



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto
hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana*
("Cardo santo")**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica

AUTOR

Heydee Lisbet DIAZ MARTINEZ

ASESOR

Luis Alberto ROJAS RÍOS

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

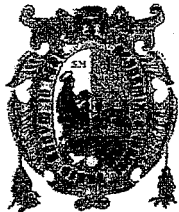
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Diaz H. Actividad antiinflamatoria y antioxidante del extracto hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana* (“Cardo santo”) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2016.

1129



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
 (Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
DECANATO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**“ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO
 HIDROALCOHÓLICO DEL LATEX DE *Argemone mexicana* (“Cardo santo”)”**

114

7 (anexos)

Que presenta la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

HEYDEE LISBET DIAZ MARTINEZ

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación ha obtenido la siguiente calificación:

SOBRESALIENTE (17)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de la Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

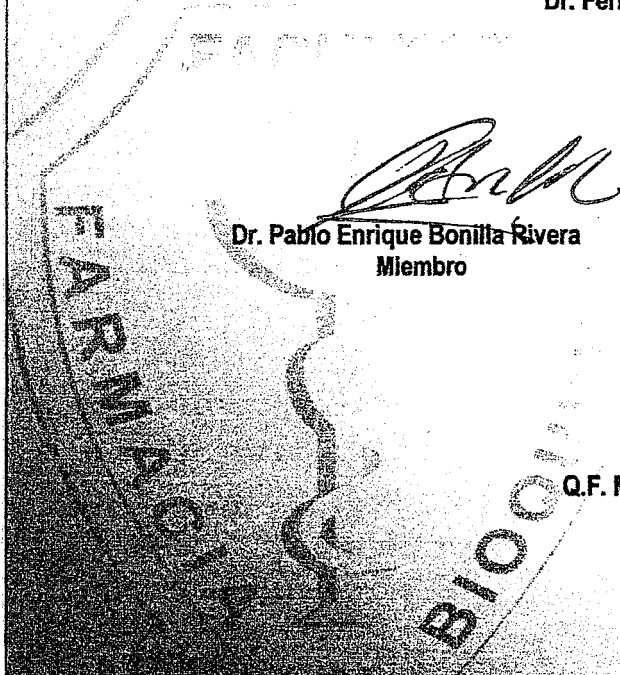
Lima, 07 de setiembre del 2016

Dr. Fernando Gilbert Quevedo Ganoza
Presidente

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Miembro

Mg. Norma Angélica Carlos Casas
Miembro

Q.F. María Rosario Carreño Quispe
Miembro



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Dr. Pablo N. Ruiz Jardín Bonilla - Lima 1 - Perú
 Teléfono: (51) 1 428 4737 / 428 4739 FAX: (51) 1 428 7890 anexo 4819 - Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: decanato@unmsm.edu.pe - http://farmacia.unmsm.edu.pe



DEDICATORIA

Agradezco a Dios por
permitirme
realizar esta tesis, brindándome la fortaleza y
perseverancia para poder concretar uno de mis sueños.

A mi familia fuente de apoyo emocional
constante durante toda mi vida y más aún en
momentos en que perdía la fe, a mi padre
por los valores y principios inculcados que
hoy rigen mi vida, a mi madre por su infinita
comprensión, apoyo y amor, a mi hermanito
por sus preguntas, juegos y por creer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del VRI-UNMSM y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por el financiamiento recibido.

(Código N.º 140401057)

A mi asesor Dr. Luis Alberto Rojas Ríos, por su orientación, su paciencia, motivación y confianza en la realización de esta tesis.

A la Dra Bertha Jurado Texeira y a la Dra Eva Ramos Llica, por su apoyo y orientación.

A cada una de las personas por el apoyo brindado en las distintas etapas de este trabajo.

“Cada gran sueño comienza con un soñador. Recuerda siempre que tú tienes en tu interior la fuerza, la paciencia y la pasión para alcanzar las estrellas, para cambiar el mundo”.

Harriet Tubman

“La mayor gloria en la vida no consiste en no caer, sino en levantarnos cada vez que caemos”

Nelson Mandela

“Sé el cambio que quieres ver en el mundo “

Mahatma Gandhi

ABREVIATURAS

IL: Interleuquina.

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

TNF β : Factor de Necrosis Tumoral Beta.

MEC: Matriz Extracelular.

NO: Óxido Nítrico.

RLO: Radicales Libres de Oxígeno.

ICAM: Molécula de Adhesión intercelular.

PECAM: Moléculas de Adhesión a las células endoteliales de las plaquetas.

LPS: Lipopolisacárido

C3b: Componente del Complemento 3

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

MPO: Mieloperoxidasa

PG: Prostaglandina

TX: Tromboxano

COX: Ciclooxygenasa

PLA₂: Fosfolipasa A₂

AA: Ácido Araquidónico

EROS: Especies Reactivas de Oxígeno

LT: Leucotrieno

GPx: Glutatión peroxidasa dependiente de Selenio.

SOD: Superóxido dismutasa.

DPPH: 2,2-difenil-1-picril hidrazilo

DL50: Dosis letal media

RL: Radical Libre

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	15
HIPÓTESIS	16
I. GENERALIDADES	17
1.1. Antecedentes referentes a la especie	17
1.1.1. Taxonomía	17
1.1.2. Descripción botánica	18
1.1.3. Distribución geográfica	19
1.1.4. Antecedentes etnobotánicos y etnofarmacológicos	20
1.1.5. Investigaciones fitoquímicas	22
1.1.6. Actividad biológica	22
1.2. Inflamación	23
1.2.1. Inflamación aguda	24
1.2.1.1. Etapas de la inflamación aguda	26
1.2.1.1.1. Acontecimientos vasculares	26
1.2.1.1.2. Acontecimientos celulares	26
1.2.1.1.3. Eliminación de agentes lesivos	29
1.2.1.1.4. Destrucción y degradación	30
1.2.1.1.5. Evolución de la inflamación aguda	31
1.2.2. Mediadores de origen celular	32
1.2.2.1. Histamina y Serotonina	32
1.2.2.2. Metabolitos del Ácido araquidónico	33
1.2.2.2.1. Vía de la Ciclooxygenasa	33
1.2.2.2.2. Vía de la Lipooxygenasa.	34
1.2.2.2.3. Factor activado de plaquetas	35
1.2.2.2.4. Citocinas	35
1.2.2.2.5. Quimiocinas	35
1.2.2.2.6. Óxido nítrico	35
1.2.3. Mediadores derivados de las proteínas plasmáticas	36
1.2.3.1. Proteínas de complemento	36
1.2.3.2. Proteínas de coagulación	36
1.2.3.3. Sistema de cininas	37

1.2.4. Fármacos Antiinflamatorios	37
1.2.4.1. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos	37
1.2.4.1.1. Estructura de la ciclooxigenasa: COX -1 y COX -2	37
1.2.4.1.2. Inhibición irreversible de la ciclooxigenasa por el Ácido acetilsalicílico	40
1.2.4.1.3. Inhibición selectiva de la COX -2	41
1.2.4.1.4. Derivados del ácido acético: Diclofenaco	41
1.2.4.2. Antiinflamatorios Esteroideos	43
1.2.4.2.1. Dexametasona	44
1.3. Estrés oxidativo	45
1.3.1. Radicales libres	46
1.3.1.1. Especies reactivas de oxígeno	46
1.3.1.2. Especies reactivas de nitrógeno	48
1.3.2. Fuentes biológicas de radicales libres	48
1.3.3. Toxicidad de los radicales libres	49
1.3.4. Sistema de defensa antioxidante	50
1.3.5. Enfermedades por estrés oxidativo	51
1.4. Flavonoides	53
1.4.1. Propiedades medicinales de los flavonoides	54
1.4.2. Tipos de flavonoides	55
1.4.2.1. Flavonas	55
1.4.2.2. Flavonoles	56
1.4.3. Actividad antioxidante de los flavonoides	56
II. PARTE EXPERIMENTAL	58
2.1 Materiales, equipos y reactivos	58
2.1.1 Instalaciones	58
2.1.2 Materiales	58
2.1.2.1 Muestra vegetal	58
2.1.2.2 Animales de experimentación	58
2.1.2.3 Fármacos y otros	59
2.1.2.4 Material de laboratorio	59
2.1.3 Equipos	59
2.1.4 Solventes y reactivos	60
2.2 Metodología	60
2.2.1 Identificación botánica y taxonómica	60
2.2.2 Obtención de la muestra	61
2.2.3 Preparación del extracto hidroalcohólico de látex de Argemone mexicana	61

2.2.4 Estudio Farmacognóstico	61
2.2.4.1 Marcha de solubilidad	61
2.2.4.2 Marcha Fitoquímica	62
2.2.4.3 Análisis cromatográfico	63
2.2.4.4 Análisis cuantitativo de Flavonoides por espectrofotometría UV-V	65
2.2.4.5 Determinación de la actividad antirradical libre por el método del DPPH	66
2.2.5 Ensayos Farmacológicos	68
2.2.5.1 Determinación de la toxicidad aguda por el método de dosis límite	68
2.2.5.2 Test de Irritación Ocular	69
2.2.5.3 Determinación de la actividad antiinflamatoria	70
2.2.5.3.1 Fundamento del método del edema pedal inflamatorio inducido por carragenina	70
2.2.5.3.2 Técnica para la medición con el Pletismómetro digital LE7500	71
2.2.5.3.3 Ensayo de actividad antiinflamatoria	73
2.2.5.3.4 Eficacia antiinflamatoria	74
2.3 Análisis Estadístico	74
III. RESULTADOS	76
IV. DISCUSIÓN	100
V. CONCLUSIONES	105
VI. RECOMENDACIONES	106
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
VIII. ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

	Página
Tablas	
Tabla N° 1. Esquema de trabajo con el DPPH y la muestra, previo a las lecturas al espectrofotómetro.	67
Tabla N° 2. Dosis administrada para la prueba de DL50	69
Tabla N° 3. Diseño experimental para el edema pedal inducido.	73
Tabla N°4. Marcha de solubilidad del extracto hidroalcohólico de látex de <i>Argemone mexicana</i> ("Cardo santo")	76
Tabla N°5. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de látex de <i>Argemone mexicana</i> ("Cardo santo").	77
Tabla N°6. Análisis de las bandas cromatográficas en papel eluidas con metanol y características espectrofotométricas UV/ Visible	78
Tabla N°7. Resultados de la Cuantificación de Flavonoides del extracto hidroalcohólico de látex de <i>Argemone mexicana</i>	78
Tabla N°8. Capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de látex de <i>Argemone mexicana</i>	79
Tabla N°9. Porcentaje de captación de radical libre del extracto hidroalcohólico de látex de <i>Argemone mexicana</i>	79
Tabla N°10. Resultados de la determinación de la Toxicidad aguda DL50 del extracto hidroalcohólico de látex de <i>Argemone mexicana</i>	80
Tabla N°11. Grado de lesiones oculares del extracto hidroalcohólico de látex de <i>Argemone mexicana</i>	81
Tabla N°12. Clasificación de las sustancias según su irritabilidad oftálmica (OECD)	81
Tabla N° 13. Actividad antiinflamatoria según tratamientos a la hora	89
Tabla N° 14. Actividad antiinflamatoria según tratamientos a la hora y media	89
Tabla N° 15. Actividad antiinflamatoria según tratamientos a las dos horas	90
Tabla N° 16. Actividad antiinflamatoria según tratamientos a las tres horas	91
Tabla N° 17. Actividad antiinflamatoria según tratamientos a las cuatro horas	92
Tabla N° 18. Actividad antiinflamatoria según tratamientos a las cinco horas	93
Tabla N° 19. Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a la hora	94
Tabla N° 20. Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a la hora y media	94
Tabla N° 21. Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a las dos horas	95

Tabla N° 22. Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a las tres horas	96
Tabla N° 23. Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a las cuatro horas	97
Tabla N° 24. Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a las cinco horas	98

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
Fig. 1. Planta de <i>Argemone mexicana</i>	17
Fig. 2. Resolución de inflamación	25
Fig. 3. Fenómenos celulares característicos de la inflamación.	27
Fig. 4. Receptores de leucocitos y sus respuestas	29
Fig. 5. Evolución de la inflamación aguda.	32
Fig. 6. Biosíntesis de la histamina.	32
Fig. 7. Generación de metabolitos del ácido araquidónico	34
Fig. 8. Estructura de la ciclooxigenasa 1 y 2	39
Fig. 9. Representación esquemática de la acción de los antiinflamatorios no esteroideos.	40
Fig. 10. Especies reactivas de oxígeno	47
Fig. 11. Estrés oxidativo en el Pterigium	52
Fig. 12. Radiación ultravioleta y Pterigium	52
Fig. 13. Estructura de un Flavonoide	53
Fig. 14. Tipos de Flavonoides	55
Fig. 15. Reacción del 2,2 – Difenil – 1 - Picrilhidrazilo	66
Fig. 16. Estructura de Carragenina lambda	70
Fig. 17. Pletismómetro Digital LE7500	72
Fig. 18. Capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de látex de <i>A. mexicana</i>	80
Fig. 19. Curva de Eficacia Antiinflamatoria de estándares vs Grupo Control	82
Fig. 20. Curva de Eficacia Antiinflamatoria del Extracto 200 mg/kg y Extracto 400 mg/kg vs Grupo Control	83
Fig. 21. Curva de Eficacia Antiinflamatoria del Extracto 600 mg/kg y Extracto 800 mg/kg vs Grupo Control	84
Fig. 22. Curva de Eficacia Antiinflamatoria Extractos vs Grupo Control	85
Fig. 23. Curva de Eficacia Antiinflamatoria Estándares vs Extractos	86
Fig. 24. Curva de Actividad Antiinflamatoria	87
Fig. 25. Eficacia Antiinflamatoria	88
Fig. 26. Irritación ocular a la hora, 24 horas, 48 horas y 72 horas	99
Fig. 27. Distrito de Villa Chiara, Provincia de Andahuaylas, Dpto. de Apurímac	Anexo 1
Fig. 28. Flor de <i>Argemone mexicana</i> (Anexo 1)	Anexo 1
Fig. 29. Secado del extracto hidroalcohólico de látex de <i>A mexicana</i> (Anexo 5)	Anexo 5
Fig. 30. Extracto hidroalcohólico seco de látex de <i>Argemone mexicana</i> (Anexo 5)	Anexo 5
Fig. 31. Espectro de la Fracción 02	Anexo 6
Fig. 32. Curva de calibración de Quercetina	Anexo 7

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vivo*, por el método del edema pedal inducido por Carragenina en ratas hembras Sprague Dawley, a las concentraciones de 200, 400, 600 y 800 mg/kg del extracto hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana* comparado con 50 mg/kg de diclofenaco sódico y 0.4 mg/kg de dexametasona por vía oral, la eficacia antiinflamatoria fue del 63.47%, 49.00%, 46.55% y 45.18% respectivamente para cada una de las concentraciones de los extractos. Se evaluó la actividad antioxidante *in vitro*, mediante la neutralización del radical del DPPH, de 100, 75, 50, 20 y 15 µg/mL, se obtuvo un 91.20% de inhibición de radicales libres a 100 µg/mL. Se realizó un análisis fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana* detectándose la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, quinonas, fenoles, principalmente. La seguridad fue evaluada mediante el ensayo de toxicidad oral por dosis límite en ratones hembras Balb/c con las dosis de 0.0025; 0.025; 0.25; 2.5 y 20 g/kg, el DL50 para el extracto fue mayor a 2000 mg/kg; el ensayo de irritación ocular se llevó a cabo en conejos Nueva Zelanda siguiendo los métodos descritos en la norma OECD 405. Se instiló 0.1 mL de látex fresco y se determinó el índice de irritación ocular (IIO), la cual fue clasificada como no irritante.

Palabras clave: *Látex, extracto hidroalcohólico, carragenina, Argemone mexicana, antiinflamatorio.*

ABSTRACT

In this paper the anti-inflammatory activity in vivo was evaluated by the method of pedal edema induced by Carrageenan in female Sprague Dawley rats at concentrations of 200, 400, 600 and 800 mg/kg of hydroalcoholic extract latex Mexican Argemone compared with 50 mg/kg of diclofenac sodium and 0.4 mg/kg of dexamethasone orally, the anti-inflammatory efficacy was 63.47%, 49.00%, 46.55% and 45.18% respectively for each of the concentrations of the extracts. antioxidant activity in vitro was evaluated by neutralizing the radical DPPH, 100, 75, 50,20 and 15 mg / mL a 91.20% inhibition of free to 100 pg / mL was obtained radicals. A preliminary analysis of the hydroalcoholic extract phytochemical latex Mexican A. detected the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, quinones, phenols, mainly performed. Safety was evaluated by testing oral toxicity limit dose in female mice Balb / c with doses of 0.0025; 0,025; 0.25; 2.5 and 20 g / kg, the LD50 was greater for the extract to 2000 mg / kg; the eye irritation test was conducted in New Zealand rabbits following the methods described in the OECD 405 standard 0.1 mL of fresh latex was instilled and the rate of eye irritation (IOI), which was classified as non-irritating determined.

Keywords: Latex, alcoholic extract, carrageenan, Argemone mexicana, anti-inflammatory

INTRODUCCIÓN

El Perú es un país poseedor de una gran biodiversidad y experiencia en el uso tradicional de plantas medicinales, fuente de recursos naturales para la investigación y desarrollo de fito-medicamentos, existen alrededor de 25 000 especies de plantas medicinales, muchas de las cuales poseen propiedades terapéuticas de cuyas hojas, frutos, tallos, raíz y látex se obtienen metabolitos secundarios desde sus extractos hidrofílicos y no hidrofílicos. La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia del rol que desempeña el uso y utilización de las plantas medicinales en la “Atención Primaria de la Salud”, recomienda y respalda su integración en los sistemas nacionales de salud, quienes estiman que casi el 80% de todos los habitantes de la tierra los usan para resolver sus principales problemas de salud [1]. *Argemone mexicana* es una planta endémica con usos en medicina tradicional a la cual se atribuyen propiedades antiinflamatoria, antidiabética, cicatrizante, antihelmíntica, antibacteriana y antifúngica; el látex fresco se aplica por las noches sobre el párpado o dentro del ojo contra la inflamación y el escozor, se pone en gotas para remover las “nubes de los ojos”. Es evidente que las enfermedades inflamatorias están mediadas por especies reactivas de oxígeno las cuales pueden iniciar y/o amplificar la inflamación a través de la regulación positiva de varios genes diferentes implicados en la respuesta inflamatoria. En vista de que las enfermedades inflamatorias siguen siendo uno de los principales problemas de salud del mundo [2], la siguiente investigación se realizó para determinar el efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* [3].

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana*. (“Cardo santo”)

Determinar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico del látex de *Argemone mexicana*. (“Cardo santo”)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recolectar y seleccionar muestras de *Argemone mexicana* (“Cardo santo”)
- Extraer el látex y preparar el extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana*.
- Realizar la marcha fitoquímica y el análisis cromatográfico del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana*.
- Demostrar la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* (“Cardo santo”) in vitro utilizando el método de neutralización del radical libre DPPH.
- Evaluar la seguridad del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* (“Cardo santo”) determinando el DL50 por vía oral en ratones Balb/c y el test de irritación ocular en conejos Nueva Zelanda.
- Determinar la actividad antiinflamatoria de extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* (“Cardo santo”) en ratas con inducción de inflamación aguda.

HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* presenta actividad antiinflamatoria.

El extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* presenta actividad antioxidante.

I. GENERALIDADES

1.1 ANTECEDENTES REFERENTES A LA ESPECIE

1.1.1 TAXONOMÍA

La clasificación sistemática de la planta se realizó en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

REINO: PLANTAE

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: PAPAVERALES

FAMILIA: PAPAVERACEAE

GENERO: *Argemone*

ESPECIE: *Argemone mexicana* L.

Nombre vulgar: “Cardo santo”, “Ccarhuinchu”,



Fig. N° 1 Planta adulta de *Argemone mexicana*
(Fuente: propia)

1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La **Familia Papaveraceae** está compuesta por plantas herbáceas, anuales o perennes, raramente arbustos o árboles a menudo con látex lechoso o coloreado, hojas alternas, enteras, hasta pinnado o palmartidas, estípulas ausentes, flores hermafroditas, actinomorfas, terminales o axilares, frecuentemente solitarias y vistosas o reunidas en racimos o panículas. Perianto en dos o tres verticilos, rara vez simples, cáliz de 2-3 sépalos, por lo general libres, rara vez caliptriformes (*Eschscholzia*), por lo regular imbricados, caedizos; corola de 3-4 o de 8-12 pétalos o faltan, libres en 1-2 o raramente 3 verticilos, a menudo corrugados en el capullo, estambres hipóginos, numerosos, en varios verticilos (raramente 4) los filamentos frecuentemente alados o petaloides, anteras biloculares con dehiscencia longitudinal, ovario súpero 1 – locular (rara vez con varios lóculos), carpelos 2-20, óvulos numerosos en cada placenta, anátropos o campilótropos, rara vez pocos o un solo (*Bocconia*), placentación parietal, rara vez basal, estilo generalmente 1, corto o subnulo, estigmas tantos cuantos carpelos, de formas variadas, alternos u opuestos a la placenta. Fruto cápsula con dehiscencia foraminal o valvar, raramente indehiscente. Semillas numerosas, embrión pequeño, endosperma oleaginoso o harinoso.

