxiprolina determinado en el tejido pulmonar se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10 Cambio del contenido de hidroxiprolina en los pulmones de las ratas en cada grupo (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Contenido de hidroxiprolina (mg/gpro)
Control de operación simulada	10,3 ± 3,8**
Control de modelo	18,4 ± 5,0
Control positivo	13,6 ± 3,3*
Extracto de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir. (0,4 g/kg)	16,5 ± 4,7
Extracto de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir. (0,8 g/kg)	14,1 ± 6,2*
Extracto de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir. (1,6 g/kg)	12,3 ± 3,7*
En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01	

Los resultados han demostrado que, en comparación con el grupo modelo, 0,8 g/kg y 1,6 g/kg de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. reducen eficazmente el contenido de hidroxiprolina en el pulmón de ratas modelo, lo que sugiere que tiene un efecto inhibidor bueno de la fibrosis pulmonar.

Los ensayos de examen patológico han demostrado que, en las ratas del grupo modelo aparece fibrosis pulmonar evidente, con manifestación de una gran cantidad de fibroblastos pulmonares intersticiales, una gran cantidad de deposición de tejido conectivo fibroso, daño estructural en células alveolares y cierta desaparición del espacio alveolar; en comparación con el grupo modelo, en cada grupo de dosis de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., el depósito de tejido conectivo fibroso en las ratas es menor y los fibroblastos pulmonares intersticiales también son menos, mientras que el grupo de dosis alta es más significativo, lo que sugiere que el extracto es un tratamiento potencial de la fibrosis pulmonar.

3. Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en combinación con polieno fosfatidilcolina sobre la fibrosis hepática en ratas

Tomar 60 ratas SD (200-240 g, machos), dividir las aleatoriamente en grupo de control de blanco, grupo de control de

modelo, grupo de control positivo (dexametasona, 1 mg/kg), grupo de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (preparado de acuerdo con la Realización 1,0,8 g/kg), grupo de polifeno fosfatidilcolina, grupo de combinación de fármacos extracto de (*Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. 0,8 g/kg + Polieno fosfatidilcolina 1 ml/kg) con estratificación del peso corporal. Excepto por el grupo de control de blanco, las ratas en otros grupos reciben una inyección subcutánea de 1 ml/kg de tetracloruro de carbono al 40 % en solución de aceite vegetal, 2 veces por semana durante 3 meses consecutivos, mientras reciben una dieta rica en grasas y una solución acuosa de etanol al 5 %. La sustancia de ensayo se administra a través de administración intragástrica una vez al día durante 3 meses consecutivos. Al día siguiente después de la administración del fármaco, extraer sangre aórtica abdominal, separar el plasma, determinar los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), procolágeno III (PC-III), ácido hialurónico (HA) y laminina (LH); sacrificar los animales y tomar el hígado para un examen patológico. Los resultados de los ensayos bioquímicos en suero se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11 Efecto de la combinación de fármacos sobre la fibrosis hepática experimental de hígado de rata y los índices bioquímicos sanguíneos (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	ALT (U/l)	PC-III (μ g/l)	HA (μ g/l)	LN (μ g/l)
Control normal	42 $\pm$ 3**	9,7 $\pm$ 1,9**	129 $\pm$ 32**	11 $\pm$ 4**
Control de modelo	684 $\pm$ 114	31,7 $\pm$ 8,0	310 $\pm$ 63	87 $\pm$ 21
Control positivo	478 $\pm$ 90**	20,6 $\pm$ 3,8**	285 $\pm$ 57	65 $\pm$ 23*
Extracto de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.	423 $\pm$ 98**	24,5 $\pm$ 3,9*	271 $\pm$ 60	60 $\pm$ 18**
Polieno fosfatidilcolina	443 $\pm$ 130**	27,0 $\pm$ 4,8	284 $\pm$ 78	63 $\pm$ 18*
Combinación de fármacos	315 $\pm$ 102**#	18,6 $\pm$ 5,1**##	186 $\pm$ 67**##	47 $\pm$ 11**#

En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01; en comparación con el grupo de polienofosfatidilcolina, # P <0,05, ## P <0,01

4. Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en combinación con ligustrazina sobre la fibrosis pulmonar en ratas

Tomar 60 ratas SD (200-240 g, machos), dividir las aleatoriamente en grupo de control de operación simulada, grupo de control de modelo, grupo de control positivo (dexametasona, 1 mg/kg), grupo de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (preparado de acuerdo con la Realización 1, 0,8 g/kg.op), Ligustrazina (40 mg/kg, ip) y grupo de combinación de fármacos Extracto de (*Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. 0,8 g/kg, op; inyección de Ligustrazina 40 mg/kg, ip) con estratificación del peso corporal. Todos los animales reciben separación de la tráquea con anestesia mediante inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 10 % (350 mg/kg). Excepto el grupo de control de operación simulada, las ratas de los otros grupos reciben una inyección de 5 mg/kg de bleomicina en 0,4 ml de solución salina normal, mientras que las ratas en el grupo de control de operación simulada reciben solamente solución salina normal. El día siguiente después de la cirugía, administrar la sustancia de ensayo a través de administración intragástrica o administración por inyección, se administra sustancia de ensayo a diario durante 30 días consecutivos. Sacrificar a los animales mediante dislocación cervical y tomar los pulmones; algunos órganos se homogenizan para la determinación del contenido de hidroxiprolina y otros para el examen patológico. Los resultados del contenido de hidroxiprolina determinado en el tejido pulmonar se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12 Efecto de la combinación de fármacos sobre la hidroxiprolina en los pulmones de las ratas (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Contenido de hidroxiprolina (mg/gpro)
Control de operación simulada	10,1 $\pm$ 3,4**
Control de modelo	17,9 $\pm$ 4,3
Control positivo	13,4 $\pm$ 3,7*
Extracto de <i>Paliurus ramosissimus</i> (Lour.) Poir.	12,9 $\pm$ 4,9*
Ligustrazina	14,6 $\pm$ 5,7
Combinación de fármacos	9,8 $\pm$ 2,9**#

En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01; En comparación con el grupo de ligustrazina, #P<0,05

Los resultados han demostrado que, 40 mg/kg de ligustrazina sola no tienen una eficacia significativa sobre la fibrosis pulmonar experimental, mientras que la combinación de fármacos reduce eficazmente el contenido de hidroxiprolina en los pulmones en las ratas modelo, que tiene diferencias significativas cuando se compara con 40 mg/kg de ligustrazina, lo que sugiere que el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. puede mejorar eficazmente la eficacia de otros agentes terapéuticos para la fibrosis pulmonar.

IV. Actividad antifúngica del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

(I) Realización Preparación de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

5 1. Preparación de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

10 (1) Tomar 1 kg de la planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. fresco, añadir etanol al 95 % (concentración en volumen) a 8 veces el volumen de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., remojar durante 1-2 días, triturar las hojas, raíces y tallos, añadir etanol al 95 % a 12 veces el volumen de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., remojar durante 3 días, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a presión reducida y liofilizar el concentrado para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

15 (2) Tomar 1 kg de la planta entera (o cualquier parte) de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. fresco, triturar, añadir etanol al 95 % a 8 veces el volumen de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., someter a reflujo para extraer 3 veces, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a presión reducida y liofilizar el concentrado para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

20 (3) Tomar 1 kg de la planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. fresco (raíces, tallos, hojas, etc.), liofilizar y después triturar (o triturar y después liofilizar), añadir etanol al 95 % a 10 veces el volumen de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., someter a reflujo para extraer 3 veces, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a presión reducida y liofilizar el concentrado para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

2. Preparación de extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

25 Tomar 1 kg de la planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. fresco, triturar, añadir metanol de 6 veces el volumen de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., someter a reflujo para extraer 3 veces, recoger el extracto líquido, recuperar el metanol a presión reducida y liofilizar el concentrado para obtener extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

30 3. Preparación de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

(1) Tomar concentrado de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extracto en éter de petróleo, recuperar el éter de petróleo y secar.