La familia cuenta con 28 géneros y cerca de 250 especies, mayormente de las regiones subtropicales y templadas del Hemisferio Norte. En el Perú se conocen dos géneros espontáneos y 2 introducidos: *Papaver* y *Chelidonium*.

Argemone género de América del Norte, del Sur y de las Islas de Hawai, con unas 9 especies, sólo 2 se conocen en el Perú. *A. mexicana* “Cardo santo” y *A. subfusiformis* “Cardo santo”. En el presente trabajo se estudia la especie

A. mexicana. [4] *Argemone mexicana* es una hierba anual de 50 hasta 100 cm de altura perteneciente a la orden Papaverales, ampliamente distribuida en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

El tallo es erecto, ramificado, generalmente espinoso, pálido azul-verde y exuda una savia amarilla con olor desagradable cuando se corta.

Las hojas son sésiles, pinnatipartidas, con las divisiones dentado espinosas en los márgenes, abigarrados a lo largo de las venas principales y por debajo; Las flores son amarillas, grandes, solitarias, 2.5 a 4.5 cm de diámetro, subtendido por 1-2 brácteas frondosas; 3 sépalos, espinoso; pétalos 4-6, amarillo pálido, glabros.

El fruto es una cápsula, oblonga, espinosa, de 2,5 - 5 cm de largo y 2 cm de ancho, con 4-6 válvulas de apertura en la punta para su liberación.

Las raíces son largas y subcilíndrica. Las semillas pequeñas, redondas, de color marrón- negruzco. Las distintas partes de la planta poseen potente actividad narcótica y se ha usado tradicionalmente para tratar la sífilis y las enfermedades de la piel.

1.1.3 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Argemone mexicana es una hierba medicinal originaria de México, es una especie pantropical, ampliamente distribuida en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En la India crece en regiones templadas, como maleza en campos de cultivo. En el Perú es frecuente en los valles interandinos, esta planta es de crecimiento espontáneo, incluso como hierba invasora de los terrenos de cultivo. Es importante en la apicultura: productora

de polen. Crece en forma espontánea y silvestre, su propagación y crecimiento están supeditados a la época de lluvias generalmente.

1.1.4 ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS Y ETNOFARMACOLÓGICOS

Argemone mexicana es una planta muy usada en la Medicina Tradicional, en el tratamiento de numerosas enfermedades, varias partes de la planta tienen potente actividad antiemética, actividad narcótica y tradicionalmente ha sido usada para tratar la sífilis y enfermedades de la piel. Las semillas son usadas contra la tos y el asma, también son laxativas y expectorantes. La raíz es antihelmíntica. Esta planta también está presente en la Medicina Ayurvédica y en la Medicina Homeopática.

En Medicina Ayurvédica: La planta entera es efectiva contra la infestación del gusano de Guinea, también tiene actividad purgativa y diurética. Las semillas son usadas como antídoto contra el veneno de serpientes, herpes labial, verrugas. El látex de la planta cura enfermedades oftálmicas y también es eficaz contra la opacidad de la córnea. El aceite de las semillas es usado en el tratamiento de enfermedades de la piel.

En la Medicina Tradicional Mexicana la planta *Argemone mexicana* es usada para curar afecciones de los ojos, como dolor, escozor, manchas e inflamación; aunque principalmente se usa en las cataratas, aplicando directamente el látex fresco o fomentos del cocimiento de la corteza por 5 ó 6 días. La leche (látex) fresca se aplica por las noches sobre el párpado o dentro del ojo para quitar el escozor, el látex se pone en gotas para remover las nubes de los ojos, de la misma forma se aplica en ojos irritados, aunque se sugiere ponerla por la

mañana. Para aliviar la sordera, se muelen las bolitas (frutos), se colocan en un trapo o algodón, y se colocan en la oreja.

Las hojas junto con la pimienta negra se utilizan para curar la diabetes. La decocción de las hojas se utiliza en el tratamiento de la fiebre palúdica y úlceras. El extracto acuoso de hojas también posee actividad anti-inflamatoria. Una decocción de las hojas se bebe para tratar dolores de estómago y también es utilizada en baños para tratar el dolor muscular. Las hojas son útiles contra la tos, heridas, úlceras, verrugas, herpes labial, afecciones cutáneas, enfermedades de la piel. [5]

Se emplea la raíz, a manera de cataplasma, para aliviar el dolor de pulmón, padecimiento originado por el exceso de trabajo (se reconoce porque la espalda duele y se siente caliente). Cuando se padece tos causada por el frío, no se puede respirar bien y duele el pecho, entonces se toma una infusión preparada con las flores.

También se emplea para tratar ronchas o erupciones localizadas en diversas partes del cuerpo de los niños. Para tal fin, se les baña con el cocimiento de la planta. Contra la sarna, se puede usar la hierba fresca y la semilla seca, o el aceite de la semilla. Además, con el agua donde se hirvieron las raíces, suelen bañarse a los bebedores (alcohólicos) que tienen la piel irritada.

Para emplearlo como purgante, se hierven las semillas. Se usa en el tratamiento contra el dolor de muelas, cólicos de los niños, expulsión de la placenta, flujo, heridas y llagas, "dolor" de riñón, diabetes, alferecía, infecciones

en la piel, granos, manchas, salpullido, inflamación, paludismo, convulsiones, espasmos, infecciones y hemorragias, como purgante y cicatrizante.

Los pétalos de la flor en infusión contra la tos convulsiva y contra el asma (Sierra del Perú), las semillas machacadas, en cocimiento, como laxante (Piura), el cocimiento de la planta como sudorífico, febrífugo y tónico (Sierra del Perú), la hoja frita en sebo y molida, en cataplasma en los incordios y apostemas (Piura); el látex de la planta para curar los ojos llagados (Piura), el cocimiento de la raíz en las opilaciones (Piura), el cocimiento de las flores como narcótico (Cusco).

1.1.5 INVESTIGACIONES FITOQUÍMICAS

Distintos estudios indican que *Argemone mexicana* presenta alcaloides como berberina, protropina, sanguinarina; aminoácidos, compuestos fenólicos y ácidos grasos como ácido mirístico, palmítico, oleico, linoleico, etc.

1.1.6 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La especie *Argemone mexicana* ha sido estudiada por sus usos en medicina y por su actividad farmacológica, contra la malaria, la diabetes, el cáncer, por su actividad cicatrizante, antipirética, por su actividad hepatoprotectora, actividad antimicrobiana, anti – VIH, actividad antiasmática, citotóxica y su actividad antiinflamatoria.

El alcaloide benzofenantridina aislado del extracto metanólico de la planta entera seca, mostró actividad anti – VIH en un ensayo en cultivos celulares de linfocitos H9 y actividad citotóxica en tres líneas celulares de cáncer humano,

algunos de los alcaloides aislados de este extracto son: pancorina, (\pm) reticulina, (\pm) argenaxina, angolina, N- dimetiloxysanguinarina, estos alcaloides también mostraron actividad contra el cáncer gástrico y carcinoma nasofaríngeo. El extracto metanólico y acuoso (frío y caliente) de las hojas y semillas de *Argemone mexicana* posee actividad contra dos cepas gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y dos cepas gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), se encontró que el alcaloide aislado N – dimetiloxysanguinarina es el que tiene actividad contra *K. pneumoniae*, *E.coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

1.2 INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta protectora frente a un estímulo nocivo, esencial para el mantenimiento de la salud humana, puede ser desencadenada por estímulos endógenos o exógenos que provocan una reacción compleja en el tejido conjuntivo vascularizado. Los síntomas inflamatorios (signos cardinales) característicos son: rubor, calor, dolor, tumor como lo describió en el siglo primero el romano Cornelio Celso.[6]. Se caracteriza por la dilatación vascular, el aumento de permeabilidad de los capilares, aumento del flujo sanguíneo y el reclutamiento de leucocitos. Este proceso tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado, e implica el plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y los constituyentes celulares y extracelulares del tejido conjuntivo. Las células circulantes son neutrófilos, monocitos y eosinófilos. Las células del tejido conjuntivo son fibroblastos que participan en los mecanismos de fibrosis y cicatrización; macrófagos que participan en el proceso de destrucción de microorganismos y en la eliminación de detritus celulares, estos también inducen la liberación de citoquinas que van a promover la llegada de más

macrófagos y su activación, así como la proliferación de fibroblastos. La matriz extracelular (MEC) está compuesta fundamentalmente por elastina, colágeno y proteoglicanos a partir de los cuales se reparan los tejidos dañados [7]. La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La inflamación aguda tiene una evolución relativamente breve; sus características fundamentales son la exudación de líquido, edema, y la migración de leucocitos (principalmente neutrófilos). La inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza por la proliferación de vasos sanguíneos, fibrosis y necrosis tisular [8].

1.2.1 INFLAMACIÓN AGUDA

La inflamación aguda es una respuesta rápida a una lesión tisular o infección mediante la cual llegan leucocitos y proteínas plasmáticas como los anticuerpos al foco de infección o lesión tisular. La inflamación aguda (**Fig. 2**) está constituida por tres componentes esenciales: 1) Alteraciones del calibre vascular que aumentan el flujo de sangre, 2) cambios estructurales de los microvasos que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos y 3) Emigración de los leucocitos de la microcirculación, acumulación de los mismos en el foco de la lesión y activación para eliminar el agente lesivo. [7] La salida de líquido, proteínas y células desde el sistema vascular hasta el tejido intersticial o las cavidades del organismo se denomina exudación. Un **exudado** es un líquido extravascular de origen inflamatorio con una elevada concentración de proteínas, abundantes restos celulares y una densidad superior a 1020 daltons, el **trasudado** es un líquido con bajo contenido de proteínas y un peso específico menor a 1020

daltons, es esencialmente un ultrafiltrado de plasma sanguíneo y secundario al desequilibrio hidrostático a través del endotelio vascular y el **Edema** es un exceso de fluido en el tejido intersticial o en cavidades serosas, puede ser un exudado o trasudado, el pus o exudado purulento es de origen inflamatorio rico en leucocitos, la mayor parte neutrófilos y el resto de células parenquimatosas[9].

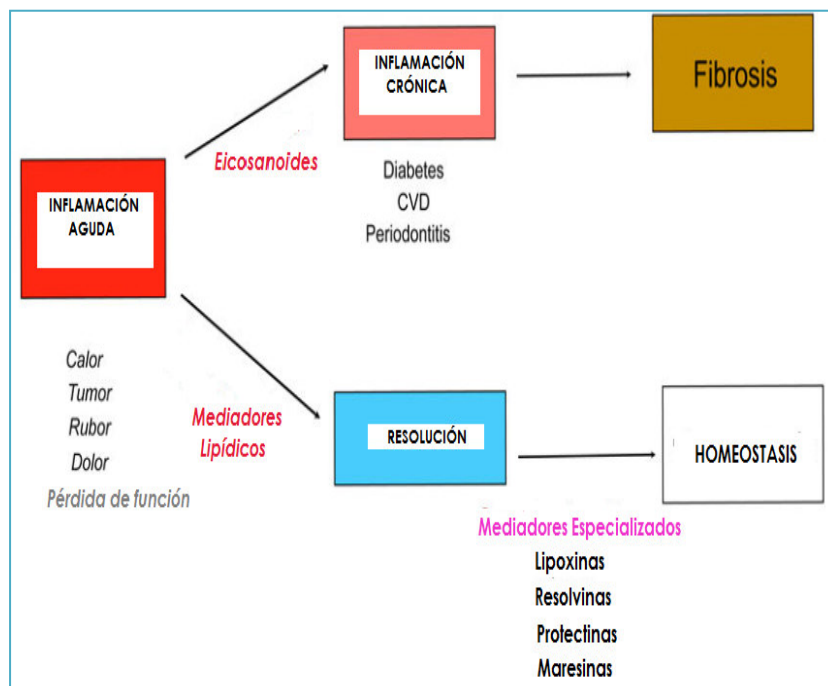


Fig 2 Resolución de la inflamación, En condiciones de homeostasis, las células mantienen condiciones normales y eliminan las células apoptóticas. Tras la exposición del tejido, se inicia la respuesta inflamatoria. Los mediadores de comunicación de la célula activan la quimioatracción, la permeabilidad vascular e infiltración de leucocitos a la periferia. Los microorganismos y células muertas son eliminados por los fagocitos. El resultado de la inflamación aguda (crónica, fibrosis o resolución) está influenciada por el tipo de factores y el grado en el que están involucrados en la respuesta. La resolución es el restablecimiento de la normalidad (homeostasis) y es un proceso bien coordinado regulada activamente. En la resolución, la inhibición de la infiltración de leucocitos, la fagocitosis no flogística y vascular y la función del tejido retornan a la normalidad. Fuente: Marcelo O. Freire et Col [19]

1.2.1.1 ETAPAS DE LA INFLAMACIÓN AGUDA

1.2.1.1.1 ACONTECIMIENTOS VASCULARES

1) CAMBIO DE FLUJO Y CALIBRE VASCULAR

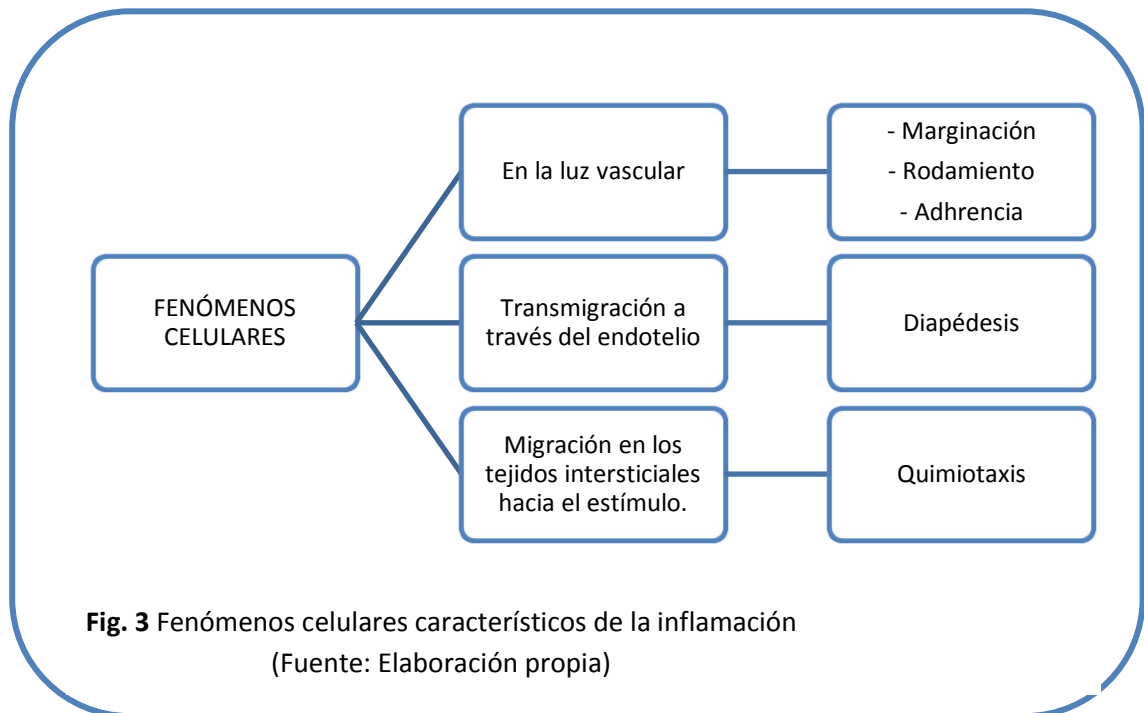
En esta etapa se da primero una vasoconstricción seguida de una vasodilatación, como resultado se da un aumento de flujo, que es la causa del calor y enrojecimiento, inducida por acción de varios mediadores, sobre todo histamina y óxido nítrico (NO) sobre el músculo liso vascular. Existe pérdida de líquido (exudado) y aumento del diámetro vascular produciéndose un enlentecimiento del flujo de sangre, concentrándose los eritrocitos y aumentando la viscosidad, proceso llamado **estasis**. El desarrollo de estasis produce una acumulación de leucocitos. [10]

2) AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR

El aumento de la permeabilidad vascular condiciona la salida de exudado, se activa por la liberación de histamina, bradisinina, leucotrienos, el neuropéptido sustancia P y muchos otros mediadores químicos. Esta respuesta suele durar de 15 – 30 min. [10]

1.2.1.1.2 ACONTECIMIENTOS CELULARES

En la zona de lesión los leucocitos fagocitan a los patógenos, destruyen a los microorganismos, y degradan el tejido necrótico, pero también pueden prolongar la lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y especies reactivas del oxígeno (radicales libres de oxígeno, RLO) [11]. La secuencia de eventos que se producen desde que los leucocitos salen de la luz vascular hasta que alcanzan el tejido intersticial (extravasación) se puede dividir en (**Fig. 3**):



En la luz vascular se da la ***Marginación*** los eritrocitos permanecen confinados en una columna axial central y desplazan a los leucocitos hacia la pared del vaso. A medida que disminuye la velocidad del flujo sanguíneo en las fases iniciales de la inflamación se modifican las condiciones hemodinámicas (disminuye la fuerza de cizallamiento sobre la pared) y un número cada vez mayor de leucocitos se sitúa a la periferia a lo largo de la superficie endotelial.

Rodamiento: cuando los leucocitos, de forma individual y en filas, se colocan sobre el endotelio y se adhieren al mismo de forma transitoria. Finalmente, en la ***Adhesión***, descansan en un punto del endotelio al que se adhieren al mismo en forma transitoria

La **Transmigración de leucocitos**, atraviesan el endotelio y se fijan mediante moléculas complementarias a la superficie de células endoteliales y a mediadores químicos (factores quimiotácticos y ciertas citocinas). Los receptores de adhesión pertenecen a cuatro familias de moléculas: las

selectinas, las inmunoglobulinas, las integrinas y las glucoproteínas de tipo mucina. En la Activación endotelial: los mediadores incrementan la expresión de selectinas E y P. La Transmigración es mediada por las interacciones entre ICAM-1/INTEGRINAS (Molécula de adhesión intercelular) y PECAM-1 (Moléculas de adhesión a las células endoteliales de las plaquetas) sobre los leucocitos y células endoteliales. La transmigración se produce a través de las uniones intercelulares. La diapédesis leucocitaria se produce predominantemente en las vénulas [12]. Después de atravesar las uniones endoteliales los leucocitos son retrasados temporalmente en su trayecto por la membrana basal y finalmente logran atravesarla por la secreción de colagenasas que degradan (parcialmente las uniones endoteliales). Los neutrófilos predominan durante las primeras 6 a 24 horas, y posteriormente son sustituidos por monocitos a las 24 a 48 horas, esto se explica por la activación de diferentes parejas de moléculas de adhesión o factores quimiotácticos específicos de las distintas fases de la inflamación [7]

Migración en los tejidos intersticiales hacia el estímulo quimiotáctico

después de la extravasación, los leucocitos migran en los tejidos hasta alcanzar la zona de lesión, mediante un proceso que se denomina quimiotaxis, todos los granulocitos, monocitos y en menor grado, los linfocitos responden a los estímulos quimiotácticos con grados diferentes de velocidad.

Activación de Leucocitos, los leucocitos deben activarse para realizar sus funciones, como reconocimiento del agente lesivo, emisión de señales, activación de leucocitos para que destruyan y amplifiquen la respuesta inflamatoria (**Fig. 4**), los leucocitos expresan varios receptores, como **Receptores para los productos microbianos tipo TLR** que reconocen LPS

bacterianos, productos víricos, **Receptores acoplados a proteína G**, **receptores para las opsoninas** para las proteínas que recubren a los microbios **y Receptores para las citocinas**.

1.2.1.1.3 ELIMINACIÓN DE AGENTES LESIVOS

Fagocitosis

Reconocimiento y fijación, los neutrófilos y los macrófagos reconocen y fagocitan bacterias y cuerpos extraños en ausencia de sueros, pero la mayor parte de los microorganismos no son reconocidos sino están recubiertos de

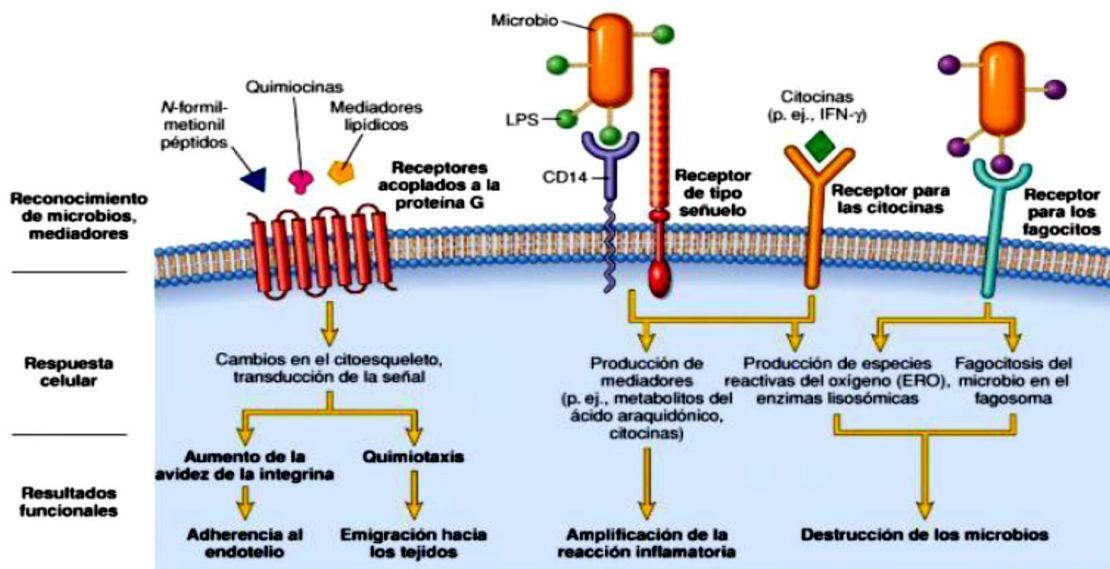


Fig. 4 Receptores de leucocitos y sus respuestas. Los distintos tipos de receptores de la superficie reconocen distintos estímulos. Los receptores inician respuestas implicadas en las funciones de los leucocitos. Sólo se muestran algunos de los receptores. Fuente: Robbins, Patología estructural y funcional [7].

factores naturales denominados opsoninas, que se unen a receptores específicos situados en los leucocitos, esta opsonización incrementa la eficiencia de la fagocitosis. Las opsoninas más importantes son: a) El fragmento fc de la inmunoglobulina G, b) El C3b (componente del

complemento). c) Las proteínas plasmáticas de fijación de carbohidratos (lecitinas).

Englobamiento: La unión de la partícula opsonizada desencadena el englobamiento. Durante el englobamiento, el citoplasma emite extensiones (pseudópodos) que rodean a la partícula que va a ser fagocitada, formando una vacuola, posteriormente, la membrana limitante de esta vacuola fagocítica se fusiona con un gránulo lisosomal, de manera que el contenido de este último se descarga en el fagolisosoma. [7]

1.2.1.1.4 DESTRUCCIÓN Y DEGRADACIÓN:

El primer tipo, se produce con la obtención dependiente de oxígeno de un radical superóxido, esto ocurre por la rápida activación de una oxidasa (NADPH oxidasa), que oxida al NADPH (nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido), y en el proceso se reduce el oxígeno a ion superóxido, sustancia bactericida rica en oxígeno, estos radicales superóxido también reaccionan con radicales hidroxilo, que contribuyen a la destrucción del microbio invasor. Posteriormente, el superóxido es convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2); también se obtienen iones hidroxilo (OH^-). Estas especies químicas pueden combinarse con el NO (Óxido nítrico) para formar productos intermedios reactivos del nitrógeno. El segundo tipo implica el uso de la enzima mieloperoxidasa (MPO), presente en los gránulos de los neutrófilos. Cuando los gránulos se fusionan con un fagosoma, se libera mieloperoxidasa al fagolisosoma, esta enzima, en presencia de un haluro como es el cloro (Cl), convierte el H_2O_2 en hipoclorito ($HOCl^-$). El hipoclorito es extremadamente tóxico para las bacterias, pues las destruye por halogenación (el haluro se une

de forma covalente a los constituyentes celulares) o por la oxidación de proteínas y lípidos (peroxidación lipídica). El sistema H_2O_2 - MPO-haluro es el sistema bactericida de mayor eficacia en los neutrófilos. Finalmente, los microorganismos muertos son degradados más tarde por la acción de hidrolasas lisosomales. La liberación extracelular de cantidades bajas de estos potentes mediadores (radicales libres) pueden incrementar la expresión de las quimiocinas (IL-8), las citocinas y las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial. En concentraciones mayores pueden producir lesión en el huésped. No obstante, en el suero, líquidos tisulares y células diana poseen mecanismos antioxidantes protectores frente a estos radicales derivados del oxígeno. Dentro de los antioxidantes están: la ceruloplasmina, la transferrina, la enzima superóxido dismutasa, la enzima catalasa (que destoxifica el H_2O_2), y la enzima glutatión peroxidasa. [13]

1.2.1.1.5 Evolución de la Inflamación Aguda

La inflamación aguda presenta cuatro formas de resolución (**Fig. 5**): la Resolución **completa** se da una vez que se ha neutralizado el agente o estímulo lesivo, todas las reacciones inflamatorias deberían finalizar, restableciéndose a la normalidad el tejido dañado. **Curación** mediante sustitución por tejido conjuntivo (fibrosis) es una forma de evolución que se produce en los casos en los que ha existido una destrucción tisular sustancial, en los que la lesión inflamatoria afecta a tejidos que no regeneran o en los que se produce una abundante exudación de fibrina. **Formación de abscesos** particularmente en las infecciones por microorganismos piógenos. **Progresión de la respuesta tisular hacia inflamación crónica** La transición entre la forma aguda y la crónica se produce cuando la respuesta de inflamación aguda

no puede resolverse debido a la persistencia del agente lesivo o a la presencia de alguna forma de interferencia en el proceso normal de curación.[9]

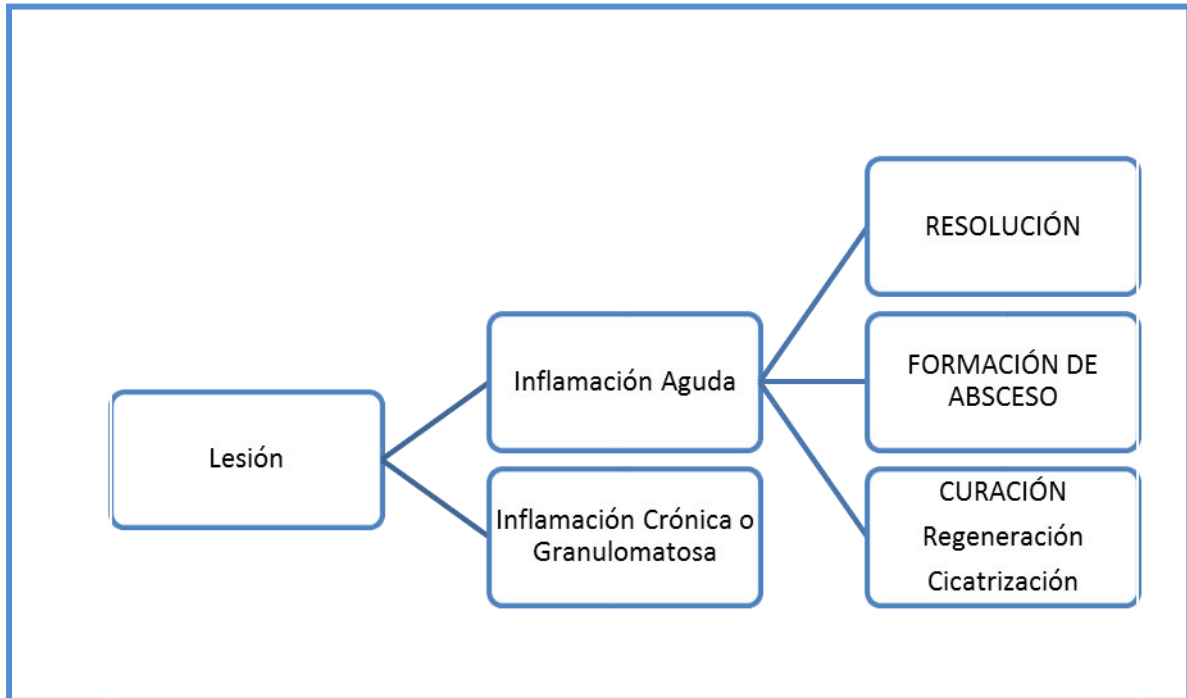


Fig. 5 Evolución de la inflamación aguda. Fuente propia. Luego de una lesión existe una respuesta que es la inflamación aguda, si la respuesta es favorable se da una fase de resolución de lo contrario la siguiente fase será la infamación aguda con todas las características que esta conlleva. Fuente: Elaboración propia

1.2.2 MEDIADORES DE ORIGEN CELULAR

1.2.2.1 HISTAMINA Y SEROTONINA

Son aminas vasoactivas (proviene de aminoácidos) que están disponibles en reservas preformadas y son los primeros mediadores liberados durante la inflamación. La histamina (**Fig. 6**) está ampliamente distribuida en los mastocitos, tejido conjuntivo adyacente a la pared de los vasos, basófilos y plaquetas.

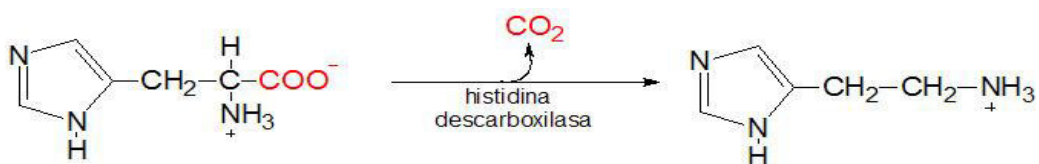


Fig. 6 Biosíntesis de la histamina. Fuente: Antonio Delgado Cirilo. Introducción a la química terapéutica . 2da edición. "Fármacos moduladores de la histamina" (2000) 18:338 [71]

Se libera por estímulos físicos (frio, calor), reacciones inmunitarias (antígeno-anticuerpo), posee tres receptores específicos (H_1 , H_2 , H_3 y H_4),[14], la estimulación del receptor H_1 es el responsable de la respuesta alérgica, generando dilatación de las arteriolas e incremento de la permeabilidad vascular de las vénulas y vasoconstricción de las arterias de mayor calibre.[15]

La serotonina también es un mediador vasoactivo preformado de efectos semejantes a la histamina, se encuentra en gránulos plaquetarios y se libera durante la agregación de las plaquetas.

1.2.2.2 METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Los Eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos, lipoxinas, etc.) son derivados del ácido araquidónico. **(Fig. 7)**

1.2.2.2.1 LA VIA DE LA CICLOOXIGENASA

La ciclooxigenasa es la primera enzima en la formación de prostaglandinas (PG) y tromboxano (TX) que es un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor a partir del ácido araquidónico. Existen 2 isoformas de la enzima, la COX- 1 y COX2. La COX-1 se expresa en forma constitutiva prácticamente en todas las células y presenta gran ubicuidad, la COX-2 puede ser inducida por citocinas, factores de crecimiento y endotoxinas, efecto que es bloqueado por la administración de corticosteroides. Las ciclooxigenasas actúan sobre el ácido araquidónico y provocan dos acciones diferentes: una que oxigena y produce una estructura en anillo y forma el endoperóxido cíclico PGG_2 y una actividad de peroxidasa que transforma PGG_2 en PGH_2 . Los endoperóxidos G y H son químicamente inestables, pero por acción enzimática se transforman en diversos productos que incluyen prostaglandinas (PGE_2 ,

PGD₂ y PGF_{2α} o prostaciclina (PGI₂) producto principal de la ciclooxigenasa que es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria y tromboxano (TXA₂). [7], [16], [17].

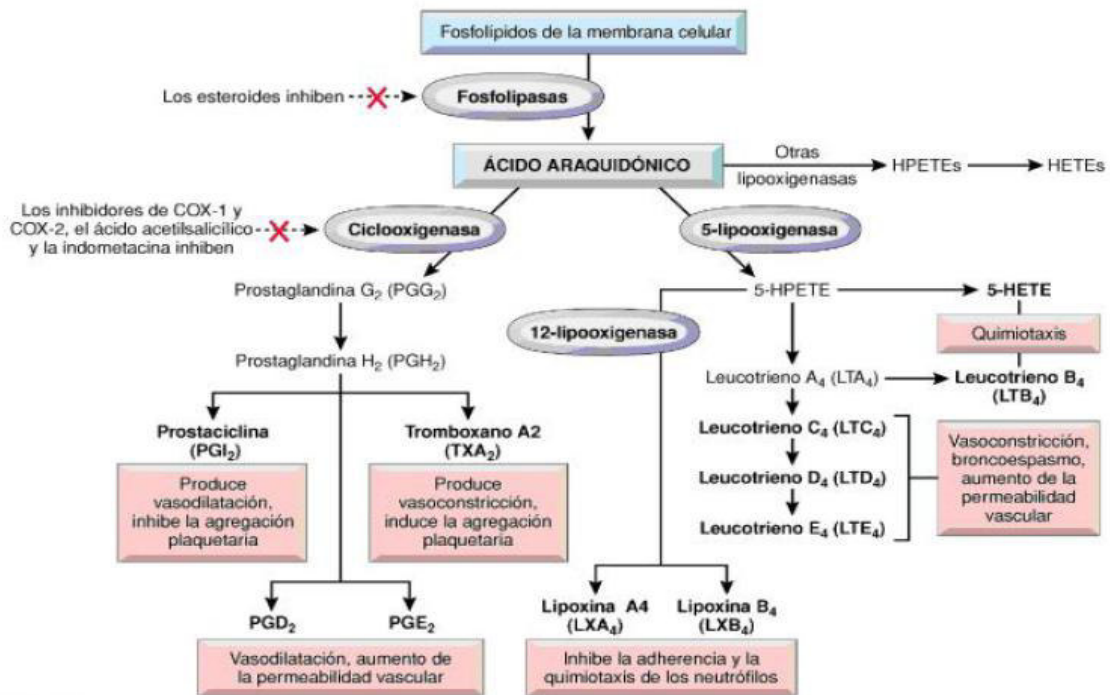


Fig. 7 Generación de metabolitos del ácido araquidónico y su papel en la inflamación. Las dianas moleculares de la acción de algunos fármacos antiinflamatorios se marcan con una X roja. Fuente: Robbins, Patología estructural y funcional 6ta ed "Inflamación aguda y crónica", "Aspectos Históricos", "Reparación de los tejidos: Proliferación celular, fibrosis y curación de las heridas" (2000) 3:53-120. [7]

1.2.2.2.2 VIA DE LA LIPOOXIGENASA

El LTB₄ ejerce una poderosa actividad quimiotáctica que favorece la concentración de neutrófilos, su desgranulación, agregación y adherencia a las paredes de las vénulas poscapilares, también produce hiperalgesia en presencia de neutrófilos. Tanto el LTB₄, LTC₄ y LTE₄ aumentan la permeabilidad vascular y la permeabilidad plasmática. Esta vía también produce lipoximas que son inhibitoras de la inflamación.

1.2.2.3 FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS (PAF)

El PAF funciona como un mediador de hipersensibilidad, en las reacciones inflamatorias agudas y en el shock anafiláctico. El PAF se sintetiza en respuesta a la formación de complejos antígeno-IgE en la superficie de basófilos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y monocitos. El PAF también provoca respuestas en el hígado, corazón, músculo liso, y tejido uterino y pulmones. [18]

1.2.2.4 CITOCINAS

Son generadas por los fagocitos mononucleares (macrófagos) y linfocitos, las citocinas que actúan como mediadores inflamatorios son IL- 1(Interleuquina, TNF (factor de necrosis tumoral), sus acciones más importantes en la inflamación son los efectos que produce sobre el endotelio induciendo la síntesis de moléculas de adhesión endotelial. El TNF da lugar a la agregación y cebado de neutrófilos causando respuestas aumentadas de estas células.

1.2.2.5 QUIMIOCINAS

Las quimiocinas son sintetizadas por una variedad de células, incluyendo células endoteliales, epiteliales y estromales, así como por los leucocitos. Las quimiocinas regulan no solo la quimiotaxis, sino también la adhesión, desgranulación, angiogénesis, desarrollo de células hematopoyéticas e inmunes, así como la génesis de órganos linfoides. [19]

1.2.2.6 ÓXIDO NÍTRICO

Es una molécula pequeña sintetizada de manera local por el endotelio y macrófagos, mediante la actividad de la enzima sintasa de óxido nítrico, el NO tiene una doble función relaja el músculo liso vascular e induce la vasodilatación, pero también es un potente inhibidor de las reacciones

inflamatorias. Como un importante intermediario de oxígeno reactivo, también media la muerte celular y la bacteriana.[7]

1.2.3 MEDIADORES DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

1.2.3.1 PROTEÍNAS DE COMPLEMENTO

Este sistema actúa en los procesos inmunitarios innatos y adaptativos de defensa frente a microorganismos y su objetivo es la lisis de los mismos a través del denominado complejo de ataque de membrana. Los factores derivados del complemento afectan a diversos fenómenos en la inflamación tales como: **Fenómenos vasculares:** C3a-C5a (anafilotoxinas) y en menor medida C4a estos aumentan la permeabilidad vascular y producen vasodilatación principalmente mediante la liberación de histamina desde los mastocitos. **Adhesión, quimiotaxis y activación de leucocitos:** C5a es un potente agente quimiotáctico para neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos. **Fagocitosis:** C3b y C3b1: cuando se fijan a la pared celular bacteriana, actúan como opsoninas y favorecen la fagocitosis por parte del neutrófilo y macrófagos.

1.2.3.2 PROTEÍNAS DE LA COAGULACIÓN

El sistema de la coagulación y la inflamación son procesos íntimamente conectados. El sistema de la coagulación se divide en dos vías que confluyen, culminando en la activación de la trombina y en la formación de fibrina. El factor de Hageman activado (factor XIIa) inicia cuatro sistemas implicados en la respuesta inflamatoria: El sistema de las cininas, que produce cininas vasoactivas. El sistema de coagulación, que induce la formación de trombina, fibrinopéptidos y factor X todos ellos con propiedades inflamatorias. El sistema

fibrinolítico que produce plasmina y degrada fibrina. El sistema del complemento que produce anafilatoxinas.

1.2.3.3 SISTEMA DE LAS CININAS

El sistema de la cininas genera péptidos vasoactivos a partir de las proteínas plasmáticas denominadas cininógenos y mediante proteasas específicas llamadas calicreínas. El sistema de las cininas produce la liberación de bradicinina.

1.2.4 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS

1.2.4.1 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS

Se agrupan según sus características químicas, se clasifican como: **AINES tradicionales** aquellos que inhiben a la COX -1 y COX – 2, y **AINES selectivos de la COX – 2** (conocidos como “coxib”). La mayoría de AINES son inhibidores competitivos reversibles y de lugar activo de las enzimas COX, excepto el ácido acetil salicílico que inhibe de manera irreversible a ambas enzimas. La mayoría de AINES tradicionales son ácidos orgánicos débiles, se absorben bien por vía oral. Los AINES selectivos de COX -2 son compuestos diarilheterocíclico con un grupo lateral relativamente voluminoso, que se alinea en una gran bolsa lateral en el canal de unión de la COX – 2 pero dificulta su orientación óptima en el canal de fijación más pequeño de la COX – 1, tanto los AINES tradicionales y selectivos por lo general son fármacos hidrófobos, lo cual les permite tener acceso al canal de unión de araquidonato hidrófobo dando como resultado características farmacocinéticas compartidas.

1.2.4.1.1 ESTRUCTURA DE LA CICLOOXIGENASA: COX -1 y COX – 2

La enzima COX tiene dos zonas catalíticas: la ciclooxigenasa y la peroxidasa. Los AINES inhiben la COX, pero no la actividad peroxidasa de la enzima. Tanto

la COX-1 y COX-2 (**Fig. 8**), son similares en un 60% y ambas catalizan la síntesis de PG a partir del ácido araquidónico. La diferencia más importante entre ellas, es su patrón de regulación y expresión tisular [20] La COX-1 o constitutiva, se expresa habitualmente en la mayoría de los tejidos, y la COX-2 o inducible se expresa en focos inflamatorios, El sitio activo de la COX humana se encuentra en el exterior de la membrana citoplasmática y está constituido por un canal hidrofóbico largo y angosto, en el que se destaca un residuo de arginina (Arg120) que interacciona con el carboxilo de los AINEs tradicionales. En el extremo opuesto a la Arg120 hay un resto de tirosina (Tyr385) y un residuo de serina (Ser530), este último es acetilado por la aspirina y es lo que determina la inhibición irreversible de la COX [21] . Para explicar la selectividad de los AINEs, es necesaria la presencia de un aminoácido en la posición 523 del sitio activo de ambas isoenzimas, concretamente la **isoleucina para la COX-1** (disminuye el espacio disponible, disminuyendo así la selectividad) y la **valina para la COX-2**, esta última al tener menor volumen determina un mayor espacio disponible, una abertura en la pared del canal del sitio activo de la COX-2 llamado bolsillo adicional o “pocket”, lo que permite el acceso a un lugar de acoplamiento más estable de muchas estructuras selectivas [22] , [23].