35 (2) Tomar muestra seca de extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., suspender con 10 veces de agua, extracto en éter de petróleo, recuperar el éter de petróleo y secar.

(3) Tomar muestra seca de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., someter a reflujo para extraer con 10 veces de éter de petróleo, recuperar el éter de petróleo y secar.

40

4. Preparación de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

(1) Tomar concentrado de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., extraer con 10 veces de éter de petróleo y después con 10 veces de acetato de etilo, recuperar el acetato de etilo y secar.

45

(2) Tomar muestra seca de extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., suspender con 10 veces de agua, extraer con 10 veces de éter de petróleo y después con 10 veces de acetato de etilo, recuperar el acetato de etilo y secar.

50 (3) Tomar muestra seca de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., someter a reflujo para extraer con 6 veces de acetato de etilo 2 veces, recuperar el acetato de etilo y secar.

5. Preparación de comprimidos de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

55 Tomar 300 g de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., triturar, hacer pasar a través de un tamiz de malla 40, añadir 100 g de celulosa microcristalina, 57,5 g de lactosa, 20 g de carboximetilcelulosa sódica reticulada, mezclar bien, pulverizar uniformemente la cantidad apropiada de solución de etanol al 95 % (concentración en volumen), granular con extrusión en húmedo, hacer pasar a través de un tamiz de malla 24, secar a 50 °C, después añadir 20 g de carboximetilcelulosa sódica reticulada y 2,5 g de estearato de magnesio, mezclar totalmente, comprimir en comprimidos para obtener comprimidos de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.;

60

6. Preparación de gránulos de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

65 Tomar 1000 g de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., triturar, hacer pasar a través de un tamiz de malla 40, añadir 4000 g de azúcar en polvo, mezclar bien, pulverizar uniformemente la cantidad apropiada de solución de etanol al 95 % (concentración en volumen), granular con extrusión en húmedo, hacer pasar a través de

un tamiz de malla 24, secar a 50 °C y uniformizar los gránulos para obtener gránulos de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.;

7. Preparación de pomadas de extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Pesar 115 g de octadecanol, 115 g de vaselina blanca y 70 g de monoestearato de glicerilo, calentar para fundir y obtener la fase oleosa, añadir 40 g de extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; pesar 100 g de glicerol, 15 g de laurilsulfato de sodio y 0,01 g de clorhidrato de cisteína, añadir 650 ml de agua para disolver y obtener la fase acuosa; calentar por separado a 75 °C-80 °C, añadir lentamente la fase acuosa a la fase oleosa con agitación, después continuar agitando durante 15 minutos para obtener pomadas de extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

8. Preparación de geles de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Tomar 10 g de carbómero, verter en 420 ml de agua purificada, agitar para hinchar, añadir 100 ml de propilenglicol y agitar para disolver, añadir 18 g de trietanolamina gota a gota con agitación para preparar la matriz de gel; tomar 100 g de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y 2 g de etilparabeno, disolver en 350 ml de etanol, añadir la matriz de gel con agitación y agitar bien.

9. Preparación de plásticos de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Tomar 40 g de alcohol polivinílico 124, hinchar en 400 ml de agua purificada; tomar 100 g de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., disolver en 400 ml de etanol, después añadir 100 ml de glicerina, agitar bien, añadir lentamente en solución de alcohol polivinílico, agitar bien, filtrar y añadir etanol sobre un filtro a 1000 ml.

10. Preparación de linimento de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Tomar 100 g de polvo de extracto en éter de petróleo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., colocar en un mortero, añadir 500 ml de aceite de cacahuete, moler bien, después añadir lentamente solución acuosa saturada de hidróxido de calcio a 1000 ml y moler hasta una sustancia lechosa de color blanco homogénea.

11. Preparación de lociones de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Tomar 100 g de polvo de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., colocar en un mortero, añadir 50 ml de glicerol y la cantidad apropiada de agua purificada, moler en una pasta y añadir gradualmente agua purificada hasta mezclar totalmente.

(II) Estudio sobre la actividad antifúngica del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

Pesar 1 g de extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. preparado en la Realización 1 (1), disolver con solución de isopropanol al 5 % hasta 10 ml, filtrar a través de una membrana de 0,22 µm para la esterilización. Tomar 1 ml de solución esterilizada, añadir 9 ml de medio PDA que se funde y se enfría a aproximadamente 50 °C, agitar bien, verter rápidamente en una placa de Petri con un diámetro de 6 cm y dejar reposar para preparar PDA de la placa de cultivo que contiene extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. 10 mg/ml. Usar el mismo volumen de solución de alcohol isopropílico al 5 % para preparar la placa de cultivo de PDA de control de blanco.

Mover el inóculo bacteriano que se ha cortado bien, a la placa de cultivo de PDA que contiene el fármaco anterior, incubar a 25 °C, cuando las colonias bacterianas del grupo de control se acerquen al borde de la placa, determinar el diámetro de la colonia de todas las colonias de la placa de cultivo con el método entrecruzado y calcular la tasa de inhibición de hongos después de la corrección.

Los resultados se muestran en la Tabla 13. El extracto alcohólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. inhibe significativamente diversos tipos de hongos sometidos a ensayo. Debido a que los hongos sometidos a ensayo son hongos patógenos comunes con representación significativa, los resultados sugieren que el extracto alcohólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. tiene una actividad antifúngica fuerte, que se espera que se aplique a la preparación de fármacos antifúngicos.

Tabla 13 Efecto del extracto alcohólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre la inhibición de diversos hongos (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

Cepas	Tasa de inhibición de hongos (%)
<i>Candida albicans</i>	87,53 ± 8,36
<i>Trichophyton rubrum</i>	80,46 ± 10,24
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	72,69 ± 11,53
<i>Trichophyton violaceum</i>	90,16 ± 14,36

(continuación)

Cepas	Tasa de inhibición de hongos (%)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	54,39 ± 8,67
<i>Trichophyton verrucosum</i>	42,63 ± 12,81
<i>Microsporum nanum</i>	60,54 ± 10,33
<i>Microsporum canis</i>	61,32 ± 7,65
<i>Sporothrix schenckii</i>	76,87 ± 15,69
<i>Phialophora compactum</i>	66,63 ± 17,65
<i>Exophiala dermatitidis</i>	62,65 ± 8,87
<i>Hormodendrum pedrosei</i>	53,13 ± 10,08

V. Extracto de hoja de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. en el tratamiento de la disfunción inmunitaria o (y) enfermedades autoinmunitarias

5

(I) Preparación de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

1. Preparación de extracto etanólico de planta entera

- 10 Tomar 1 kg de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 8 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, remojar durante 2 días, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 50 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

15 2. Preparación de extractos etanólicos, en éter de petróleo y en acetato de etilo de tallos y hojas

- 20 Tomar 1 kg de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso para la extracción por reflujo, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 60 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Dispersar extracto etanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extraer con éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, para obtener extracto en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo.