Los efectos terapéuticos de los AINEs (**Fig. 9**) se derivan de la capacidad de inhibición en la producción de PG. La COX -1 es fuente dominante en la producción de prostanoïdes (pero no exclusiva) para funciones orgánicas y la COX -2 es la fuente más importante de formación de prostanoïdes en la inflamación y tal vez en el cáncer. [24]

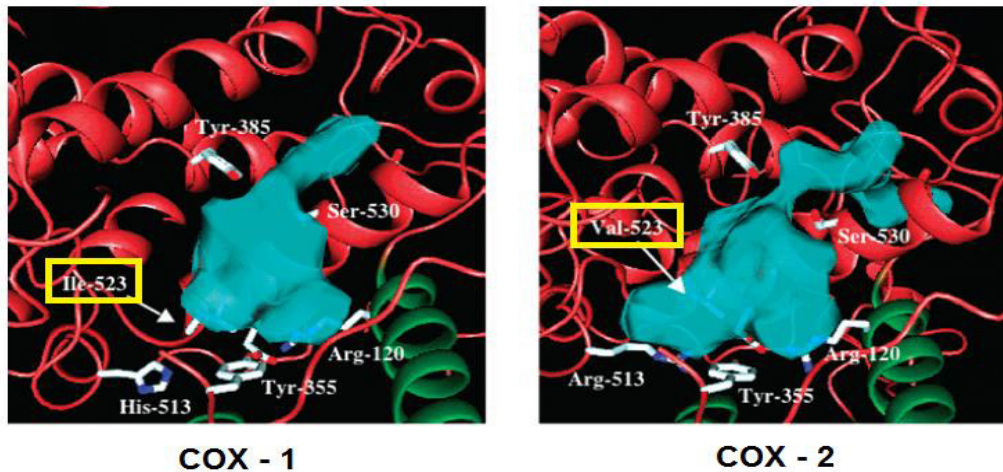


Fig. 8 Estructura la ciclooxigenasa 1 y 2. Fuente: Anna L. Blobaum. Structural and Functional Basis of Cyclooxygenase Inhibition. Journal of Medicinal Chemistry, 2007, Vol. 50, No. 7. [21]

Es importante que la COX -1 se exprese en células epiteliales y gástricas debido a que podría ser fuente de formación de prostaglandinas citoprotectora. La inhibición de la COX – 1 desencadena efectos secundarios gástricos que complican el tratamiento con AINEs tradicionales. El AAS y los AINEs inhiben las enzimas COX y la producción de PG, pero no inhiben las vías de la lipooxigenasa (LOX) del metabolismo de AA, por tanto no suprimen la formación de Leucotrienos. Los glucocorticoides suprimen la expresión COX – 2 y también inhiben la acción de la PLA₂ lo cual libera AA de la membrana celular. Estos efectos contribuyen a las acciones antiinflamatorias de los glucocorticoides. [24]

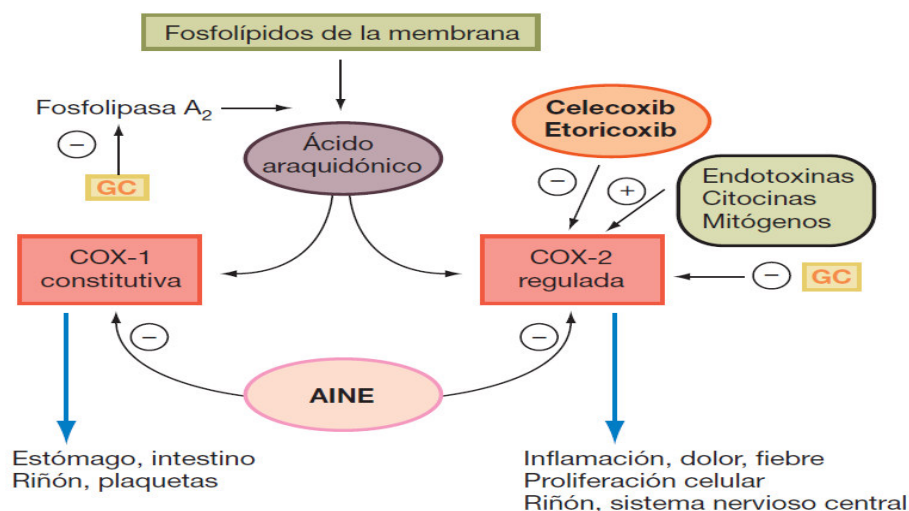


Fig. 9 Representación esquemática de la acción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), glucocorticoides (GC) e inductores de la expresión sobre la COX – 1 y COX – 2. Fuente: Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12ª ed. México D.F: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES. S.A de C.V. 2012. P. 959 – 992. [24]

1.2.4.1.2 INHIBICIÓN IRREVERSIBLE DE LA CICLOOXIGENASA POR EL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO.

El ácido acetilsalicílico se une de manera covalente a la COX-1 y la COX-2, inhibiendo en forma irreversible sus actividades, esta última acción es una diferencia importante de todos los AINEs pues la duración de los efectos del ácido acetilsalicílico está relacionada con la tasa de recambio de COX en diferentes dianas hísticas. La importancia del recambio de enzimas en el restablecimiento de la acción del ácido acetilsalicílico es muy notable en las plaquetas, las cuales al no tener núcleo, tienen una capacidad muy limitada de síntesis de proteínas. Por consiguiente, las consecuencias de la inhibición de la COX-1 de las plaquetas (la COX-2 se expresa en los megacariocitos y quizá en la forma inmadura de las plaquetas) persiste durante el curso de la vida de la plaqueta. La inhibición de la formación de TxA₂ dependiente de la COX-1 de la plaqueta es, por tanto, acumulativa con las dosis repetidas de ácido acetilsalicílico (una concentración de apenas 30 mg/día) y tarda alrededor de 8

a 12 días (el tiempo de recambio plaquetario) para restablecerse por completo una vez que se ha suspendido el tratamiento.

1.2.4.1.3 INHIBICIÓN SELECTIVA DE LA CICLOOXIGENASA - 2

Tras el descubrimiento de las COX – 2 se propuso que la COX – 1 expresada en forma inespecífica era la fuente predominante de las PG citoprotectoras formadas por el epitelio del tubo digestivo. Debido a que su expresión es regulada por las citocinas y mitógenos, se pensó que la COX – 2 era la fuente dominante de PG en la inflamación y el cáncer. Por consiguiente, se desarrollaron inhibidores selectivos de la COX – 2 basándose en la hipótesis de que brindarían una eficacia similar a AINEs tradicionales con una mejor tolerabilidad digestiva. La mayor parte de los coxib se han restringido mucho en su uso o retirado del comercio en vista de sus efectos adversos.

1.2.4.1.4 DERIVADOS DEL ÁCIDO ACÉTICO

Se encuentran los siguientes fármacos: Indometacina, Sulindaco, Etodolaco, Tolmetina, Ketorolaco, Nabumetona, Diclofenaco y Lumiracoxib.

DICLOFENACO

Es un derivado del ácido fenilacético, tiene actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria. Su potencia es mucho mayor que la de la indometacina, el naproxeno u otros AINEs tradicionales. La selectividad del diclofenaco por la COX – 2 es similar al celecoxib, Además el diclofenaco parece reducir las concentraciones intracelulares de AA libre en los leucocitos y modifica su liberación o captación [24]. El diclofenaco tiene una absorción rápida, una unión a proteínas y una semivida de 1 a 2 h, posee un efecto de primer paso considerable, de manera que solo el 50% del diclofenaco esta biodisponible. El fármaco se acumula en el liquido sinovial tras la administración oral, por lo cual

su efecto terapéutico es más prolongado, se metaboliza en el hígado por la CYP2C para formar 4 – hidroxidiclofenaco, el principal metabolito y otras formas hidroxiladas. Después de la glucuronidación y la sulfación, los metabolitos son excretados en la orina (60%) y en la bilis (35 %). El diclofenaco produce efectos secundarios. Los efectos secundarios más frecuentes son gastrointestinales, relacionados al SNC y las reacciones de alergia o locales. Los efectos secundarios asociados al diclofenaco son generablemente leves y transitorios y parece no estar relacionados con la dosis administrada. **Efectos en la sangre:** anemia aplásica, anemia hemolítica, trombocitopenia, neutropenia, y agranulocitosis, sangrado espontáneo, moretones, inhibición de la agregación de plaquetas. **Efectos en los riñones: Necrosis** papilar renal y síndrome nefrótico. **Efectos en el hígado:** elevaciones de la transaminasa hepática, que si bien pueden ser reversibles, en ocasiones permanece y obliga la retirada del medicamento.[25]

Sus indicaciones terapéuticas cubren un espectro que abarca desde el tratamiento agudo y crónico de los síntomas de la artritis reumatoide, artrosis y espondilitis anquilosante hasta el dolor agudo consecuencia de procesos inflamatorios no reumáticos. En los últimos años se ha popularizado su uso como analgésico en el dolor agudo de diversas etiologías (postoperatorio y cólico renal) o como antidismenorreico.

La dosis habitual por vía oral es de 50 mg/ 8 h aunque como dosis inicial puede administrarse 100 mg. En el tratamiento del cólico renal se utiliza la forma soluble por vía intramuscular a la dosis de 75 mg, aunque no deben administrarse más de dos dosis al día. En procesos reumáticos, inicialmente de 100 – 200 mg/ día, en 2 – 4 dosis por vía oral y tras respuesta satisfactoria, 75

– 100 mg/ día, 2 – 3 dosis. Su seguridad y eficacia no se ha establecido en niños.[26]

1.2.4.2 ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDEOS

Son glucocorticoides que derivan del pregnano y poseen oxígeno. Los glucocorticoides disminuyen la reacción de granulación por su efecto inhibitorio sobre el tejido conjuntivo, disminuyen la vasodilatación en respuesta a un estímulo proinflamatorio, al reducir la liberación de mediadores. La estabilidad de los gránulos de las células cebadas aumenta y disminuye la capacidad de producir histamina. La estabilización de membrana lisosómica tiene por consecuencia disminuir la liberación de enzimas que intervienen en la formación de cininas, prostaglandinas y otros mediadores.

Los corticoides bloquean la captación extraneuronal para inactivar las catecolaminas. La reducción del componente vascular de la inflamación y la disminución o formación de mediadores que intervienen aumentando la permeabilidad vascular, logran reducir y disminuir la formación de edema inflamatorio. La inhibición de la actividad amebocítica de células reticuloendoteliales y leucocitos polimorfonucleares tiene por consecuencia la reducción del exudado celular.

Los glucocorticoides son hormonas naturales que previenen o suprimen las respuestas inmunes e inflamatorias cuando se administran en dosis farmacológicas. Los glucocorticoides libres cruzan fácilmente las membranas de las células y se unen a unos receptores citoplasmáticos específicos, induciendo una serie de respuestas que modifican la transcripción y, por tanto, la síntesis de proteínas. Estas respuestas son la inhibición de la infiltración

leucocitaria en el lugar de la inflamación, la interferencia con los mediadores de la inflamación y la supresión de las respuestas inmunológicas. La acción antiinflamatoria de los glucocorticoides implica proteínas inhibitoras de la fosfolipasa A2, las llamadas lipocortinas. A su vez, las lipocortinas controlan la biosíntesis de una serie de potentes mediadores de la inflamación como son las prostaglandinas y los leucotrienos. Algunas de las respuestas de los glucocorticoides son la reducción del edema y una supresión general de la respuesta inmunológica. Los glucocorticoides inhalados disminuyen la síntesis de la IgE, aumentan el número de receptores beta adrenérgicos en los leucocitos y disminuyen la síntesis del ácido araquidónico. En consecuencia, son eficaces en el tratamiento del asma bronquial crónico y de las reacciones alérgicas.

1.2.4.2.1 DEXAMETASONA

La dexametasona es un glucocorticoide sintético utilizado como antiinflamatorio e inmunosupresor. Como glucocorticoide, la dexametasona es unas 20 veces más potente que la hidrocortisona y 5 a 7 veces más potente que la prednisona, se absorbe rápidamente después de una dosis oral. Las máximas concentraciones plasmáticas se obtienen al cabo de 1-2 horas. En la circulación sistémica, la dexametasona se une débilmente a las proteínas plasmáticas, siendo activa la porción no fijada a las proteínas. El fármaco se distribuye rápidamente en los riñones, intestinos, hígado, piel y músculos. Es metabolizada en el hígado originando productos inactivos que son eliminados en la orina. La semivida de eliminación es de 1.8 a 3.5 horas y la semivida biológica de 36 a 54 horas.

Los efectos secundarios están asociadas al tratamiento crónico con corticoide estos aumentan con la duración del mismo. Las administraciones en dosis únicas o en número reducido no suelen provocar efectos secundarios, pero la administración crónica ocasiona la atrofia de las glándulas suprarrenales y una depleción generalizada de proteínas, los glucocorticoides son responsables del metabolismo de las proteínas, un tratamiento prolongado puede ocasionar diversas manifestaciones musculo esqueléticas. Estos problemas se presentan con mayor frecuencia en pacientes ancianos o debilitados, los glucocorticoides no modifican el metabolismo de la vitamina, pero interaccionan con el metabolismo del calcio sobre todo en los osteoblastos. El tratamiento prolongado con corticosteroides puede afectar negativamente el sistema endocrino, ocasionando hipercortisolismo (síndrome de Cushing), irregularidades menstruales (con amenorrea o dismenorrea) hiperglucemia y agravamiento de la diabetes mellitus. Son usualmente administrados en cantidades de 0.75 mg a 4 mg diarios, divididos en 3 ó 4 dosis por vía oral. En artritis reumatoidea de 0.75 mg a 3 mg diarios, en afecciones oculares inflamatorias de 0.2 mg a 1.5 mg diarios, en lupus eritematoso de 0.75 mg a 4 mg diarios. La dosis de dexametasona deberá adaptarse para cada paciente y la dosis inicial sugerida puede aumentarse o disminuirse dependiendo de la gravedad de los síntomas, peso del paciente y respuesta de éste al tratamiento.

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO

La oxidación es un proceso bioquímico de pérdida de electrones siempre asociado a otro de captación que llamamos reducción. Esta oxidación es fundamental para la vida pues participa en los procesos de obtención de la

energía celular. Sin embargo, cuando existe un exceso de oxidación aparece el estrés oxidativo que es una realidad compleja en todos los niveles biológicos que no se puede medir ni definir con un solo parámetro. Hay una multitud de enfermedades que se han relacionado con el estrés oxidativo y la generación de radicales libres.[27]

1.3.1 RADICALES LIBRES (RL)

Los radicales libres u oxidantes son producidos por la actividad de una gran variedad de oxidasas durante muchos procesos celulares normales y están caracterizados por tener uno o más electrones no apareados, que hacen a estas moléculas altamente reactivas. Cuando un radical libre reacciona con una estructura molecular estable puede originar una reacción en cadena que generará nuevos radicales libres. Los radicales libres se generan también en las reacciones inflamatorias y en el metabolismo celular, y tienen funciones fisiológicas, como la defensa frente a patógenos mediante la exposición a EROS (Especies reactivas de oxígeno) y especies de nitrógeno reactivo (RNS) de bacterias fagocitadas, la participación en vías de señalización y la regulación de la activación de diversas proteasas, factores de crecimiento y citocinas.[28]

1.3.1.1 Especies Reactivas de Oxígeno

Entre ellas se encuentran: el oxígeno (O_2) en estado estable, el cual posee dos electrones impares cada uno localizado en un diferente orbital π pero con spin paralelo. El O_2 es un buen agente oxidante: los hidrogeniones que atrae ocupan los spines vacantes en el orbital π , los cuales se colocan en forma antiparalela. Al captar energía, el O_2 (**Fig. 10**) puede producir formas más reactivas conocidas como oxígeno singlete ($\uparrow O-O\downarrow$) que presenta los dos

electrones apareados en un mismo orbital π , perdiendo su calidad de radical pero al removerse el spin de restricción, su habilidad oxidante aparece muy aumentada. Si un simple electrón se adiciona a la molécula estable del oxígeno en el orbital π , se produce el radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$) el cual posee sólo un electrón impar. Las más comunes son el oxígeno singlete (O_2), radical hidroxilo (OH^{\bullet}), radical alcoxilo (RO^{\bullet}), radical-anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), ácido hipocloroso ($HOCl^{\bullet}$), peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En los sistemas biológicos, el producto de reducción del oxígeno con el transporte de dos electrones da como resultado el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Este es un agente oxidante, el cual se descompone fácilmente por fisión homolítica resultando el radical hidroxilo, OH^{\bullet} . [29]

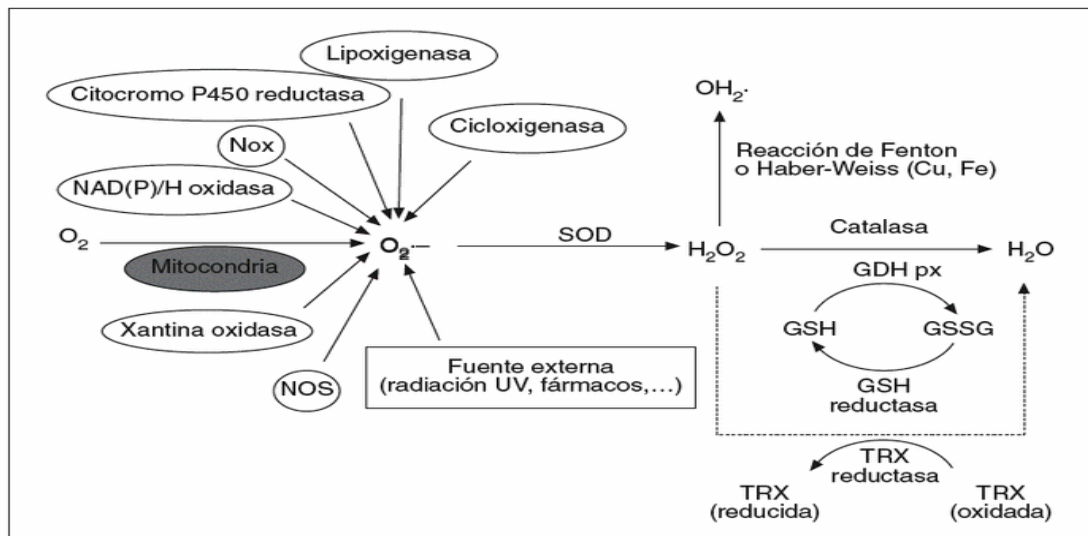


Fig. 10 Especies reactivas de oxígeno. Formación y metabolización celular de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS, como el anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilo (OH^{\bullet}), son generados en respuesta a agentes exógenos o, mayoritariamente, por vías endógenas del metabolismo celular, como la cadena de transporte mitocondrial, la NAD(P)H oxidasa de la membrana citoplasmática, la citocromo P450 reductasa, etc. La superóxido dismutasa (SOD) transforma el $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 , y éste es degradado principalmente a H_2O por las enzimas glutatión peroxidasa (GSH px) y catalasa. Mediante la reacción de Fenton o Haber-Weiss, el H_2O_2 es capaz de formar OH^{\bullet} , un radical altamente reactivo. Fuente: E.C. Vaquero-Raya y X. Molero-Richard. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica?. Gastroenterol Hepatol. 2005;28(8):473-84. [72]

1.3.1.2 Especies Reactivas de Nitrógeno

El óxido nítrico (NO) es el representante más relevante de estas especies. Participa en una diversidad de funciones incluyendo vasodilatación, neurotransmisión, actividad antimicrobiana y antitumoral. Diferentes células tales como: macrófagos, endoteliales, neuronas, musculares lisas y cardíacas, lo sintetizan a partir de la L - arginina. En células endoteliales sólo la L-arginina es capaz de aumentar la formación de NO inducida por la bradicinina y por el ionóforo de Ca. La síntesis se realiza exclusivamente a expensas de los átomos de N del grupo guanidino de la L-arginina. [30]

1.3.2 FUENTES BIOLÓGICAS DE RADICALES LIBRES

La mitocondria constituye la fuente principal de RL este proceso se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP o adenosina trifosfato. Otras fuentes son los peroxisomas, organelas del citosol que son muy ricas en oxidasas y que generan H_2O_2 , el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua. Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de O_2 que, en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico OH^- . Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios. La enzima xantina deshidrogenasa predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del Ca^+), genera O_2^- . Todo esto ocurre en procesos fisiológicos normales, pero en situaciones patológicas se incrementa sustancialmente, dando paso al estrés

oxidativo, algunos de los factores que llevan a esta situación son químicos, físicos y/o metabólicos como dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismos, fenómenos de isquemia y ejercicios extenuantes. [31]

1.3.3 TOXICIDAD DE LOS RADICALES LIBRES (RL)

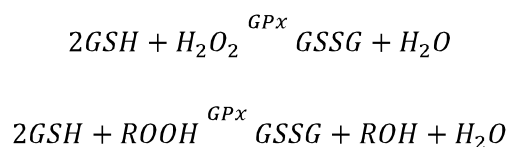
Los radicales libres son tóxicos y generadores de diversas enfermedades, por su alta inestabilidad los RL colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. En el caso de los lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas. La oxidación lipídica por los RL, es una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso es conocido como **peroxidación lipídica**, genera numerosos subproductos, muchos de ellos como el malonildialdehído (MDA). En caso de las proteínas que se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc).[32] Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que trae como consecuencia el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis, o la pérdida de expresión por daño al gen específico. Se generan diversas enfermedades como: aterosclerosis, infarto del miocardio, diabetes, cardiopatía alcohólica,

enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, hiperoxia, isquemia o infarto cerebral, cataratas oculares, daño degenerativo de la retina, pterigium, entre otras enfermedades.

1.3.4 SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Se define como antioxidante a aquella sustancia que al colisionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Los antioxidantes se clasifican en exógenos que ingresan a través de la cadena alimentaria y endógena que son sintetizados por la célula. **Antioxidantes exógenos** son: la **Vitamina E**, vitamina liposoluble que tiene ocho formas diferentes, siendo el α -tocoferol la forma más activa. Ligado a la membrana celular, su principal función es la de prevenir la peroxidación lipídica, la vitamina E es considerada la más importante protectora de las moléculas lipídicas. [33] **Vitamina C** actúa en ambientes acuosos del organismo como en los pulmones o el cristalino del ojo. Colabora con la vitamina E para regenerar al α -tocoferol.(34) **Betacaroteno**: neutraliza el oxígeno singlete. Es necesaria la incorporación al organismo de ciertos oligoelementos como el cobre, hierro, cinc, selenio y manganeso, pues forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes. Los **flavonoides** también son señalados por sus propiedades antioxidantes. **Antioxidantes endógenos**: la **superóxido dismutasa** (SOD) (EC 1.15.1.1) es una de los antioxidantes enzimáticos intracelulares más efectivos. Cataliza la dismutación de O_2^- a O_2 , siendo demostrada su actividad antioxidante por McCord y Fridovich en 1969.(35). La **catalasa** (EC 1.11.1.6) es una enzima presente en las células de plantas, animales y bacterias aeróbicas. Está

localizada en una organela denominada peroxisoma. Promueve la conversión de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno molecular, una molécula de catalasa puede convertir 6 millones de moléculas de peróxido de hidrógeno.(36) La **glutación peroxidasa**, la cual tiene dos formas, una independiente de selenio (glutación-S-transferasa, GST, EC 2.5.1.18) y otra dependiente de selenio (GPx, EC 1.11.1.19). El humano cuenta con alrededor de cuatro GPx diferentes. La propiedad antioxidante de esta enzima, cuyo centro activo tiene al Selenio (Se), le permite eliminar a los peróxidos como potencial sustrato de la reacción de Fenton. Las GPx actúan en conjunción con el glutación tripéptido (GSH), de la siguiente manera: [36]



1.3.5 ENFERMEDADES POR ESTRÉS OXIDATIVO

La **enfermedad cardiovascular** ocasionada por modificación oxidativa de las lipoproteínas, particularmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los RL, es uno de los mecanismos básicos de la aterogénesis. El colesterol y los fosfolípidos de las LDL se encuentran protegidos de la oxidación por varios agentes antioxidantes lipofílicos: vitaminas E, B, C y ubiquinol. **Cáncer** como posible mecanismo se reconoce que el ADN puede dañarse y por ende, sufrir mutaciones por lesión directa de los RL sobre las bases, o en forma directa afectando la actividad de las proteínas específicas que lo repara (proto-oncogen), o lo frena (supresores). El betacaroteno se indica como agente protector en enfermedades tumorales. **Enfermedades oculares:** la directa exposición del ojo a las radiaciones ionizantes, el humo del tabaco y otros agentes generadores de RL, determina que algunas estructuras se afecten por el estrés oxidativo, el Pterigium es una hiperplasia fibrovascular,[37] sus factores de riesgo son las radiaciones ultravioletas, la irritación ocular, las inflamaciones crónicas con producción de factores angiogénicos, en esta patología existe un incremento de malondialdehído y óxido nítrico, también se

ha observado un decremento de las enzimas antioxidantes, como la SOD, catalasa, y glutatión peroxidasa.(38)

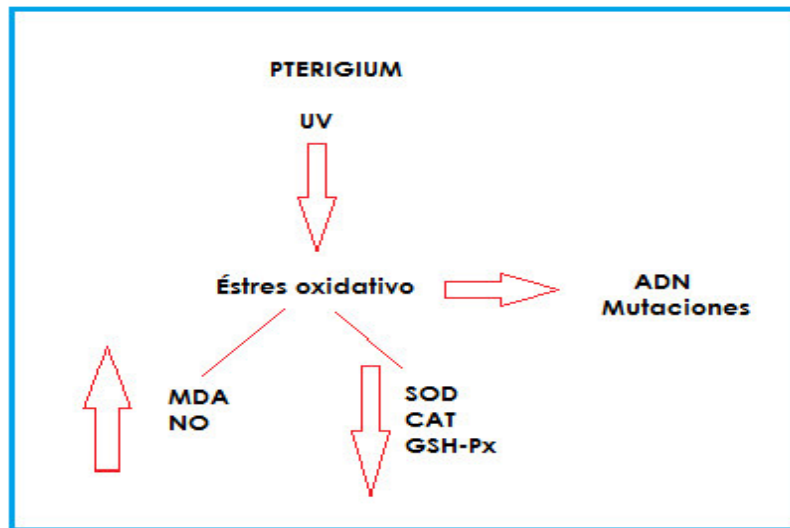


Fig. 11 Estrés oxidativo en el Pterigium [73]

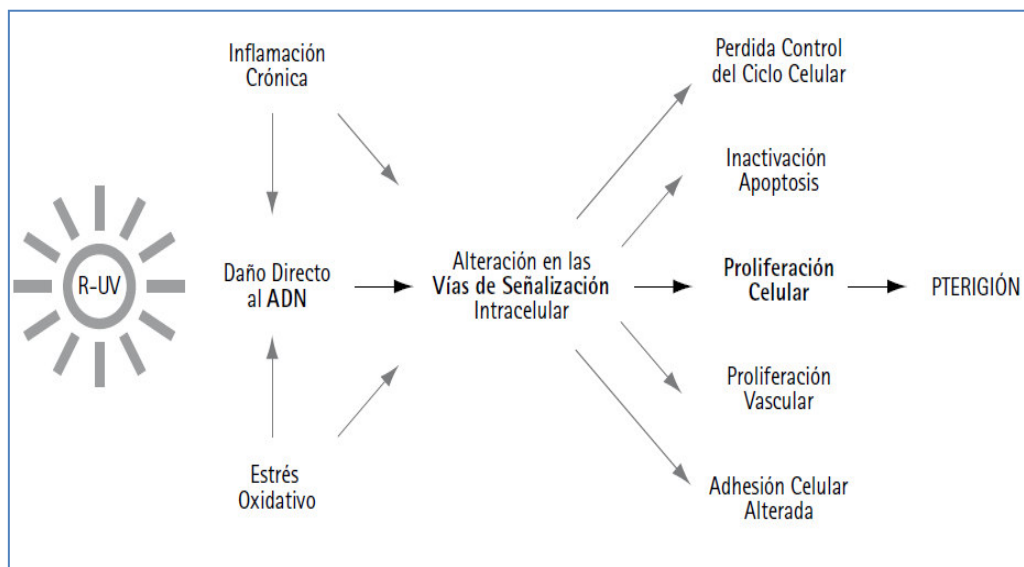


Fig. 12 La radiación ultravioleta y pterigium. La radiación ultravioleta induce daños sobre el ADN, inflamación crónica y especies reactivas de oxígeno, proceso que a su vez amplifica el daño sobre el material genético, alterando las distintas señales intracelulares que normalmente protegen al individuo de la proliferación tumoral. Fuente: Juan Andrés Castaño Bello. Et col. El Pterigión ¿una Lesión Tumoral? Revista Salud Bosque | volumen 1 | número 1 | Págs. 41-46 [73]

1.4 FLAVONOIDES

Los flavonoides son difenilpropanonas, comúnmente presentes en plantas y son frecuentemente componentes de la dieta del hombre. Los miembros de la familia incluyen a las flavonas, isoflavonas, y los 2,3-dihidro derivados de la flavona, denominados como flavanonas, las cuáles son interconvertibles con las chalconas isoméricas. Las flavanonas pueden someterse a una serie de transformaciones que afectan el anillo heterocíclico "C" (**Fig. 13**) para dar lugar a otros miembros de la familia de los flavonoides, como lo son las antocianinas y catequinas(39). Otra definición dice que los flavonoides son derivados del benzo- γ -pirano consistiendo en dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico del tipo pirano, siendo clasificados de acuerdo a sus sustituciones(40). Existen 14 clases de flavonoides en total.

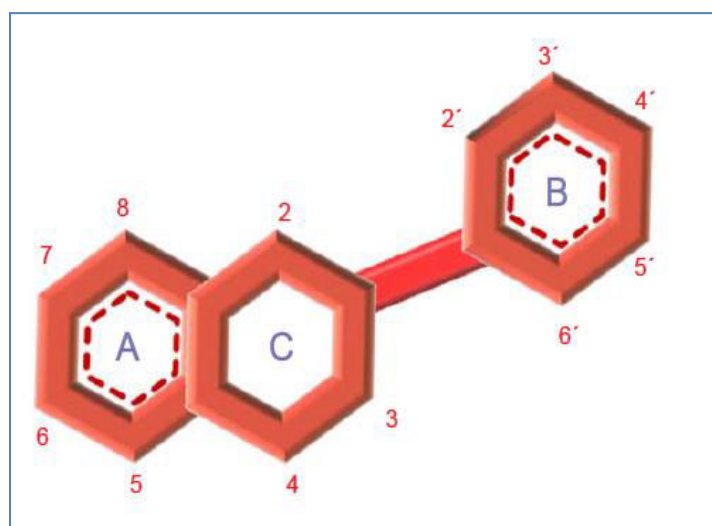


Fig. 13 Estructura de un Flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo. [46]

1.4.1 PROPIEDADES MEDICINALES DE LOS FLAVONOIDES

A un gran número de flavonoides se les ha encontrado diversas actividades a nivel biológico, tales como la prevención del cáncer [41], antibacteriana [42], antiinflamatoria [43], como reductores del riesgo de enfermedad cardiovascular, asociados a la prevención de neuropatologías [44], con potencial actividad antioxidante [45]. La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradores de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas, lipooxigenasas, ciclooxigenasas, mieloperoxidasas y la xantina oxidasa, evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroperóxidos orgánicos. También inhiben enzimas como la fosfolipasa A₂, al mismo tiempo estimulan a la catalasa y la superóxido dismutasa [46]. Asimismo, retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales, hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos, se ha corroborado la protección antioxidante en queratinocitos, fibroblastos dérmicos, ganglios sensoriales, endotelio y tejido nervioso. [47]

1.4.2 TIPOS DE FLAVONOIDES

Como ya se ha señalado anteriormente, los flavonoides cuentan con diferentes clases de acuerdo a su estructura química. (Fig. 14)

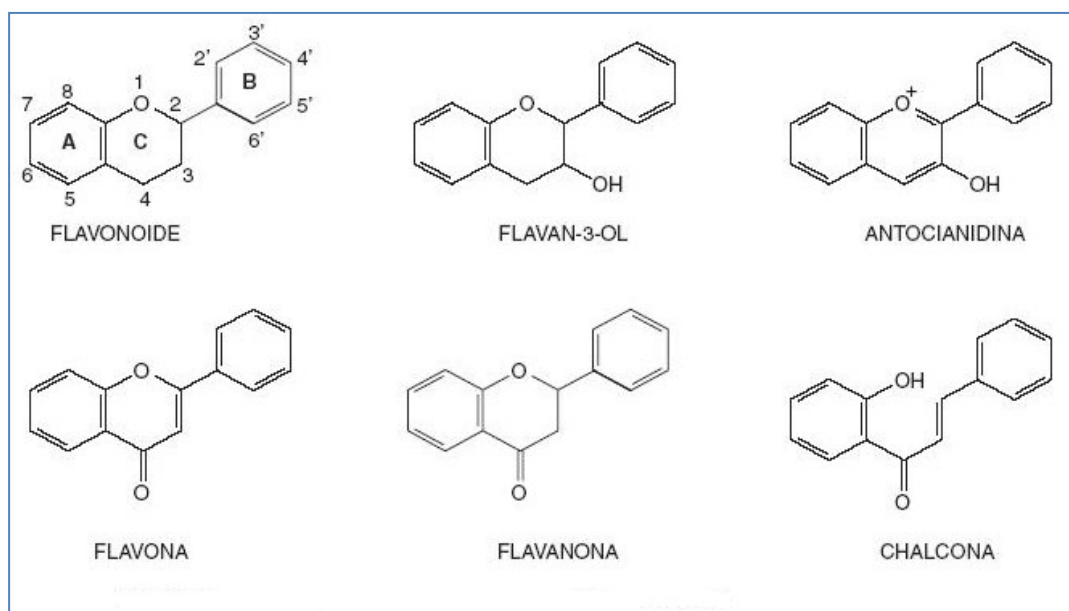


Fig. 14. Tipos de Flavonoides [40]

1.4.2.1 FLAVONAS: ESTRUCTURA

El término “flavona”, con el que es denominado este grupo particular de flavonoide, fue usado por primera vez en 1895 por Kostanecki and Tambor, pioneros en el estudio de la estructura de esta clase particular de flavonoides [48]

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS FLAVONAS:

Distintos miembros de este grupo han mostrado tener actividad biológica como la apigenina en la prevención de ciertos tipos de cáncer [49]; la luteolina que es identificada por sus propiedades como antiinflamatorias o como agentes anticancerígenos, quizá relacionados parcialmente a sus propiedades redox y estrógeno-reguladoras, y la chrisina, juntamente con la apigenina y la luteolina,

son inhibidores de la Kinasa ciclina-dependiente 9 (CDK-9) que induce la apoptosis en células cancerosas [50].

1.4.2.2 FLAVONOLES

Un flavonol es una flavona con un grupo hidroxilo en la posición 3. Según determinados estudios, se ha podido determinar que la “capacidad antioxidante equivalente a vitamina C ” es mayor que en las flavonas, es decir presenta una mayor capacidad de disminuir la actividad de los radicales libres, por la presencia del grupo hidroxilo en la posición 3, a diferencia de las flavonas. [81]

Actividad biológica de los flavonoles:

Los flavonoles son un grupo importante de flavonoides con actividad biológica demostrada; por ejemplo, la quercetina-3- β -O-glucósido ha demostrado tener efectos de alivio incluyendo cáncer, enfermedad renal y cardiovascular. El kaempferol-3-O-(3",4"-di-O-acetil- α -L-rhamnopyranósido tiene reportes de la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama humano, MCF-7 [51]

1.4.3 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS FLAVONOIDES

La detección de flavonoides naturales como antioxidantes, se lleva a cabo determinando su perfil como agentes que detienen la cadena de oxidación, o por evaluación de eliminar los radicales libres como compuestos donadores de hidrógeno por las propiedades reductoras de sus múltiples radicales hidroxilos unidos al anillo aromático, junto con su capacidad para deslocalizar al radical fenoxilo resultante. Otro tipo de acción la cual esta relacionada su actividad

antioxidante es su capacidad de quelar metales de transición, tales como hierro y cobre, cuyas formas reducidas (Fe^{2+} y Cu^+) son responsables de catalizar procesos perjudiciales en la formación de radicales libres (como el $\text{OH}\bullet$), por ejemplo la reacción de Fenton. [52] (Kehrer, J. P. Crit. Rev. Toxicol. 23 (1):21 – 48); 1993). Hay estudios de relación estructura actividad (SAR: “structure activity relationship”) que nos brindan un conocimiento de su farmacocinética. Estos mismos estudios dan a conocer la relación de los grupos y sustituciones en la estructura de los flavonoides en relación a su actividad antioxidante [42]. Las propiedades antioxidantes de los flavonoides cumplen un rol positivo en la nutrición del hombre y en la prevención de enfermedades, se debe señalar que existen algunos reportes de actividad mutagénica ligada a la actividad prooxidante de algunos flavonoides, ya que por su potencial redox, metales de transición y así, como ya se mencionó anteriormente, éstos pueden generar daño oxidativo [53].

II. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.1.1 Instalaciones

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de octubre del 2014 y junio del 2015, en el Laboratorio de Farmacología, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2.1.2 Materiales:

2.1.2.1 Muestra vegetal: Especie *Argemone mexicana*

El látex de *Argemone mexicana* (Cardo Santo), se colectó en la comunidad campesina del Anexo Huanipa Chilmay, Distrito Villa Chiara, Provincia de Andahuaylas, Departamento de Apurímac. (**Anexo 1**)

2.1.2.2 Animales de Experimentación

- a) Para la prueba de evaluación antiinflamatoria, se emplearon ratas hembras, Sprague Dawley con un peso comprendido entre 280 ± 20 g, adquiridos en el Bioterio de la Universidad Privada Cayetano Heredia (UPCH). Todos los animales fueron criados en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM; a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad controlada ($60 \pm 10\%$) y ciclos de luz-oscuridad (12:12 H), con libre acceso a comida y agua. (**Anexo 2**)

- b) Para la evaluación de toxicidad según dosis limite, se emplearon 10 ratones hembras, Balb/ C de 20 ± 5 g, adquiridos en el Bioterio de la

Universidad Privada Cayetano Heredia (UPCH). Todos los animales fueron criados en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM; a temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad controlada ($60 \pm 10\%$) y ciclos de luz-oscuridad (12:12 H), con libre acceso a comida y agua. **(Anexo 3)**

c) Para el Test de Irritación Ocular se emplearon tres conejos Nueva Zelanda, de 2 – 2.5 Kg de peso. Todos los animales fueron criados en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNMSM; a temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humedad controlada ($60 \pm 10\%$) y ciclos de luz-oscuridad (12:12 H), con libre acceso a comida y agua.

2.1.2.3 Fármacos y otros

✓ Diclofenaco 75 mg/ 3 mL, Dexametasona 4mg/mL, Suero Fisiológico 0.9%.

2.1.2.4 Material de Laboratorio

✓ Papel Whatman N°1, Capilares para Cromatografía, Beakers (20 mL, 50 mL, 250 mL), Tubos de ensayo, Fiolas (5mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL), Micropipetas (20 μL – 100 μL), Micropipetas (200 μL – 1000 μL), Micropipetas (1000 μL – 5000 μL), Probetas graduadas (100 mL – 250 mL), Pipetas (5 mL, 10 mL), Bagueta de vidrio, Picetas, Viales.

2.1.3 EQUIPOS

a) Rotavapor Heidolph® VV2000

- b) Estufa
- c) Balanza Analítica Ohaus[®] - Modelo AP110S
- d) Refrigeradora Inresa[®]
- e) Espectrofotómetro UV-visible, GENESYS[®] 6, número de serie 2M6M040001.
- f) Baño María Memmert[®]
- g) Pletismómetro digital LE7500[®]

2.1.4 SOLVENTES

- ✓ Etanol (Marca Merck), Metanol grado HPLC(Marca Merck), Butanol (Marca Merck), Ácido Acético (Marca Merck), Agua destilada, Hidróxido de Amonio (Marca Merck), Cloroformo (Marca Merck), N-Hexano (Marca Merck), Éter de Petróleo (Marca Merck), Acetona (Marca Merck), Benceno (Marca Merck), Cloroformo (Marca Merck), Acetato de Etilo (Marca Merck)

2.1.5 REACTIVOS QUÍMICOS

- ✓ Acetato de Potasio (1M), Nitrato de Aluminio 10%, Estándar Quercetina, DPPH (Marca: Sigma), λ -carragenina IV.

2.2 METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación es un estudio experimental, analítico, prospectivo y transversal. Se realizó de acuerdo al siguiente diseño experimental.

2.2.1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA Y TAXONÓMICA

La clasificación se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM, ubicado en Av Arenales 1256, Jesús María – Lima. Fue determinado según el Sistema de Clasificación de Cronquist 1998. (**Anexo 4**)

2.2.2 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

El látex de *Argemone mexicana* “Cardo Santo” fue recolectado en la comunidad de Huanipa Chillmay, distrito de Chiara, provincia de Andahuaylas, departamento de Apurímac en el mes de Junio del 2014. El extracto hidroalcohólico se preparó *in situ*.

2.2.3 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LÁTEX DE *Argemone mexicana*

Se sometió a un tratamiento de limpieza para eliminar todo elemento extraño, luego se realizó una incisión en el tallo y se procedió a recolectar el látex, la maceración del mismo se hizo con etanol al 70% por 15 días, con constante agitación y protegido de la luz en un frasco ámbar de boca ancha, transcurrido ese tiempo se filtró la solución con papel filtro, se concentró en Rotavapor Heidolph VV2000, la solución se llevó a evaporación por calor seco en estufa a una temperatura de 60°C hasta su completa evaporación.

2.2.4 ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

Tiene como objetivo estudiar los aspectos botánicos, químicos y biológicos de la droga destinada a la preparación de medicamentos.

2.2.4.1 MARCHA DE SOLUBILIDAD

Instalaciones: Centro de Control Analítico (CCA), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Tiene como objetivo determinar la capacidad de asociación en términos de constante dieléctrica, por ello compuestos polares se disuelven en solventes polares, compuestos apolares se disuelven en solventes apolares.

En una batería de tubos de ensayo se colocó una pequeña cantidad del extracto hidroalcohólico seco, se le agregó a cada uno 2 mL de solvente en el siguiente orden: n-hexano, éter de petróleo, acetona, benceno, cloroformo, acetato de etilo, n-butanol, metanol, etanol y agua destilada, se agitó vigorosamente y se observaron los resultados.

2.2.4.2 MARCHA FITOQUÍMICA

Instalaciones: Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios de la especie vegetal.

2.2.4.2.1 Reacción de Molish: Se añadió una gota del reactivo de Molish al extracto reconstituido, se agitó, luego se agregó en zona gotas de ácido sulfúrico concentrado, se dejaron deslizar por las paredes del tubo y si al colocar en posición vertical se observa la formación de un anillo color violeta que separa las dos fases, indica la presencia de carbohidratos.

2.2.4.2.2 Reacción con Tricloruro de Hierro: Unas gotas de la solución sobre el extracto reconstituido, el color azul nos indica la presencia de compuestos fenólicos.