25 3. Preparación de extractos en éter de petróleo y en acetato de etilo de planta entera

- 30 Tomar 1 kg de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol a 10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir metanol a 8 veces el peso, remojar durante 2 días, recoger el extracto líquido, recuperar el metanol a 40 °C a presión reducida y secar para obtener extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Dispersar extracto metanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extraer en éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, para obtener extracto en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo.

4. Análisis cuantitativo de ingredientes

- 35 Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 23 g de triterpenoides.

- 45 Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y calcular el contenido total de flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 103 mg de flavonoides.

50

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos

y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmol·L⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 21 g de alcaloides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir 70 % de etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y calcular el contenido total de cumarinas en la solución de ensayo de muestra (cumarinas en forma de umbeliferona). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 10,2 mg de cumarinas.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 108 mg de triterpenoides. Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y calcular el contenido total de flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 497 mg de flavonoides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmol·L⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 107 mg de alcaloides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir 70 % de etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y calcular el contenido total de cumarinas en la solución de ensayo de muestra (cumarinas en forma de umbeliferona). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 186 mg de cumarinas.

(II) Preparación de preparaciones de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

1. Preparación de comprimidos

Tomar 300 g de extracto etanólico de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: 100 g de celulosa microcristalina, 57,5 g de lactosa, 20 g de carboximetilcelulosa sódica reticulada, etc. y comprimir en comprimidos.

2. Preparación de cápsulas

Tomar extracto en acetato de etilo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: lactosa, almidón compresible, carboximetil almidón, celulosa microcristalina, etc., para preparar cápsulas.

5

3. Preparación de gránulos

Tomar extracto metanólico de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: lactosa, almidón, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, polvo de sílice, etc., para preparar gránulos.

10

4. Preparación de pomadas

Tomar extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: octadecanol, monoestearato de glicerol, glicerina, ácido esteárico, etc., para preparar pomadas.

15

5. Preparación de supositorios

Tomar extracto etanólico de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: glicéridos de ácidos grasos mixtos, PEG, cera de abejas, etc., para preparar supositorios.

20

(III) Estudios citológicos *in vitro*

1. Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre proliferación *in vitro* de linfocitos de bazo en ratones

25

1.1 Preparación de linfocitos de bazo de ratones

Tomar el bazo de ratones Kunming de forma estéril, colocarlo en una placa rellena con la cantidad apropiada de medio de cultivo RPMI1640, retirar el tejido conectivo, moler con una aguja de jeringa, filtrar a través de un tamiz de malla 200, transferir a un tubo de centrifuga, lavar con RPMI1640, recoger las células y añadir 1 ml de lisado de eritrocitos. Después de reposar a 4 °C durante 5-10 min, centrifugar a 1500 r/min durante 5 min, desechar el sobrenadante, lavar dos veces con medio RPMI1640 y por último suspender las células en 1 ml de medio completo RPMI1640. Determinar la tasa de supervivencia con azul de tripano y los resultados han demostrado que la tasa de supervivencia de las células del bazo es superior al 95 %. Diluir adecuadamente la suspensión de células de bazo anterior y ajustar la densidad celular a 2×10^6 células/ml para su uso futuro.

30

35

1.2. Efecto de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre la proliferación *in vitro* de linfocitos de bazo en ratones

En una placa de 96 pocillos, a cada pocillo, añadir 100 µl de suspensión de células de bazo de 2×10^6 células/ml. Establecer grupo blanco, grupo de control y grupos de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Para el grupo de control, a cada pocillo, añadir 100 µl de medio completo RPMI1640; para grupo de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., a cada pocillo, añadir 100 µl de solución de medio completo RPMI1640 que contiene diversas concentraciones de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.; y el grupo de blanco contiene medio solamente. Colocar la placa de 96 pocillos en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 60 h. Retirar la placa, extraer los líquidos de los pocillos, lavar tres veces con PBS, añadir 100 µl de medio de cultivo y 20 µl de tampón MTT (5 mg·ml⁻¹) y colocar en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 4 h. Retirar la placa, extraer cuidadosamente el sobrenadante, añadir 150 µl de dimetilsulfóxido, colocar la placa en un agitador de microplacas, agitar durante 10 min de manera que las partículas de formazán formadas se disuelvan totalmente y determinar la absorbancia con un lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm. Registrar los resultados y calcular la tasa de supervivencia promedio *in vitro* de células de bazo de ratón por extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., de acuerdo con la fórmula (1).

40

45

50

$$\text{Tasa de supervivencia promedio } in vitro (\%) = \frac{\text{Valor experimental del grupo A} - \text{Valor del grupo A blanco}}{\text{Valor del grupo de control A} - \text{Valor del grupo A blanco}} \times 100 \% \quad (1)$$

Los resultados han demostrado que, cuando la concentración de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. es de 0,004 mg/ml, 0,02 mg/ml y 0,2 mg/ml, la tasa de supervivencia promedio de células de bazo de ratón es del 117,85 %, el 107,21 % y el 77,46 %. Los resultados han indicado que el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de concentración baja puede promover la proliferación de células de bazo de ratón *in vitro*, mientras que el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de concentración alta inhibe la proliferación de células de bazo.

55

2. Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre la proliferación *in vitro* inducida por ConA de esplenocitos

60

En una placa de 96 pocillos, a cada pocillo, añadir 100 µl de suspensión de células de bazo de 2×10^6 células/ml.

Establecer grupo blanco, grupo de control, grupo de ConA y grupos de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Para el grupo de control, a cada pocillo, añadir 100 µl de medio completo RPMI1640; Para el grupo de ConA, a cada pocillo, añadir 100 µl de solución de medio completo RPMI1640 que contiene ConA 25 µg/ml; para grupo de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., a cada pocillo, añadir 100 µl de solución de medio completo RPMI1640 que contiene diversas concentraciones de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (la solución también contiene ConA 25 µg/ml); y el grupo de blanco contiene medio solamente. Colocar la placa de 96 pocillos en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 60 h. Retirar la placa, extraer los líquidos de los pocillos, lavar tres veces con PBS, añadir 100 µl de medio de cultivo y 20 µl de tampón MTT (5 mg·ml⁻¹) y colocar en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 4 h. Retirar la placa, extraer cuidadosamente el sobrenadante, añadir 150 µl de dimetilsulfóxido, colocar la placa en un agitador de microplacas, agitar durante 10 min de manera que las partículas de formazán formadas se disuelvan totalmente y determinar la absorbancia con un lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm. Registrar los resultados y calcular la tasa de supervivencia promedio *in vitro* de células de bazo de ratón por grupo de ConA y grupo de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., de acuerdo con la fórmula (1); Calcular la tasa de proliferación de la proliferación *in vitro* inducida por ConA de esplenocitos por extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., de acuerdo con la fórmula (2).

$$\text{Tasa de proliferación relativa (\%)} = \frac{(\text{Grupo experimental} - 1)}{\text{Grupo de control de ConA}} \times 100 \% \quad (2)$$

Los resultados han demostrado que, cuando la concentración de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. es de 0,004 mg/ml, 0,02 mg/ml y 0,2 mg/ml, la tasa de proliferación relativa para el grupo de ConA es del 15,11 %, el 5,69 % y el -14,35 %, lo que indica que el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de concentración baja puede promover la proliferación *in vitro* inducida por ConA de esplenocitos, mientras que el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de concentración alta inhibe la proliferación.

3. Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre la proliferación *in vitro* inducida por LPS de esplenocitos.

En una placa de 96 pocillos, a cada pocillo, añadir 100 µl de suspensión de células de bazo de 2×10^6 células/ml. Establecer grupo blanco, grupo de control, grupo de LPS y grupos de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Para el grupo de control, a cada pocillo, añadir 100 µl de medio completo RPMI1640; Para el grupo de LPS, a cada pocillo, añadir 100 µl de solución de medio completo RPMI1640 que contiene LPS 20 µg/ml; para grupo de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., a cada pocillo, añadir 100 µl de solución de medio completo RPMI1640 que contiene diversas concentraciones de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. (la solución también contiene LPS 20 µg/ml); y el grupo de blanco contiene medio solamente. Colocar la placa de 96 pocillos en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 60 h. Retirar la placa, extraer los líquidos de los pocillos, lavar tres veces con PBS, añadir 100 µl de medio de cultivo y 20 µl de tampón MTT (5 mg·ml⁻¹) y colocar en una incubadora a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 4 h. Retirar la placa, extraer cuidadosamente el sobrenadante, añadir 150 µl de dimetilsulfóxido, colocar la placa en un agitador de microplacas, agitar durante 10 min de manera que las partículas de formazán formadas se disuelvan totalmente y determinar la absorbancia con un lector de microplacas a una longitud de onda de 490 nm. Registrar los resultados y calcular la tasa de supervivencia promedio *in vitro* de células de bazo de ratón por grupo de LPS y grupo de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., de acuerdo con la fórmula (1); Calcular la tasa de proliferación de la proliferación *in vitro* inducida por LPS de esplenocitos por extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., de acuerdo con la fórmula (2).

Los resultados han demostrado que, cuando la concentración de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. es de 0,004 mg/ml, 0,02 mg/ml y 0,2 mg/ml, la tasa de proliferación relativa para el grupo de LPS es del 34,37 %, el 20,48 % y el -15,60 %, lo que indica que el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de concentración baja puede promover la proliferación *in vitro* inducida por LPS de esplenocitos, mientras que el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de concentración alta inhibe la proliferación, lo que es coherente con la conclusión extraída del estudio anterior de proliferación *in vitro* inducida por ConA de esplenocitos de que el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. tiene efecto inmunomodulador bidireccional.

(IV) Verificación farmacológica

1. Efecto de extractos etanólicos, metanólicos, en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo sobre la función inmunitaria no específica de ratones inmunocomprometidos (método de macrófagos peritoneales)

Tomar ratones 80 KM, dividir aleatoriamente en 8 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de suspensión (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (polisacárido de *Coriolus versicolor*), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. En todos los grupos, los ratones reciben sustancia de ensayo o suspensión a través de administración intragástrica una vez al día durante 14 días consecutivos. Excepto por el grupo de control de suspensión, los ratones de otros grupos reciben una inyección intraperitoneal de ciclofosfamida 25 mg/kg en solución

salina normal los días 8, 10 y 12 para introducir inmunosupresión. En los días 13 y 14, aplicar una inyección intraperitoneal de solución de almidón al 6 % respectivamente. 1 h después de la última administración el día 14, aplicar la inyección intraperitoneal de 1 ml de eritrocitos de pollo al 5 % en suspensión salina; 30 min después, sacrificar los ratones mediante dislocación cervical, aplicar una inyección intraperitoneal de 2 ml de solución salina y masajear suavemente el abdomen. 1 min después, cortar y abrir el abdomen, extraer 1 ml de lavados peritoneales, aplicar gotas uniformemente en dos portaobjetos, colocar en una caja húmeda e incubar a 37 °C durante 30 min. Aclarar en solución salina, secar, fijar con solución de acetona - metanol 1:1, manchar con Giemsa al 4 % (v/v)-PBS durante 3 min, aclarar con agua destilada y secar, realizar un examen microscópico y calcular el porcentaje de fagocitosis.

Tabla 14 Efecto de extractos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre fagocitosis de macrófagos peritoneales de ratones inmunocomprometidos (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Porcentaje de fagocitosis
Control de suspensión	-	0,40 $\pm$ 0,09**
Control de modelo	-	0,17 $\pm$ 0,07
Control positivo (polisacárido de <i>Coriolus versicolor</i>)	0,4 g/kg	0,36 $\pm$ 0,11**
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,1 g/kg	0,26 $\pm$ 0,08**
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	0,32 $\pm$ 0,10**
Extracto metanólico	1,2 g/kg	0,32 $\pm$ 0,11**
Extracto en éter de petróleo	1,2 g/kg	0,31 $\pm$ 0,07**
Extracto etanólico	1,2 g/kg	0,36 $\pm$ 0,11**

En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01

Los resultados se muestran en la Tabla 14. Administración intragástrica de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. 0,1 g/kg y superior durante 14 días puede mejorar significativamente la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales de ratones inmunocomprometidos y la concentración del grupo de dosis de 0,4 g/kg no muestra una diferencia significativa con la del grupo de polisacárido de *Coriolus versicolor*; 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo pueden potenciar eficazmente la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales de ratones inmunocomprometidos, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen una buena actividad de potenciación inmunitaria.

2. Efecto de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo sobre la función inmunitaria específica de ratones inmunocomprometidos (método de edema de oído inducido por nitrato de 2,4-difluorofenilo)

Tomar ratones 80 KM, dividir aleatoriamente en 8 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de suspensión (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (polisacárido de *Coriolus versicolor*), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. En todos los grupos, los ratones reciben sustancia de ensayo o suspensión a través de administración intragástrica una vez al día durante 14 días consecutivos. Excepto por el grupo de control de suspensión, los ratones de otros grupos reciben una inyección intraperitoneal de ciclofosfamida 25 mg/kg en solución salina normal los días 8, 10 y 12 para introducir inmunosupresión. El día 9 de administración, frotar 25 μ l de solución de nitrato de 2,4-difluorofenilo (DNFB) al 1 % (tomar 100 mg de DNFB, añadir a la mezcla de acetona-aceite vegetal 1:1, mezclar bien y llevar el volumen hasta 10 ml) en el abdomen de los ratones; 1 h después de la administración el día 13, frotar 10 μ l de solución de DNFB al 1 % en la oreja izquierda de los ratones; 24 horas después del frotis, es decir, 1 hora después de la última administración, sacrificar los ratones mediante dislocación cervical, pesar el oído y calcular el grado de edema del oído.

Tabla 15 Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre el edema de oído inducido por DNFB de ratones inmunocomprometidos (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Edema de oído (mg)
Control de suspensión	-	11,05 $\pm$ 1,72**
Control de modelo	-	6,06 $\pm$ 0,63
Control positivo (polisacárido de <i>Coriolus versicolor</i>)	0,4 g/kg	7,11 $\pm$ 1,73**
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,1 g/kg	7,20 $\pm$ 1,32*

(continuación)

Grupo	Dosis	Edema de oído (mg)
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	8,04 ± 1,55**
Extracto metanólico	1,2 g/kg	8,31 ± 1,45"
Extracto en éter de petróleo	1,2 g/kg	7,31 ± 1,56*
Extracto etanólico	1,2 g/kg	7,09 ± 1,06*

En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01

Los resultados se muestran en la Tabla 15. El extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. puede mejorar el edema de oído inducido por DNFB de ratones inmunocomprometidos, lo que sugiere que tiene una actividad de potenciación de la función inmunitaria celular para animales inmunocomprometidos; el efecto de 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo es similar al del extracto en acetato de etilo, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen un efecto potenciador bueno sobre la inmunidad específica de animales inmunocomprometidos.