2.2.4.2.3 Reacción con gelatina/cloruro de sodio: Unas gotas del reactivo al extracto reconstituido. Un precipitado denso blanco indica la presencia de taninos. Esta prueba se complementa con la reacción de tricloruro de hierro.

2.2.4.2.4 Reacción de Ninhidrina: Se agregaron gotas del reactivo de ninhidrina al extracto reconstituido, se calentó, el color violáceo indica la presencia de aminoácidos libres y aminogrupos.

2.2.4.2.5 Reacción de Shinoda: Se agregaron granallas de magnesio sobre el extracto previamente reconstituido con metanol G.R, luego dos gotas de ácido clorhídrico concentrado. El cambio a tonos rojos (rojizo, amarillo, naranja) depende del tipo de flavonoide, característico para identificar núcleos de los flavonoides comunes.

2.2.4.2.6 Reacción de Bortranger: Se agregaron dos gotas de reactivo en el extracto reconstituido. El color rojo intenso indica la presencia de quinonas.

2.2.4.2.7 Reacción de Dragendorff: Se agregaron unas gotas del reactivo sobre el extracto previamente reconstituido, se agitó y dejó reposar unos minutos. Un precipitado de color rojo o naranja indica la presencia de alcaloides.

2.2.4.2.8 Reacción de Mayer: Se agregaron unas gotas del reactivo al extracto reconstituido, se agitó y dejó reposar unos minutos. Un precipitado blanco inmediato, indica la presencia de alcaloides.

2.2.4.2.9 Reacción de Rosenheim: Se agregaron gotas del reactivo de Rosenheim sobre el extracto reconstituido. El color rojo oscuro indica la presencia de antocianinas y flavonoides catéquicos.

2.2.4.2.10 Reacción de Vainillina Sulfúrica: Se agregaron gotas del reactivo sobre el extracto reconstituido. La formación de una anillo color violáceo en la interfase indica la presencia de glicósidos.

2.2.4.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Instalaciones: Laboratorio de Investigación de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

Tiene como objetivo la separación de los componentes de las mezclas, la Cromatografía en papel se fundamenta en que las sustancias problema, pueden tener diferentes coeficientes de reparto en dos disolventes de inmiscibilidad limitada, uno permanece fijo en la superficie del papel “fase estacionaria” generalmente en agua, la fase móvil constituida generalmente por una mezcla de disolventes parcialmente miscibles en ella. La separación se realiza en función de la afinidad de los solutos con las dos fases, las más solubles en agua se quedarán cerca del punto donde se aplicó la muestra, y las menos solubles en agua y más solubles en el disolvente llegarán más lejos. Hay varios tipos de cromatografía, la ascendente (papel hacia arriba), descendente (papel invertido),. En el presente estudio se realizó la cromatografía preparativa en papel, es decir purificamos suficiente cantidad para un uso posterior.

Fraccionamiento y Purificación

Se realizó mediante la cromatografía preparativa descendente sobre papel Whatman N°1, cuya medida fue de 12 cm de ancho por 60 cm de largo, como fase móvil se usó BAA (n- Butanol – ácido acético – Agua, en una proporción de 4:1:5), durante 30 horas. Los cromatogramas obtenidos fueron examinados con luz UV y NH₃/UV, cada banda fue cortada y eluida con metanol y analizada mediante reacción de Shinoda.

2.2.4.4 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-V.

2.2.4.4.1 Tratamiento de la Muestra

Se pesó 1g de extracto hidroalcohólico seco de látex de *Argemone mexicana* en un Erlenmeyer de 50 mL, se añadió 20 mL de etanol al 80% , posteriormente se llevó al ultrasonido a 60°C por 30 minutos, se filtró y se vertió el filtrado en una fiola de 25 mL , se enrasó con etanol al 80%, luego se tomó 100 µL de esta dilución y se vertió en una fiola de 10 mL, a la cual se añadió 200 µL de solución de acetato de potasio 1M y 200 µL de Nitrato de Aluminio al 10% y se enrasó con etanol al 80%, se dejó reposar por 40 minutos y se procedió a leer a 415 nm. El análisis se realizó por duplicado.

2.2.4.4.2 Preparación de Curva de Calibración

Se pesó 2,7 mg de Quercetina en una fiola de 10 mL y se llevó a volumen con etanol al 80%. Se prepararon soluciones de 700, 350, 175 y 100 µL en 4 fiolas de 10 mL, y se añadió en cada uno 200 µL de acetato de potasio 1M y 200 µL de Nitrato de Aluminio al 10% en cada una; finalmente se llevó a volumen con etanol al 80%. Se procedió a leer a 415 nm cada solución y se elaboró la curva estándar.

2.2.4.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIRRADICAL LIBRE POR EL MÉTODO DEL DPPH

Fue realizada empleando la metodología de Brand-Williams para determinar la actividad antirradical libre de nuestra muestra problema.

FUNDAMENTO

2,2-Difenil-2-Picrilhidrazilo (DPPH) es un radical libre estable. Al aceptar un hidrógeno de un dador correspondiente sus soluciones pierden su coloración púrpura característica ($\lambda_{\text{máx}}$ 515-517 nm). [78]

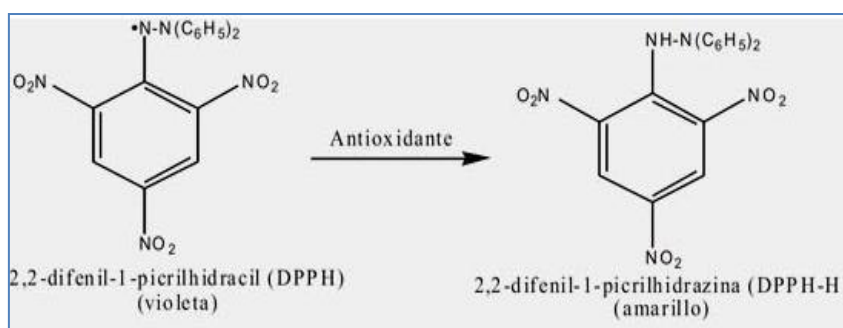


Fig. 15 Reacción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. (DPPH) [79]

Procedimiento:

Se procedió a realizar diluciones de la muestra problema y del estándar de vitamina C, de acuerdo a los siguientes esquemas de trabajo.

- Patrón de DPPH: Se pesaron 2 mg de DPPH en una fiola de 100 mL y se enrasó con metanol.
- Estándar: Se pesaron 2.4 mg de vitamina C en una fiola de 100 mL, se enrasó con agua destilada, se preparó la solución madre a una concentración de 24 μ g/mL de la cual se prepararon las disoluciones de 2.4; 2; 1.6; 1.2; 0.8 y 0.4 μ g/mL.
- Muestra problema: Se pesaron 3 mg del extracto seco de látex de *Argemone mexicana* en un tubo falcón y se enrasó a 10 mL con

metanol, llegando a una concentración inicial de 300µg/mL. Y luego se prepararon las disoluciones de 100; 75; 50; 25; 20; 15 y 10 µg/mL.

Posterior a ello, se adicionó 1.6 mL de la solución 2mg % de DPPH, se colocó en oscuridad por 30 minutos y se procedió a realizar la lectura en el espectrofotómetro a 517 nm. El blanco para calibrar el espectrofotómetro fue: 4ml de metanol y 2ml de agua destilada.

Tabla N°1 Esquema de trabajo con el DPPH y la muestra, previo a las lecturas al espectrofotómetro.

Volumen de la muestra	Solución de DPPH	Concentración final	Lectura de absorbancia a 517 nm, por duplicado.
0.8 mL de 300 µg/mL	1.6 mL	100 µg/mL	
0.8 mL de 225 µg/mL	1.6 mL	75 µg/mL	
0.8 mL de 150 µg/mL	1.6 mL	50 µg/mL	
0.8 mL de 75 µg/mL	1.6 mL	25 µg/mL	
0.8 mL de 60 µg/mL	1.6 mL	20 µg/mL	
0.8 mL de 45 µg/mL	1.6 mL	15 µg/mL	
0.8 mL de 30 µg/mL	1.6 mL	10 µg/mL	

*Asimismo se realizaron lecturas de los Blancos de las muestras, dado que contaban con una ligera coloración.

Metanol	Solución de DPPH	Lectura de absorbancia a 517 nm, por triplicado.
0.8 mL	1.6 mL	

Cálculos:

$$\% \text{Captación de radical libre} = 1 - \frac{Abs_{MP} - Abs_{Blanco de MP}}{Abs_{DPPH}} \times 100$$

Luego, se calculó una ecuación de la recta teniendo como eje de las abscisas a la concentración final de la muestra y como eje de las ordenadas, al porcentaje de captación de radical libre. El IC₅₀ fue la concentración de muestra que tuvo un 50% de captación de radical libre.

2.2.5 ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

2.2.5.1 Determinación de la Toxicidad Aguda por el Método de Dosis Límite

Se procedió según OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP), Test Guideline 425. 2008 [70]

FUNDAMENTO:

La Prueba Límite es una prueba secuencial que usa como máximo cinco animales.

Pueden usarse como dosis de prueba límite 2000 mg/kg o excepcionalmente 5000 mg/kg.

Procedimiento:

- La dosis se basó en el uso etnofarmacológico de la planta, el consumo de hojas en infusión de un peso aproximado de 1.5 g para una persona de un peso de 60 kg.
- Se trabajó con ratones hembras, cepa Balb/C, de un peso de 18 – 20 g
- Se formaron cinco grupos de dos ratones cada uno, la vía de administración fue oral.
- Se observó las primeras 7 horas y luego diariamente por 14 días.
- La administración fue la siguiente:

Tabla N° 2 Dosis administrada para la prueba de DL50

GRUPO	Volumen Administrado	Dosis (mg/Kg)	Dosis (g/Kg)
GRUPO 1	0.4 mL	20 000	20
GRUPO 2	0.25 mL	2500	2.5
GRUPO 3	0.25 mL	250	0.25
GRUPO 4	0.25 mL	25	0.025
GRUPO 5	0.25 mL	2.5	0.0025

2.2.5.2 TEST DE IRRITACIÓN OCULAR

El ensayo fue conducido según el método descrito en la normativa N° 405 de la OECD (OECD Guideline for testing of chemical. Acute eye irritation/corrosion. N° 405. Adoptada 2002). [74]

- Para el Test de Irritación Ocular se emplearon 3 conejos, 24 h previas al ensayo, fueron sometidos a un examen riguroso de sus estructuras oculares (córnea, iris y conjuntiva) para descartar la presencia de algún daño.
- El día del ensayo fueron instilados 0,1 mL de la sustancia en el ojo derecho de 3 animales. El ojo izquierdo fue tomado como control. Ambos ojos fueron examinados aproximadamente a las 1, 24, 48 y 72 h de la aplicación inicial con el fin de detectar daños de las estructuras oculares antes mencionadas.
- Las observaciones se realizaron con luz blanca para detectar presencia de eritema, edema y secreciones anormales además de la reacción del iris a la luz. Las reacciones oculares observadas fueron evaluadas de

acuerdo con la escala para evaluar lesiones oculares, se determinó el índice de irritación ocular (IIO). [74]

2.2.5.3 Determinación de la Actividad Antiinflamatoria

2.2.5.3.1 Fundamento del método del Edema Pedal Inflamatorio inducido por Carragenina

El método del Edema pedal inducido por carragenina, fue descrito por primera vez por Winter et al. [75] y posteriormente modificado por Sughisita et al [76]. (1981), consiste en la administración subcutánea o subplantar de un agente flogógeno, la carragenina tipo lambda (λ -carragenina).

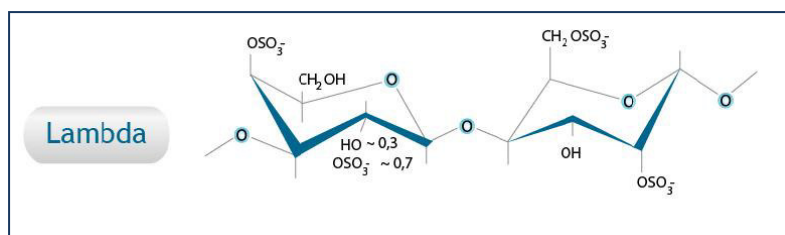


Fig. 16 Estructura de lambda Carragenina (77)

Este mucopolisacárido sulfatado es extraído del alga marina *Chondrus crispus*, [77] esta prueba es usada ampliamente para determinar la actividad anti-inflamatoria y constituye un modelo animal simple para la evaluación de dolor en el sitio de la inflamación sin ningún tipo de lesiones o daños a la pata inflamada, la que provoca una respuesta inflamatoria a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, la respuesta antiinflamatoria esta mediada por diferentes autacoides, en la primera fase, que se extiende durante la primera hora, intervienen aminas vasoactivas como la serotonina e histamina, mientras que en la segunda fase, comprendida entre 1,5 y 2,5 horas, intervienen las cininas.

En una fase temprana desde las 2,5 a las 4 horas, actúan las prostaglandinas PGE1, PGE2, PGF2 como principales mediadores y en la fase tardía entre las 4 y 6 horas la respuesta vascular se hace máxima y estable.

Puede ser bloqueado por los AINEs, este es el momento idóneo para el ensayo de agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales reducen el edema actuando sobre la síntesis de derivados de la actividad antiinflamatoria.

2.2.5.3.2 Técnica para la medición con el Pletismómetro Digital LE7500

Fundamento:

Se basa en la medición del volumen de un órgano en reposo, el cual varía con el estado de la circulación local, dependiendo tanto de la circulación activa arterial, como de los capilares, edema tisular y circulación de retorno. La introducción de la pata del animal en la vasija volumétrica cambia el nivel de líquido y la conductividad entre dos electrodos de platino previamente introducidos en la vasija sensora. **(Fig. 17)**.

Este cambio de conductividad entre los dos electrodos genera una señal de salida indicando el valor del volumen desplazado y por consecuencia el volumen de la pata. [75], [76],[78].



Fig. N° 17 Pletismómetro Digital LE7500 (78)

Procedimiento:

- Se prepara una solución de concentración de 0.2% peso/volumen de NaCl, se añade 15 gotas de Tritón por cada litro de solución (para evitar que por tensión superficial el agua forme menisco cóncavo en las paredes de la vasija)
- Se procede a calibrar el equipo, llenar el recipiente con la solución preparada, se abre la válvula para llenar la vasija volumétrica y sensora, llenar la vasija hasta que la solución salina llegue a la marca.
- Se sumerge el calibre de volumen de 3 mL, se lleva a cero el equipo, y se procede a realizar la medición.
- Se determina la variación de volumen de las extremidades del roedor, la pata posterior de la rata es marcada e introducida en el recipiente, midiendo la variación de nivel de líquido.
- Se presiona el pedal para memorizar la lectura, se anota, se vuelve a presionar el pedal para liberar la pantalla.
- Se repite los pasos para una nueva medición.

2.2.5.3.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Las ratas fueron aclimatadas durante una semana a temperatura ambiente entre 21 – 25°C y 50% a 60% de humedad con 12 horas luz/ oscuridad, posteriormente, fueron sometidas a ayuno con libre acceso de agua 12 horas antes del inicio del ensayo. Durante el experimento se realizó la restricción total del agua. Luego fueron distribuidas aleatoriamente en 6 grupos de 6 ratas y tratados vía oral de la siguiente manera:

- Grupo Control: Carragenina
- Grupo Patrón: Diclofenaco (50 mg/kg)
- Grupo Patrón: Dexametasona (0.04 mg/kg)
- Grupo Tratamiento A: Extracto Hidroalcohólico 200 mg/kg
- Grupo Tratamiento B: Extracto Hidroalcohólico 400 mg/kg
- Grupo Tratamiento C: Extracto Hidroalcohólico 600 mg/kg
- Grupo Tratamiento D: Extracto Hidroalcohólico 800 mg/kg

Tabla N° 3 Diseño experimental para el Edema pedal inducido

DISEÑO EXPERIMENTAL				
SUSTANCIAS	DOSIS (mg/kg)	Volumen Administrado	Carragenina 1% (mL)	Número de Animales
Control Carragenina 0.1%			0.1 mL	6
Estándar 1 Diclofenaco	50mg/kg	1.5 mL	0.1 mL	6
Estándar 2 Dexametasona	0.04 mg/kg	1.5 mL	0.1 mL	6
Extracto A	200 mg/kg	1.5 mL	0.1 mL	6
Extracto B	400 mg/kg	1.5 mL	0.1 mL	6
Extracto C	600 mg/kg	1.5 mL	0.1 mL	6
Extracto D	800 mg/kg	1.5 mL	0.1 mL	6

- Media hora luego de la administración se inyectó 0.1 mL de Carragenina al 1% en la aponeurosis subplantar de la pata izquierda posterior y la pata derecha no inyectada fue considerada como control.
- El volumen de la pata inyectada se determinó con el Pletismómetro antes de la administración y 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 minutos después de la administración de la Carragenina. El edema se expresó como el incremento del volumen (mL) de la pata inducido por Carragenina.

2.2.5.2.4 EFICACIA ANTIINFLAMATORIA

Se define eficacia antiinflamatoria de un agente dado, como la acción que contrarresta la inflamación producida por la Carragenina, matemáticamente se expresa de la forma siguiente

$$X = [(B/B_0 - V/V_0) / B/B_0] \times 100$$

Dónde:

B/B_0 : Es el incremento del volumen del blanco debido a la inflamación, referido al volumen inicial B_0 del mismo, esto es estandarizado.

V/V_0 : Es el incremento estandarizado de volumen inflamado, pero tratado con un agente antiinflamatorio.

X = Es la disminución porcentual del volumen causado por la inflamación, para cada momento de observación experimental.

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los resultados de la actividad antiinflamatoria se empleó el programa SPSS versión 22. Los datos fueron analizados con la prueba ANOVA. Cuando el valor de p obtenido a partir de ANOVA fue

significativo (la significación estadística fue determinada para $p < 0,05$), se aplicó la prueba de Tukey para probar las diferencias entre los grupos.

III. RESULTADOS

MARCHA DE SOLUBILIDAD

TABLA N° 4. Marcha de solubilidad del Extracto Hidroalcohólico de Látex de *Argemone mexicana* (“Cardo santo”)

SOLVENTES	GRADOS DE SOLUBILIDAD	RESULTADO
N – Hexano	++	Soluble
Éter de Petróleo	-	Insoluble
Benceno	-	Insoluble
Acetona	+	Poco Soluble
Cloroformo	+	Poco Soluble
Acetato de Etilo	-	Insoluble
Butanol	+	Poco Soluble
Etanol	+	Poco Soluble
Metanol	++	Soluble
Agua destilada	+++	Muy soluble

LEYENDA:

(-) = Insoluble (+) = Poco soluble (++) = Soluble (+++) = Muy soluble

MARCHA FITOQUÍMICA

TABLA N° 5. Marcha Fitoquímica del Extracto Hidroalcohólico de Látex *Argemone mexicana* (“Cardo santo”)

REACCIÓN DE	METABOLITO SECUNDARIO	RESULTADO	CONCENTRACIÓN
MOLISCH	CARBOHIDRATOS	ANILLO EN ZONA COLOR VIOLETA	+++
R. CLORURO DE FIERRO	FENOLES	PRECIPITADO AZUL	+++
R. GELATINA	TANINOS	PRECIPITADO BLANCO	+++
R. NINHIDRINA	AMINOÁCIDOS Y GRUPOS AMINAS	COMPLEJO AZUL VIOLETA	++
R. SHINODA	FLAVONOIDES	LIGERAMENTE ROJIZA	++
R. BORTRANGER	QUINONAS	COLORACIÓN ROJA	+++
R. DRAGENDORFF	ALCALOIDES	PP. ROJIZO	+++
R. MAYER	ALCALOIDES	PP. BLANCO	+++
R. ROSENHEIM	LEUCOANTOCIANIDINAS	PP. LIGERAMENTE ROJO OSCURO	+
R. VAINILLINA SULFÚRICA	GLICÓSIDOS	SE OBSERVA EL ANILLO	+

LEYENDA:

(-) = Ausencia (+) = Leve (++) = Moderado (+++) = Abundante

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

TABLA N° 6 Análisis de las bandas cromatográficas en papel eluidas con metanol y características espectrofotométricas UV/Visible (Anexo 6)

Eluatos de las fracciones obtenidas por cromatografía en papel		Con NH ₃ en la lámpara de luz UV	Shinoda	Bandas espectrales UV	
Fracción	Color en lámpara UV			Banda I	Banda II
1	Celeste débil	No cambia	Rosado		
2	Amarillo fluorescente	No cambia	-	349	274

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE FLAVONOIDES POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-V

En la determinación de flavonoides por espectrofotometría UV, se utilizaron el reactivo acetato de potasio y nitrato de aluminio para la cuantificación de flavonoides totales expresados como quercetina. Donde se obtuvo una concentración de: 4.94 mg de quercetina / 100 g de muestra seca. **(Anexo 7)**

TABLA N° 7 Resultado de la Cuantificación de Flavonoides del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* ("Cardo santo")

Patrones de Quercetina	Concentración de Quercetina (mg/mL)	Absorbancia (nm)
P1	0.027	0.190
P2	0.4725	0.334
P3	0.945	0.639
P4	0.189	1.236

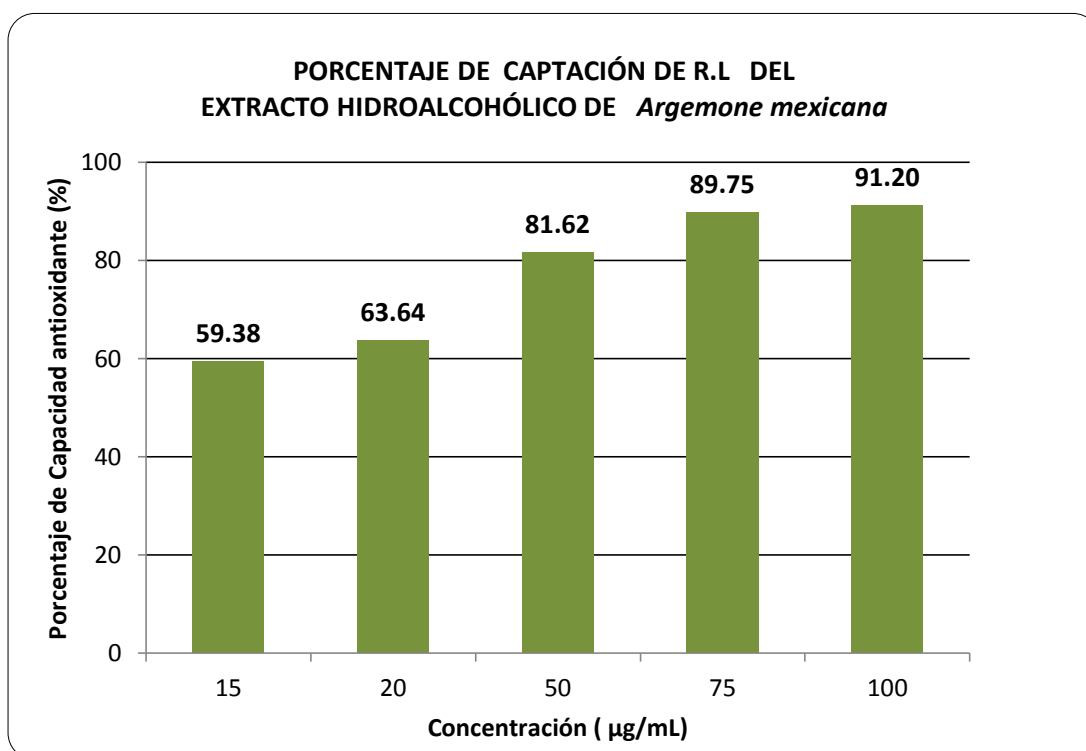
Muestra Problema (mg/mL)	Concentración ($\bar{X} \pm DE$)	Absorbancia (nm) ($\bar{X} \pm DE$)
M	4.9404±0.0018	0.327 ± 0.0014

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

TABLA. N° 8 Capacidad Antioxidante del Extracto Hidroalcohólico de Latéx de *Argemone mexicana*

Muestra	Conc.	Absorbancia	IC 50 (µg/mL)
Extracto Hidro-Alcohólico	100	0.034	51.43
	75	0.043	
	50	0.094	
	20	0.187	
	15	0.210	

TABLA N° 9 Porcentaje de Captación de R.L del extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana*.