3. Efecto de extractos etanólicos, metanólicos, en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo sobre la función inmunitaria no específica de ratones normales (método de macrófagos peritoneales)

Tomar ratones 80 KM, dividir aleatoriamente en 8 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de suspensión (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo de efecto de potenciación (polisacárido de *Coriolus versicolor*), grupo de control positivo de efecto de inhibición (Ciclofosfamida), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. Excepto por que los ratones en el grupo de control positivo de efecto de inhibición reciben una dosis de inyección subcutánea el día 13, los ratones de los otros grupos reciben sustancia de ensayo o suspensión a través de administración intragástrica una vez al día durante 14 días consecutivos. En los días 13 y 14, aplicar una inyección intraperitoneal de solución de almidón al 6 % respectivamente. 1 h después de la última administración el día 14, aplicar la inyección intraperitoneal de 1 ml de eritrocitos de pollo al 5 % en suspensión salina; 30 min después, sacrificar los ratones mediante dislocación cervical, aplicar una inyección intraperitoneal de 2 ml de solución salina y masajear suavemente el abdomen. 1 min después, cortar y abrir el abdomen, extraer 1 ml de lavados peritoneales, aplicar gotas uniformemente en dos portaobjetos, colocar en una caja húmeda e incubar a 37 °C durante 30 min. Aclarar en solución salina, secar, fijar con solución de acetona - metanol 1:1, manchar con Giemsa al 4 % (v/v)-PBS durante 3 min, aclarar con agua destilada y secar, realizar un examen microscópico y calcular el porcentaje de fagocitosis.

Tabla 16 Efecto de extractos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre fagocitosis de macrófagos peritoneales de ratones normales (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Porcentaje de fagocitosis
Control de blanco	-	0,49 ± 0,11
Control positivo de efecto de potenciación (polisacáridos de <i>Coriolus versicolor</i>)	0,4 g/kg	0,47 ± 0,19
Control positivo de efecto de inhibición (Ciclofosfamida)	0,1 g/kg	0,12 ± 0,03**
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,1 g/kg	0,41 ± 0,13
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	0,37 ± 0,08*
Extracto metanólico	1,2 g/kg	0,33 ± 0,07**
Extracto en éter de petróleo	1,2 g/kg	0,36 ± 0,12*
Extracto etanólico	1,2 g/kg	0,36 ± 0,10**

En comparación con el grupo de control de suspensión, * P <0,05, ** P <0,01

Los resultados se muestran en la Tabla 16. Administración intragástrica de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. de 0,4 g/kg durante 14 días puede mejorar la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales de ratones normales, mientras que la dosis del grupo de dosis de 0,1 g/kg no muestra un efecto evidente; 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo muestran un efecto inhibidor de diversos grados, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen un efecto inhibidor inmunitario leve sobre animales normales.

4. Efecto de extractos etanólicos, metanólicos, en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo sobre la función inmunitaria específica de ratones normales (método de edema de oído inducido por nitrato de 2,4-difluorofenilo)

Tomar ratones 80 KM, dividir aleatoriamente en 8 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de suspensión (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo de efecto de potenciación

(polisacárido de *Coriolus versicolor*), grupo de control positivo de efecto de inhibición (Ciclofosfamida), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. Excepto por que los ratones en el grupo de control positivo de efecto de inhibición reciben una dosis de inyección subcutánea el día 13, los ratones de los otros grupos reciben sustancia de ensayo o suspensión a través de administración intragástrica una vez al día durante 14 días consecutivos. El día 9 de administración, frotar 25 µl de solución de nitrato de 2,4-difluorofenilo (DNFB) al 1 % (tomar 100 mg de DNFB, añadir a la mezcla de acetona-aceite vegetal 1:1, mezclar bien y llevar el volumen hasta 10 ml) en el abdomen de los ratones; 1 h después de la administración el día 13, frotar 10 µl de solución de DNFB al 1 % en la oreja izquierda de los ratones; 24 horas después del frotis, es decir, 1 hora después de la última administración, sacrificar los ratones mediante dislocación cervical, pesar el oído y calcular el grado de edema del oído.

Tabla 17 Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre el edema de oído inducido por DNFB de ratones normales (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Edema de oído (mg)
Control de suspensión	-	10,78 ± 1,19
Control de modelo	0,4 g/kg	10,59 ± 1,33
Control positivo (polisacárido de <i>Coriolus versicolor</i>)	0,1 g/kg	5,66 ± 0,72**
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,1 g/kg	9,54 ± 1,21*
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	7,28 ± 0,98**
Extracto metanólico	1,2 g/kg	7,15 ± 1,17**
Extracto en éter de petróleo	1,2 g/kg	9,12 ± 1,34"
Extracto etanólico	1,2 g/kg	8,52 ± 1,63"

En comparación con el grupo de control de suspensión, *P<0,05, **P<0,01

Los resultados se muestran en la Tabla 17. 0,1 g/kg de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. puede inhibir el edema del oído inducido por DNFB de ratones normales, lo que sugiere que tiene cierto efecto inhibidor de la función inmunitaria celular en animales normales; el efecto de 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo es similar al del extracto en acetato de etilo, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen cierto efecto inhibidor inmunitario específico.

5. El efecto terapéutico sobre lupus experimental en ratones y efecto sobre la inmunidad celular de extractos etanólicos, metanólicos, en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo

Tomar ratones 80 KM, dividir aleatoriamente en 8 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de suspensión (mucilago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control de modelo (mucilago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (glucósidos de *Tripterygium*), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. Excepto por el grupo de control de suspensión, los ratones de otros grupos reciben una inyección intraperitoneal de 0,5 ml/cuerpo de pristina y sustancia o suspensión de ensayo a través de administración intragástrica una vez al día durante 30 días consecutivos. 24 h después de la última administración, extraer 20 µl de sangre orbital, centrifugar a 4 °C para separar el suero y determinar el nivel de anticuerpos anti-ADNbc en suero mediante ELISA.

Tomar otro grupo de animales, agruparlos de la misma manera y reproducir el modelo. El día 24 después de la inyección de pristano, excepto por el grupo de control de suspensión, los ratones en otros grupos reciben una inyección intraperitoneal de 0,2 ml/cuerpo de eritrocitos de pollo al 5 % en suspensión salina, continuar la administración del fármaco hasta el día 30 después de la inyección de pristina. 24 h después de la última administración, extraer 20 µl de sangre orbital, añadir 1 ml de solución salina, después 0,5 ml de eritrocitos de pollo al 4 % en suspensión salina y 0,5 ml de suero de cobaya al 10 % respectivamente, después de mezclar, incubar a 37 °C durante 0,5 h, centrifugar a 3000 rpm durante 10 min, extraer 1 ml del sobrenadante, añadir 3 ml de reactivo de Drabkin y realizar una colorimetría a 540 nm.

Tabla 18 Efecto del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre lupus experimental en ratones (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Contenido de ADNbc en suero (DO)	Hemolisina (DO x 10 ⁻¹)
Control de suspensión	-	0,26 ± 0,028**	1,70 ± 0,19**
Control de modelo	0,4 g/kg	2,56 ± 0,381	2,52 ± 0,29

(continuación)

Grupo	Dosis	Contenido de ADNbc en suero (DO)	Hemolisina (DO x 10 ⁻¹)
Control positivo (glucósidos de <i>Tripterygium</i>)	0,03 g/kg	1,63 ± 0,101**	0,82 ± 0,17**
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,1 g/kg	2,23 ± 0,285	2,09 ± 0,31*
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	2,08 ± 0,452*	1,82 ± 0,26**
Extracto metanólico	1,2 g/kg	2,25 ± 0,309	2,00 ± 0,24**
Extracto en éter de petróleo	1,2 g/kg	2,10 ± 0,347*	2,12 ± 0,25*
Extracto etanólico	1,2 g/kg	2,11 ± 0,251*	2,04 ± 0,30**

En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01

Los resultados se muestran en la Tabla 18. 0,4 g/kg de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. pueden reducir eficazmente el nivel de anticuerpos contra ADNbc en suero de ratones con lupus experimental, lo que sugiere que puede usarse para tratar el lupus; el efecto de 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo es similar al del extracto en acetato de etilo, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen algunos efectos sobre el lupus. El lupus puede manifestarse como una inmunidad humoral anormalmente elevada y, en el estudio, el nivel de hemolisina en los animales modelo es significativamente más alto que el de los animales normales y 0,1 g/kg de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. puede reducir eficazmente dicho nivel de hemolisina anormalmente elevado y 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo son similares al extracto en acetato de etilo, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen un efecto inhibitor significativo sobre el hipertiroidismo inmunitario anormal.

VI. Tratamiento de inflamación y úlcera oral y gastrointestinal mediante extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

(I) Preparación de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

1. Preparación de extracto etanólico de planta entera

Tomar 1 kg de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 8 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, remojar durante 2 días, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 50 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

2. Preparación de extractos etanólicos, en éter de petróleo y en acetato de etilo de tallos y hojas

Tomar 1 kg de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir etanol al 95 % a 10 veces el peso para la extracción por reflujo, recoger el extracto líquido, recuperar el etanol a 60 °C a presión reducida hasta que no haya olor a etanol y secar para obtener extracto etanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Dispersar extracto etanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extraer con éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, para obtener extracto en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo.

3. Preparación de extractos en éter de petróleo y en acetato de etilo de planta entera

Tomar 1 kg de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir metanol a 10 veces el peso, remojar durante un día, después triturar, añadir metanol a 8 veces el peso, remojar durante 2 días, recoger el extracto líquido, recuperar el metanol a 40 °C a presión reducida y secar para obtener extracto metanólico de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. Dispersar extracto metanólico en agua de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y extraer en éter de petróleo y acetato de etilo en secuencia, para obtener extracto en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo.

4. Análisis cuantitativo de ingredientes

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 23 g de triterpenoides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y calcular el contenido total de flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 103 mg de flavonoides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmol L⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 21 g de alcaloides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir 70 % de etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y calcular el contenido total de cumarinas en la solución de ensayo de muestra (cumarinas en forma de umbeliferona). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 10,2 mg de cumarinas.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., colocar en matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, después pipetear con precisión 4 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml. Después de evaporar el disolvente, añadir 0,4 ml de vanilina al 5 % - ácido acético glacial, 1,6 ml de ácido perclórico, mezclar bien, diluir con acetato de etilo hasta la marca, colocar en un baño de agua a 70 °C durante 15 minutos, enfriar a temperatura ambiente, transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir acetato de etilo hasta la marca, agitar bien, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm y calcular el contenido total de triterpenoides en la solución de ensayo de muestra (triterpenoides en forma de ácido ceanótico). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 108 g de triterpenoides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir agua hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm y calcular el contenido total de flavonoides en la solución de ensayo de muestra (flavonoides en forma de rutina). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 497 mg de flavonoides totales.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces Erlenmeyer tapados, remojar en 2 ml de amoníaco al 18 % durante 1 hora, añadir 30 ml de disolvente mixto de éter 2-cloroformo 2-etanol (25:8:2,5), extraer con ultrasonido durante 20 minutos y verter el sobrenadante en un matraz cónico pequeño, después añadir 30 ml del disolvente mixto anterior, remojar en frío durante media hora, después extraer con ultrasonido durante 20 min, filtrar, lavar los residuos y el papel de filtro con 15 ml del mismo disolvente en tres veces, combinar los filtrados en un matraz cónico, evaporar en un baño de agua a 60 °C, añadir con precisión 10 ml de cloroformo para la disolución completa, pipetear con precisión 5 ml, transferir a un embudo de separación pequeño y añadir 6 ml de cloroformo y 2 ml de tampón (pH = 5,0, tampón de hidrógeno ftalato de potasio 0,2 M). Valorar con solución de azul de bromotimol 1 mmol-L⁻¹ y continuar agitando; cuando se acerque el final, separar la capa de cloroformo, añadir 5 ml de cloroformo recién preparado, continuar con la valoración y la agitación, dejar reposar y separar las capas, hasta que la capa acuosa se vea de color ligeramente amarillo. Calcular el contenido total de alcaloides en la solución de ensayo de muestra (alcaloides en forma de paliurina B). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 107 mg de alcaloides.

Tomar tres porciones de 0,1 g de extracto en acetato de etilo de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., pesar con precisión, colocar en matraces volumétricos de 50 ml, añadir la cantidad apropiada de etanol, disolver con ultrasonido, enfriar, añadir etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 1 ml y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, añadir 70 % de etanol hasta la marca y agitar bien. Pipetear con precisión 3 ml y transferir a

matraces volumétricos de 25 ml, determinar la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm y calcular el contenido total de cumarinas en la solución de ensayo de muestra (cumarinas en forma de umbeliferona). El cálculo ha demostrado que 1 g de extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. contiene 186 mg de cumarinas.

5 (II) Preparación de preparaciones de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

1. Preparación de comprimidos

10 Tomar 300 g de extracto etanólico de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: 100 g de celulosa microcristalina, 57,5 g de lactosa, 20 g de carboximetilcelulosa sódica reticulada, etc. y comprimir en comprimidos.

2. Preparación de cápsulas

15 Tomar extracto en acetato de etilo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: lactosa, almidón compresible, carboximetil almidón, celulosa microcristalina, etc., para preparar cápsulas.

3. Preparación de gránulos

20 Tomar extracto metanólico de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: lactosa, almidón, metilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, polivinilpirrolidona, polvo de sílice, etc., para preparar gránulos.

25 4. Preparación de pomadas

Tomar extracto en éter de petróleo de tallos y hojas de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: octadecanol, monoestearato de glicerol, glicerina, ácido esteárico, etc., para preparar pomadas.

30 5. Preparación de supositorios

Tomar extracto etanólico de planta entera de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., añadir un excipiente adecuado, tal como: glicéridos de ácidos grasos mixtos, PEG, cera de abejas, etc., para preparar supositorios.

35 (III) Verificación farmacológica de los usos del extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir.