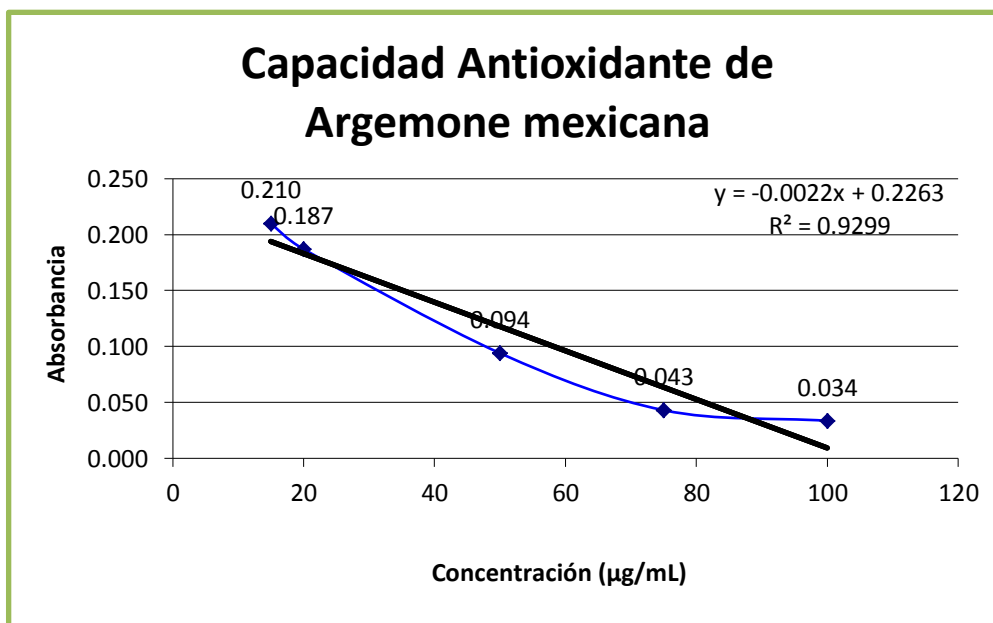


Fig. 18 Capacidad Antioxidante del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana*.

ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

TABLA N° 10 Resultados de la determinación de la toxicidad aguda DL 50 del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana*. [70]

Dosis (mg/Kg)	Clasificación	8 ratones BALB/C, de 20 a 25 g de peso.	Número de Ratones muertos
< 25	Muy Tóxica	2	0
< 200	Tóxica	2	0
< 2000	Dañina	2	0
> 2000	No Clasificado	2	0

TEST DE IRRITACIÓN OCULAR

TABLA N° 11 Grado de Lesiones Oculares

ANIMALES	ESTRUCTURAS DEL OJO	1 HORA	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS	SUMA
CONEJO 1	CORNEA	1	0	0	0	1
	CONJUNTIVA	4	0	0	0	4
	IRIS	0	0	0	0	0
CONEJO 2	CORNEA	1	0	0	0	1
	CONJUNTIVA	4	0	0	0	4
	IRIS	0	0	0	0	0
CONEJO 3	CORNEA	1	0	0	0	1
	CONJUNTIVA	4	0	0	0	4
	IRIS	0	0	0	0	0
SUMA TOTAL						15
ÍNDICE DE IRRITACIÓN OCULAR (IIO)						1,25

TABLA N° 12 Clasificación de las sustancias según su irritabilidad oftálmica (OECD)

CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS SEGÚN SU IRRITABILIDAD OFTÁLMICA (OECD)	
NO IRRITANTE (NI)	0 - 15
MODERADAMENTE IRRITANTE (MI)	15-30
IRRITANTE (I)	30 – 50
MUY IRRITANTE (MI)	50 - 110

- La suma de los valores de los valores de las diferentes lecturas efectuadas en cornea, iris y conjuntiva permitió calcular el Índice de Irritabilidad Oftálmica, el cual fue de un valor de 1.25, lo que clasifica al producto como no irritante ocular, según lo establecido por la OECD.

CURVAS DE EFICACIA ANTIINFLAMATORIA

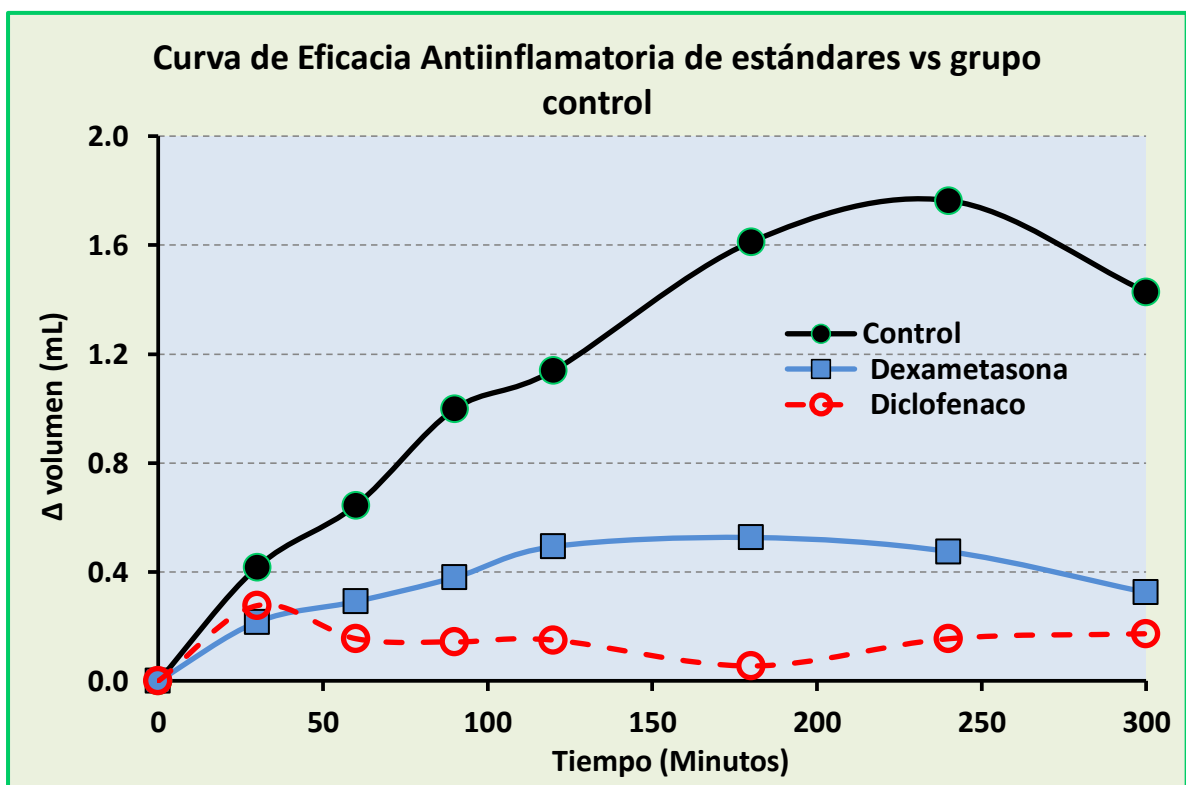


Fig. 19 Curva de Eficacia Antiinflamatoria de estándares vs Grupo Control.

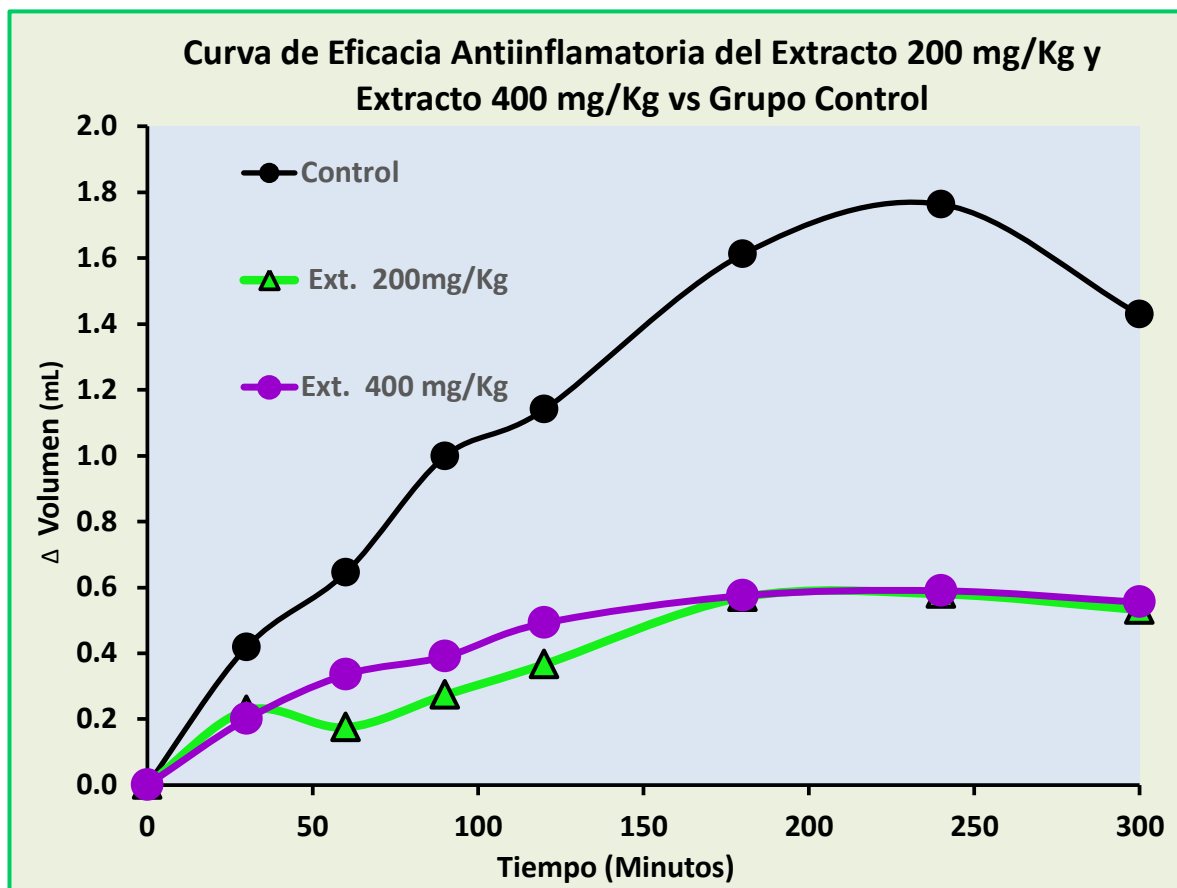


Fig. 20 Curva de Eficacia Antiinflamatoria del Extracto 200 mg/kg y Extracto 400 mg/kg vs Grupo Control

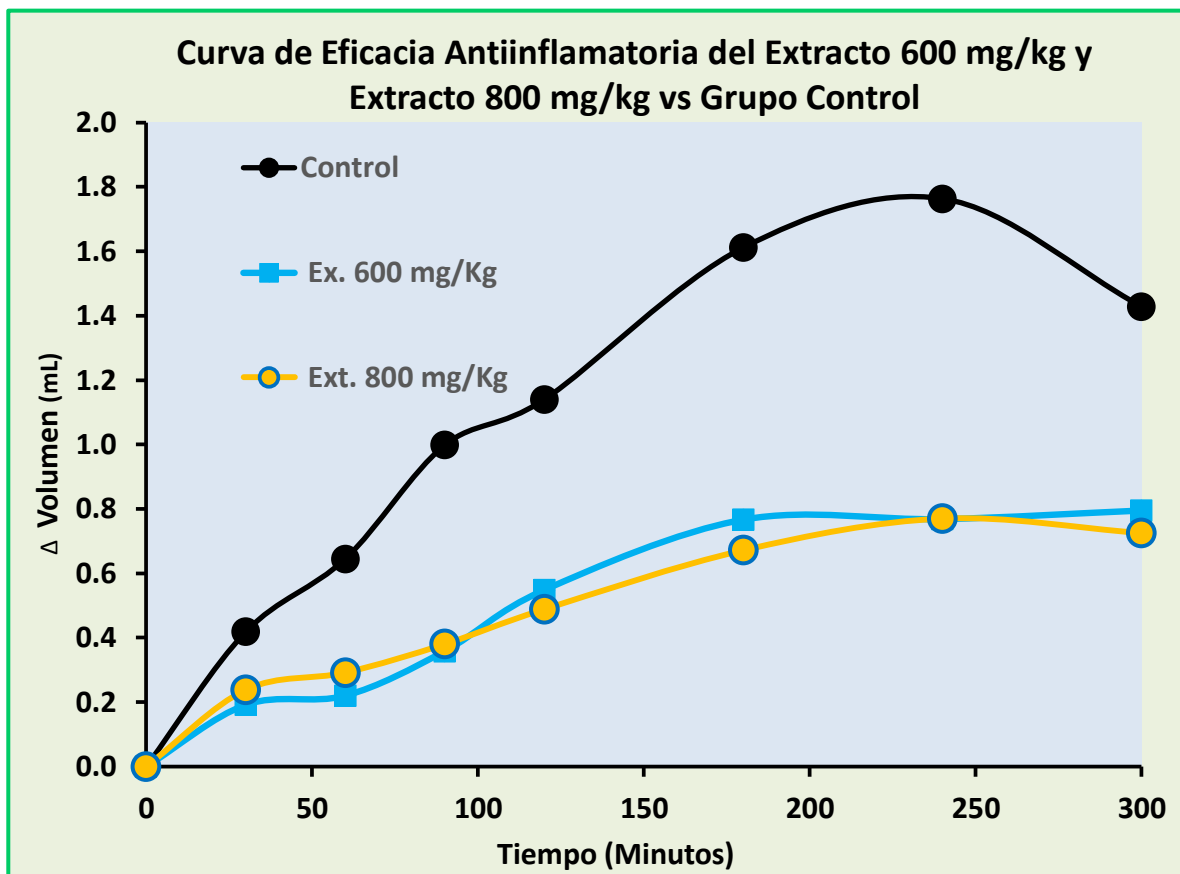


Fig. 21 Curva de Eficacia Antiinflamatoria del Extracto 600 mg/kg y Extracto 800 mg/kg vs Grupo Control

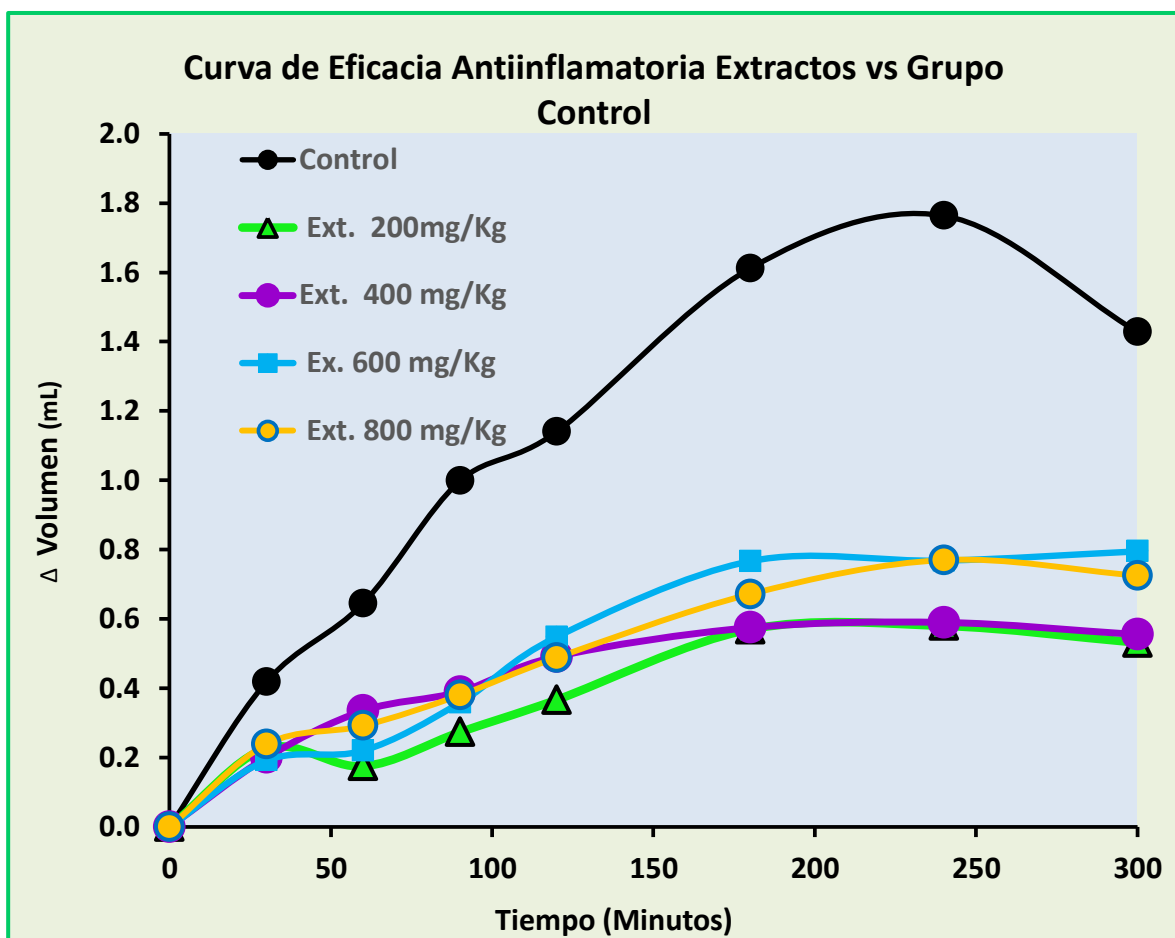


Fig. 22 Curva de Eficacia Antiinflamatoria Extractos vs Grupo Control

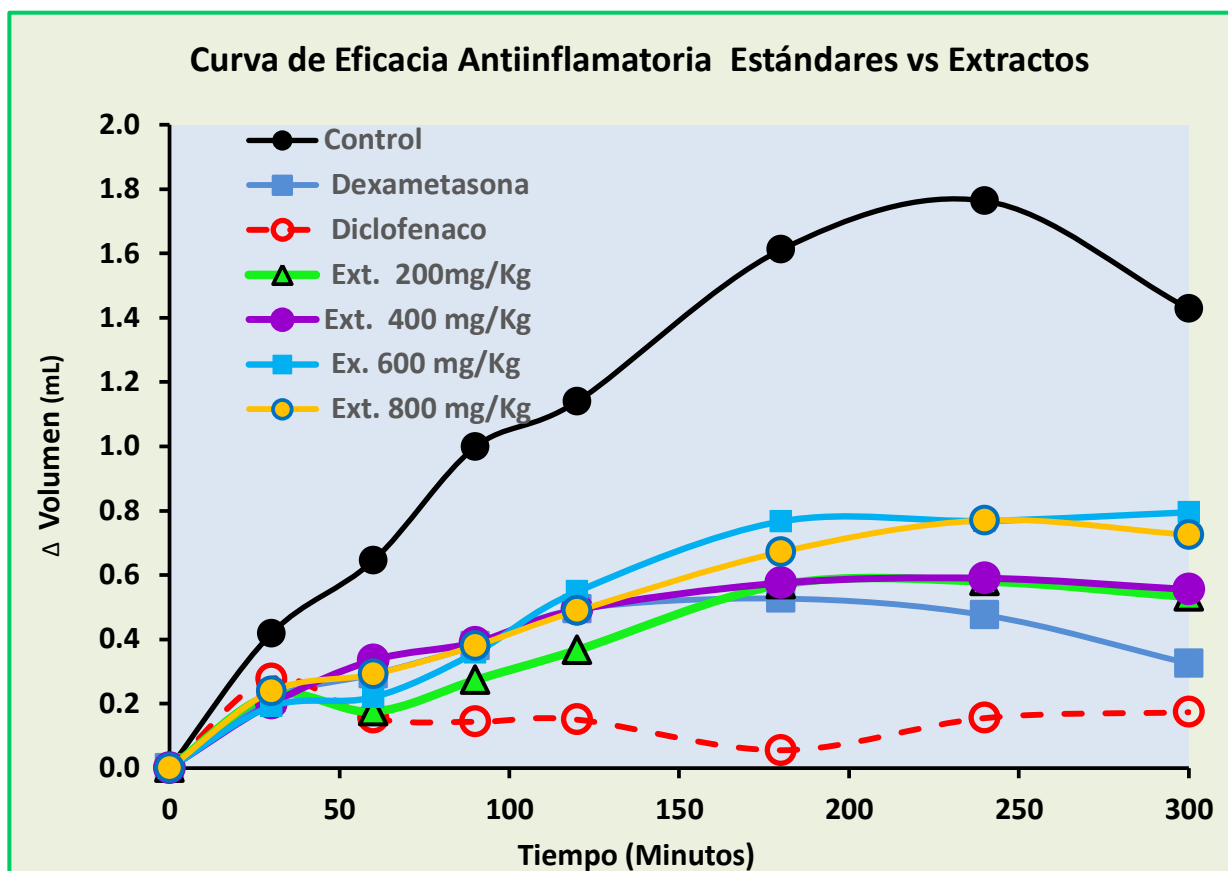


Fig. 23 Curva de Eficacia Antiinflamatoria Estándares vs Extractos.