1. Efecto extractos etanólicos, metanólicos, en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo sobre la úlcera gástrica experimental inducida por ligadura pilórica en ratas

40 Tomar 80 ratones SD, dividir aleatoriamente en 8 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de modelo (mucilago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (ranitidina), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis media de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. En todos los grupos, los ratones reciben sustancia de ensayo a través de administración intragástrica una vez al día durante 3 días consecutivos. 1 h después de la última administración, realizar la ligadura pilórica, 15 horas después de la cirugía, sacrificar los animales mediante dislocación cervical, retirar el estómago, fijar con formaldehído al 1 % durante 20 min, después diseccionar, observar la extensión del daño de la mucosa con un microscopio estereoscópico y calcular el índice de úlcera y la tasa de inhibición de la úlcera.

50 Tabla 19 Efecto de los extractos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre la úlcera gástrica experimental inducida mediante ligadura pilórica en ratas (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Índice de úlcera	Tasa de inhibición (%)
Control de modelo	-	4,7 ± 1,7	-
Control positivo (ranitidina)	60 mg/kg	1,5 ± 0,4**	68,1
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,1 g/kg	3,7 ± 1,4	21,3
Dosis media de extracto en acetato de etilo	0,2 g/kg	2,8 ± 0,7*	40,4
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	2,0 ± 1,0**	57,4
Extracto metanólico	1,2 g/kg	1,9 ± 0,6**	59,6
Extracto en éter de petróleo	1,2 g/kg	2,0 ± 0,6**	57,4
Extracto etanólico	1,2 g/kg	2,2 ± 0,8**	53,2

En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01

Los resultados se muestran en la Tabla 19. La administración intragástrica de 0,2 g/kg y dosis más altas de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. 3 veces puede inhibir significativamente el grado de úlceras gástricas inducidas por ligadura pilórica en ratas y la concentración del grupo de dosis de 0,4 g/kg no tiene una diferencia significativa con la del grupo de ranitidina 60 mg/kg; 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo también pueden inhibir eficazmente el grado de la úlcera, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen un efecto antiulceroso bueno.

2. Efecto de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo sobre la colitis inducida por ácido 2,4,6-trinitrotoluenosulfónico (TNBS) en ratas

Tomar 90 ratones SD, dividir aleatoriamente en 9 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de operación simulada (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (dexametasona), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis media de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. Después de que los animales estén en ayunas durante 24 h, anestesiarse con pentobarbital sódico. Excepto en el grupo de operación simulada, realizar coloclisis con TNBS y etanol al 40 %, y replicar el modelo experimental de colitis; 6 h después de la construcción del modelo, administrar la sustancia de ensayo. El día 5 de la administración, extraer sangre de la vena de la cola y contar los leucocitos. El día 6, anestesiarse con uretano, extraer sangre aórtica abdominal y sacrificar los animales mediante dislocación cervical. Corte 9 cm de colon desde el ano, en un baño de hielo, corte el intestino a lo largo del borde mesentérico, lavar el contenido, medir el área de la úlcera, calcular el porcentaje del área de la úlcera; pesar el colon, desechar la mucosa del colon y determinar la concentración de factor de necrosis tumoral (TNF- α) con el método ELISA.

Tabla 20 Efecto de los extractos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre colitis experimental inducida por TNBS en ratas (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Recuento de leucocitos (10 ⁹ /l)	Relación del área de la úlcera (%)	TNF- α (ng/gpro)
Operación simulada	-	17,5 $\pm$ 1,2**	5,0 $\pm$ 2,3**	28,1 $\pm$ 5,0**
Control de modelo	-	22,9 $\pm$ 1,1	42,3 $\pm$ 13,8	234,9 $\pm$ 67,3
Control positivo (dexametasona)	2 mg/kg	8,4 $\pm$ 0,9**	28,6 $\pm$ 10,5*	73,2 $\pm$ 19,6**
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,1 g/kg	21,5 $\pm$ 1,9	32,7 $\pm$ 12,1	189,6 $\pm$ 52,7
Dosis media de extracto en acetato de etilo	0,2 g/kg	18,6 $\pm$ 1,1**	27,9 $\pm$ 15,3*	137,3 $\pm$ 45,9**
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	18,2 $\pm$ 0,8**	20,4 $\pm$ 9,3**	102,8 $\pm$ 37,5**
Extracto metanólico	1,2 g/kg	18,6 $\pm$ 0,6**	18,8 $\pm$ 8,0**	132,7 $\pm$ 39,9**
Extracto en éter de petróleo	1,2 g/kg	18,0 $\pm$ 0,9**	25,3 $\pm$ 6,8**	169,0 $\pm$ 78,3*
Extracto etanólico	1,2 g/kg	18,5 $\pm$ 0,12**	23,8 $\pm$ 10,6**	121,6 $\pm$ 44,0**

En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01

Los resultados se muestran en la Tabla 21. La colitis experimental inducida por TNBS en ratas puede manifestarse como células inflamatorias aumentadas, niveles aumentados de citocinas inflamatorias y úlceras en la superficie del colon. 0,2 g/kg y dosis más altas de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. pueden inhibir el aumento de leucocitos y citocinas proinflamatorias TNF- α y reducir la formación de úlceras; el efecto de 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo es similar al del extracto en acetato de etilo, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen un efecto anticolitis bueno.

3. Efecto de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo y extracto en acetato de etilo sobre la gastritis crónica inducida por amoníaco en ratas

Tomar 120 ratones SD, dividir aleatoriamente en 10 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control normal (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (partícula de Sanjiuweitai), grupo de dosis baja de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis media de extracto en acetato de etilo, grupo de dosis alta de extracto en acetato de etilo, grupo de extracto etanólico, grupo de extracto metanólico y grupo de extracto en éter de petróleo. Todos los animales reciben una administración intragástrica de amoníaco al 0,02 % una vez al día durante 90 días consecutivos; paralelamente, los animales reciben una administración intragástrica de sustancia de ensayo una vez al día durante 90 días consecutivos. Al día siguiente después de la última administración del fármaco, sacrificar los animales mediante dislocación cervical, tomar la pared estomacal de la curvatura menor, fijar con formol al 10 %, incrustar en parafina, realizar cortes seriados, teñir con HE y PAS. En el corte de tinción con HE, observar las reacciones inflamatorias y puntuar, y medir el espesor de la mucosa del cuerpo gástrico; en el corte de tinción con PAS, medir el espesor de la capa positiva y la capa de moco característica.

Tabla 21 Efecto de extractos de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. sobre la gastritis crónica experimental inducida por amoníaco en ratas (n = 12, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Puntuación de inflamación	Espesor de la capa mucosa (mmx10 ⁻¹)	Espesor de la capa de moco (mmx10 ⁻²)
Control normal	-	0,20 ± 0,12**	5,13 ± 0,62**	9,60 ± 2,56**
Control de modelo	-	3,23 ± 1,04	3,18 ± 0,54	3,28 ± 0,69
Control positivo (partícula de Sanjiuweitai)	0,5 g/kg	1,56 ± 0,75**	3,51 ± 0,48	6,72 ± 1,93**
Dosis baja de extracto en acetato de etilo	0,1 g/kg	2,07 ± 1,12*	3,29 ± 0,47	6,08 ± 1,71**
Dosis media de extracto en acetato de etilo	0,2 g/kg	1,62 ± 0,63**	3,72 ± 0,83	7,29 ± 2,05**
Dosis alta de extracto en acetato de etilo	0,4 g/kg	1,08 ± 0,55**	4,67 ± 1,04**	7,38 ± 1,36**
Aplicación combinada	Extracto en acetato de etilo 0,2 g/kg + Sanjiuweitai 0,5 g/kg	1,45 ± 0,69**	4,28 ± 0,61**#	7,33 ± 1,59**
Extracto metanólico	1,2 g/kg	1,58 ± 0,69**	4,75 ± 1,00**	7,12 ± 1,15**
Extracto en éter de petróleo	1,2 g/kg	1,39 ± 0,47**	4,44 ± 0,86**	6,33 ± 0,92**
Extracto etanólico	1,2 g/kg	1,28 ± 0,48**	4,38 ± 0,96**	7,05 ± 1,14**

En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01; En comparación con el grupo de control positivo (grupo de partículas de Sanjiuweitai), # P <0,05.

5 Los resultados se muestran en la Tabla 21. Para la gastritis crónica experimental inducida por amoníaco, el extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. tiene efectos en la inhibición de la inflamación y el aumento del espesor de la capa mucosa y la capa de moco, especialmente en la inhibición de la inflamación y el aumento del espesor de la capa de moco; el efecto de 1,2 g/kg de extractos etanólicos, metanólicos y en éter de petróleo es similar al del extracto en acetato de etilo, lo que sugiere que los cuatro extractos tienen un efecto bueno contra la gastritis crónica.

10 4. Efecto del extracto en acetato de etilo en combinación con Sanjiuweitai sobre la úlcera gástrica experimental inducida por ligadura pilórica en ratas

15 Tomar 50 ratones SD, dividir aleatoriamente en 5 grupos con estratificación del peso corporal, a saber, grupo de control de modelo (mucílago de tragacanto al 0,5 %), grupo de control positivo (ranitidina), grupo de extracto en acetato de etilo, grupo de partículas de Sanjiuweitai y grupo de aplicación combinada. En todos los grupos, los ratones reciben sustancia de ensayo a través de administración intragástrica una vez al día durante 3 días consecutivos. 1 h después de la última administración, realizar la ligadura pilórica, 15 horas después de la cirugía, sacrificar los animales mediante dislocación cervical, retirar el estómago, fijar con formaldehído al 1 % durante 20 min, después diseccionar, observar

20 la extensión del daño de la mucosa con un microscopio estereoscópico y calcular el índice de úlcera y la tasa de inhibición de la úlcera.

25 Tabla 22 Efecto del extracto en acetato de etilo en combinación con Sanjiuweitai sobre la úlcera gástrica experimental inducida por ligadura pilórica en ratas (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Grupo	Dosis	Índice de úlcera	Tasa de inhibición de la úlcera (%)
Control de modelo	-	4,5 ± 1,3	-
Control positivo (ranitidina)	60 mg/kg	1,8 ± 0,6**	60,0
Extracto en acetato de etilo	0,2 g/kg	3,0 ± 0,9*	33,3
Partícula de Sanjiuweitai	1 g/kg	4,2 ± 1,7	6,7
Aplicación combinada	Extracto en acetato de etilo 0,2 g/kg + Sanjiuweitai 1 g/kg	2,7 ± 1,1**##	40,0

(continuación)

Grupo	Dosis	Índice de úlcera	Tasa de inhibición de la úlcera (%)
En comparación con el grupo de control de modelo, *P<0,05, **P<0,01; En comparación con el grupo de partículas de Sanjiuweitai, #P<0,05, ##P<0,01.			

Los resultados se muestran en la Tabla 22. La administración intragástrica de extracto en acetato de etilo de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. 0,2 g/kg tres veces puede inhibir significativamente el grado de úlceras gástricas inducidas por ligadura pilórica en ratas; Sanjiuweitai solo no tiene efecto en el modelo, pero cuando se aplica en combinación con el extracto de la presente invención, puede potenciar significativamente la eficacia antiulcerosa, lo que sugiere que tiene un efecto sinérgico con fármacos antiulcerosos o combinaciones de fármacos.

5. Efecto del extracto en acetato de etilo en combinación con Sanjiuweitai sobre la gastritis crónica experimental inducida por amoníaco en ratas

Este experimento se realiza con el experimento farmacodinámico 2 y los resultados se muestran en la Tabla 21, con grupo de control normal compartido y grupo de control de modelo. Los resultados han demostrado que Sanjiuweitai puede aumentar significativamente el espesor de la capa de moco, reducir la inflamación, pero no tiene un efecto significativo sobre el espesor de la capa mucosa. Y la combinación con el extracto de la presente invención puede potenciar los efectos de Sanjiuweitai y también aumentar eficazmente el espesor de la capa mucosa, lo que sugiere que tiene un efecto sinérgico con fármacos para la gastritis crónica o combinaciones de fármacos.

En resumen, el extracto de *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir. y la materia prima farmacológica, *Paliurus ramosissimus* (Lour.) Poir., tienen actividad antitumoral significativa, actividad antifúngica, actividad antifibrótica y efectos inmunomoduladores bidireccionales, así como efectos en el tratamiento de la úlcera y/o la inflamación oral y gastrointestinal.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. solo para su uso en el tratamiento de tumores, inflamación del tracto digestivo y/o úlcera.
2. Extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. comprende flavonoides, triterpenoides, alcaloides y cumarinas.
3. Un método para la preparación de un extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, seleccionado entre el Método de Preparación I o el Método de Preparación II en donde el Método de Preparación I comprende las siguientes etapas:
 - A, proporcionar la totalidad o cualquier parte de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima para la extracción; y,
 - B, extraer las materias primas con un disolvente y secar el material extraído; yel Método de Preparación II comprende las siguientes etapas:
 - A, proporcionar la totalidad o cualquier parte de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. como materia prima para la extracción;
 - B, extraer las materias primas con un disolvente 'a' y concentrar la solución extraída para obtener el concentrado, y;
 - C, extraer el concentrado obtenido en la etapa B con el disolvente 'b' y secar; osecar el concentrado obtenido en la Etapa B antes de extraerlo con el disolvente 'b' y secar; en donde el disolvente 'a' mencionado en la Etapa B es metanol, etanol, isopropanol; preferentemente, metanol o etanol; el disolvente 'b' mencionado en la Etapa C es acetato de etilo o éter de petróleo.
4. Extracto seco de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. preparado mediante el método de preparación de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el extracto comprende triterpenoides, flavonoides, alcaloides y cumarinas.
6. El extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. de acuerdo con la Reivindicación 5, en donde el extracto comprende: triterpenoides al 2 %-10,8 %, flavonoides al 10 %-49,7 %, alcaloides al 2 %-10,7 % y cumarinas al 1 %-18,6 %.
7. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de tumores, en donde la composición farmacéutica comprende extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 6 como el principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la úlcera y/o inflamación del tracto digestivo, en donde la composición farmacéutica comprende extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 6 como el principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en donde el extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. se prepara mediante un método que comprende extraer la planta entera o cualquiera de entre las raíces, tallos, hojas, flores, frutos o la mezcla de ellos con un disolvente orgánico.
10. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de tumores en donde la composición farmacéutica comprende un principio activo que comprende extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la úlcera y/o inflamación del tracto digestivo en donde la composición farmacéutica comprende un principio activo que comprende extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11, en donde el extracto de *Paliurus Ramosissimus* (Lour.) Poir. se prepara mediante un método que comprende extraer la planta entera o cualquiera de entre las raíces, tallos, hojas, flores, frutos o la mezcla de ellos con un disolvente orgánico.