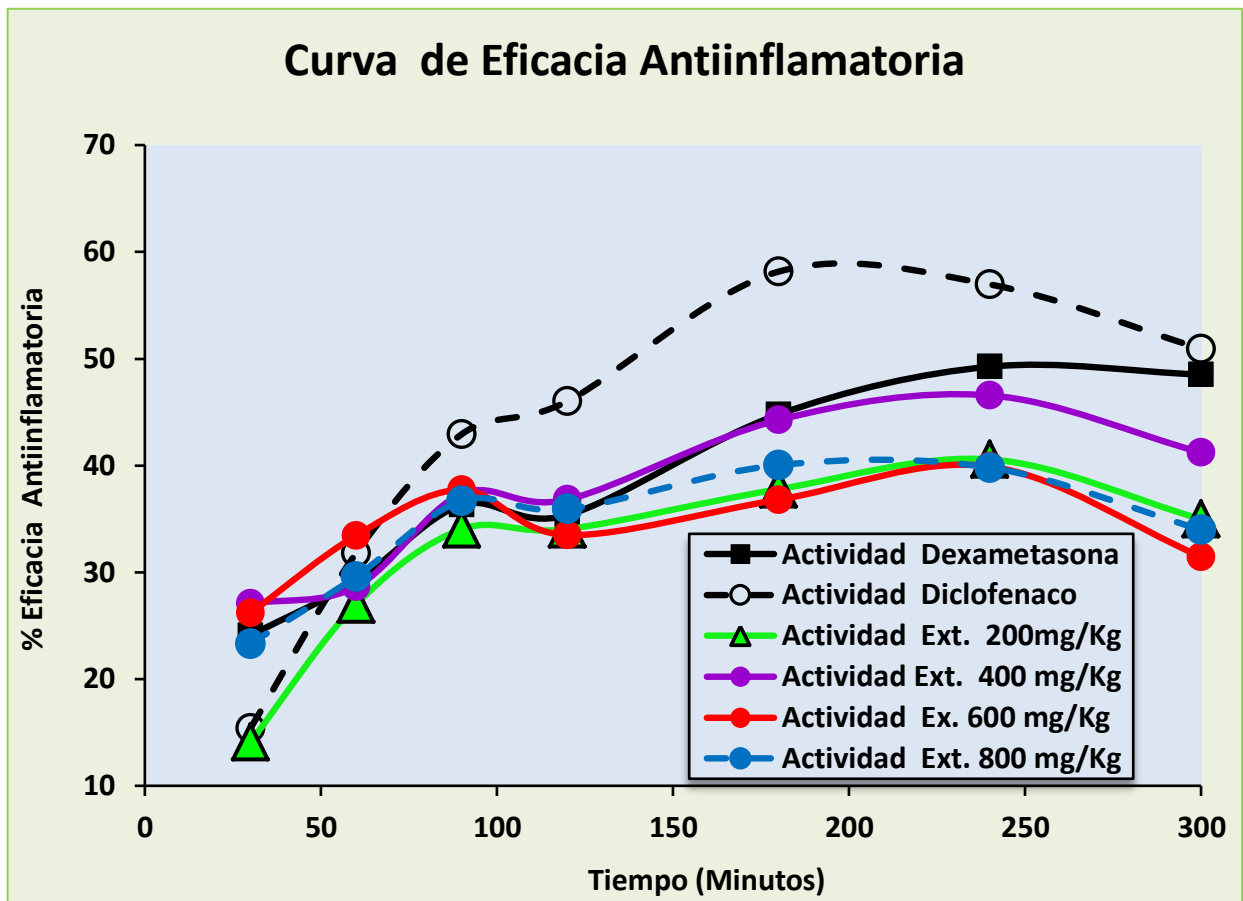


Fig. 24 Curva de Eficacia Antiinflamatoria.

EFICACIA ANTIINFLAMATORIA

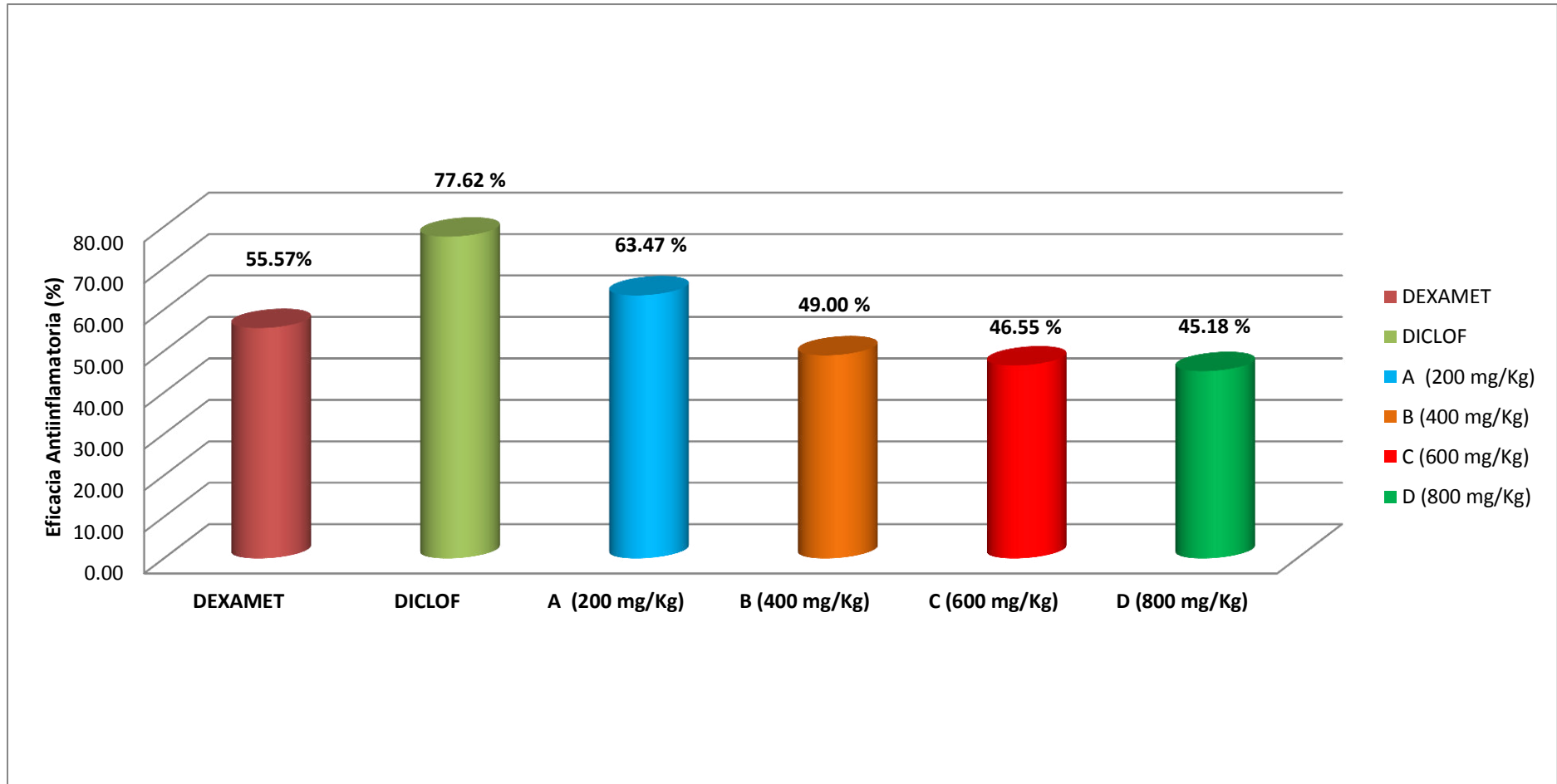


Fig. 25 Eficacia Antiinflamatoria

2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

TABLA N° 13 Actividad antiinflamatoria según tratamientos a la hora

	N	Media	Desviación típica	ANOVA
Grupo Dexametasona (X)	6	0,29	0,14	0,21
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,16	0,12	
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,18	0,13	
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,34	0,10	
Grupo Extracto (C) 600 mg/kg	6	0,22	0,11	
Grupo Extracto (D) 800 mg/kg	6	0,29	0,22	

$p=0,21 >0,05$ no existe diferencias significativas

No se encontró diferencias significativas entre los tratamientos

TABLA N° 14 Actividad antiinflamatoria según tratamientos a la hora y media

	N	Media	Desviación típica	ANOVA
Grupo Dexametasona (X)	6	0,38	0,10	0,13
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,14	0,18	
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,27	0,15	
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,39	0,23	
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,36	0,14	
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,38	0,21	

TABLA N° 15 Actividad antiinflamatoria según tratamientos a las dos horas

Tratamientos	N	Media	Desv. típica	ANOVA	Prueba de Tukey					
					Grupo Dexam (X)	Grupo Diclof. (D)	Grupo extracto (A) 200 mg/Kg	Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	Grupo Extracto (C) 600 mg/Kg	Grupo Extracto (D) 800 mg/Kg
Grupo Dexametasona (X)	6	0,49	0,10	0.01*		**P=0.03				
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,15	0,14					**P=0.04	**P=0.01	**P=0.04
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,37	0,20							
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,49	0,25							
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,55	0,17							
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,49	0,24							

*p<0,05 **P<0,05

De la tabla se aprecia que se encontró que la media Actividad antiinflamatoria Grupo Dexametasona es mayor significativamente $P < 0,05$ en relación a la media Actividad antiinflamatoria Grupo Diclofenaco, asimismo se encontró que media Actividad antiinflamatoria Grupo Diclofenaco es menor estadísticamente significativo en relación a la media de la actividad inflamatoria del Grupo extracto (B) 400 mg/kg , ($P < 0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo Extracto (C) 600 mg/kg, ($P < 0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo Extracto (D) 800 mg/kg , ($P < 0,05$)

TABLA N° 16 Actividad antiinflamatoria según tratamientos a las tres horas

Tratamientos	N	Media	Desv. típica	ANOVA	Prueba de Tukey					
					Grupo Dexam (X)	Grupo Diclof. (D)	Grupo extracto (A) 200 mg/Kg	Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	Grupo Extracto (C) 600 mg/Kg	Grupo Extracto (D) 800 mg/Kg
Grupo Dexametasona (X)	6	0,53	0,08	0,000*		**P=0.000				
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,06	0,15				**P=0.000	**P=0.000	**P=0.000	**P=0.000
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,57	0,25							
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,58	0,18							
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,77	0,09							
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,67	0,20							

*p<0,05 **P<0,05

De la tabla se aprecia que se encontró que la media Actividad antiinflamatoria Grupo Dexametasona es mayor significativamente $P<0,05$ en relación a la media Actividad antiinflamatoria Grupo Diclofenaco, asimismo se encontró que media Actividad antiinflamatoria Grupo Diclofenaco es menor estadísticamente significativo en relación a la media de la actividad inflamatoria del Grupo extracto (A) 200 mg/kg ($P<0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo extracto (B) 400 mg/kg, ($P<0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo Extracto (C) 600 mg/kg, ($P<0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo Extracto (D) 800 mg/kg, ($P<0,05$)

TABLA N° 17 Actividad antiinflamatoria según tratamientos a las cuatro horas

Tratamientos	N	Media	Desv. típica	ANOVA	Prueba de Tukey					
					Grupo Dexam (X)	Grupo Diclof. (D)	Grupo extracto (A) 200 mg/Kg	Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	Grupo Extracto (C) 600 mg/Kg	Grupo Extracto (D) 800 mg/Kg
Grupo Dexametasona (X)	6	0,48	0,14	0,000*		**P=0.000			**P=0.000	**P=0.000
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,16	0,09				**P=0.000	**P=0.000	**P=0.000	**P=0.000
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,58	0,11							
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,59	0,21							
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,77	0,12							
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,77	0,14							

*p<0,05 **P<0,05

De la tabla se aprecia que se encontró que la media Actividad antiinflamatoria Grupo Dexametasona es mayor significativamente $P<0,05$ en relación a la media Actividad antiinflamatoria Grupo Diclofenaco, y menor estadísticamente significativa en relación a la media Actividad antiinflamatoria Grupo Extracto (C) 600 mg/kg $P<0,05$ y menor estadísticamente significativa en relación a la media Actividad antiinflamatoria Grupo Extracto (D) 800 mg/kg $P<0,05$, asimismo se encontró que media Actividad antiinflamatoria Grupo Diclofenaco es menor estadísticamente significativo en relación a la media de la actividad inflamatoria del Grupo extracto (A) 200 mg/kg ($P<0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo extracto (B) 400 mg/kg, ($P<0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo Extracto (C) 600 mg/kg, ($P<0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo Extracto (D) 800 mg/kg, ($P<0,05$)

TABLA N° 18 Actividad antiinflamatoria según tratamientos a las cinco horas

Tratamientos	N	Media	Desv. típica	ANOVA	Prueba de Tukey					
					Grupo Dexam (X)	Grupo Diclof. (D)	Grupo extracto (A) 200 mg/Kg	Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	Grupo Extracto (C) 600 mg/Kg	Grupo Extracto (D) 800 mg/Kg
Grupo Dexametasona (X)	6	0,33	0,11	0,000*					**P=0.000	**P=0.000
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,17	0,11				**P=0.000	**P=0.000	**P=0.000	**P=0.000
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,53	0,15							
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,56	0,21							
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,80	0,16							
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,73	0,16							

De la tabla se aprecia que se encontró que la media Actividad antiinflamatoria Grupo Dexametasona es menor significativamente $P < 0,05$ en relación a la media Actividad antiinflamatoria Grupo Grupo Extracto (C) 600 mg/kg $P < 0,05$ y menor estadísticamente significativa en relación a la media Actividad antiinflamatoria Grupo Extracto (D) 800 mg/kg $P < 0,05$, asimismo se encontró que media Actividad antiinflamatoria Grupo Diclofenaco es menor estadísticamente significativo en relación a la media de la actividad inflamatoria del Grupo extracto (A) 200 mg/kg ($P < 0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo extracto (B) 400 mg/kg, ($P < 0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo Extracto (C) 600 mg/kg, ($P < 0,05$), a la media de la actividad inflamatoria del Grupo Extracto (D) 800 mg/kg, ($P < 0,05$)

EFICACIA ANTIINFLAMATORIA

TABLA N° 19 Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a la hora

	N	Media	Desviación típica	ANOVA
Grupo Dexametasona (X)	6	0,27	0,13	P= 0,16
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,15	0,13	
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,16	0,12	
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,33	0,10	
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,21	0,13	
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,27	0,19	

$p=0,16 > 0,05$ no existe diferencias significativas

No se encontró diferencias significativas entre los tratamientos

TABLA N° 20 Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a la hora y media

	N	Media	Desviación típica	ANOVA
Grupo Dexametasona (X)	6	0,36	0,09	P=0.11
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,14	0,18	
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,24	0,13	
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,38	0,22	
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,34	0,13	
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,36	0,18	

$p=0,11 > 0,05$ no existe diferencias significativas

No se encontró diferencias significativas entre los tratamientos

TABLA N° 21 Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a las dos horas

Tratamientos	N	Media	Desv. típica	ANOVA	Prueba de Tukey					
					Grupo Dexam (X)	Grupo Diclof. (D)	Grupo extracto (A) 200 mg/kg	Grupo extracto (B) 400 mg/kg	Grupo Extracto (C) 600 mg/kg	Grupo Extracto (D) 800 mg/kg
Grupo Dexametasona (X)	6	0,46	0,08	0.009*		**P=0.04				
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,14	0,15				**p=0.03	**P=0.01	**P=0.03	
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,32	0,17							
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,48	0,24							
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,53	0,18							
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,46	0,22							

*p<0,05 **P<0,05

De la tabla se aprecia que se encontró que la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Dexametasona es mayor significativamente $P < 0,05$ en relación a la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Diclofenaco, asimismo se encontró que media Eficacia antiinflamatoria Grupo Diclofenaco es menor estadísticamente significativo en relación a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo extracto (B) 400 mg/kg, ($P < 0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo Extracto (C) 600 mg/kg, ($P < 0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo Extracto (D) 800 mg/kg, ($P < 0,05$)

TABLA N° 22 Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a las tres horas

Tratamientos	N	Medi a	Desv. típica	ANOVA	Prueba de Tukey						
					Grupo Dexa m (X)	Grupo Diclof. (D)	Grupo extracto (A) 200 mg/kg	Grupo extracto (B) 400 mg/kg	Grupo Extracto (C) 600 mg/kg	Grupo Extracto (D) 800 mg/kg	
Grupo Dexametasona (X)	6	0,50	0,08	0.009*		**P=0.00 1					
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,05	0,13				**P=0.00 1	**P=0.00 0	**P=0.00 0	**P=0.00 0	**P=0.00 0
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,49	0,24								
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,56	0,17								
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,73	0,10								
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,64	0,19								

*p<0,05 **P<0,05

De la tabla se aprecia que se encontró que la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Dexametasona es mayor significativamente $P<0,05$ en relación a la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Diclofenaco, asimismo se encontró que media Eficacia antiinflamatoria Grupo Diclofenaco es menor estadísticamente significativo en relación a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo extracto (A) 200 mg/kg ($P<0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo extracto (B) 400 mg/kg, ($P<0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo Extracto (C) 600 mg/kg, ($P<0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo Extracto (D) 800 mg/kg, ($P<0,05$)

TABLA N° 23 Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a las cuatro horas

Tratamientos	N	Media	Desv. típica	ANOVA	Prueba de Tukey					
					Grupo Dexam (X)	Grupo Diclof. (D)	Grupo extracto (A) 200 mg/kg	Grupo extracto (B) 400 mg/kg	Grupo Extracto (C) 600 mg/kg	Grupo Extracto (D) 800 mg/kg
Grupo Dexametasona (X)	6	0,50	0,08	0.009*		**P=0.006			**P=0.01	**P=0.01
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,05	0,13				**P=0.000	**P=0.000	**P=0.000	**P=0.000
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,49	0,24							
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,56	0,17							
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,73	0,10							
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,64	0,19							

*p<0,05 **P<0,05

De la tabla se aprecia que se encontró que la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Dexametasona es mayor significativamente $P < 0,05$ en relación a la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Diclofenaco, y menor estadísticamente significativa en relación a la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Extracto (C) 600 mg/kg $P < 0,05$ y menor estadísticamente significativa en relación a la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Extracto (D) 800 mg/kg $P < 0,05$, asimismo se encontró que media Eficacia antiinflamatoria Grupo Diclofenaco es menor estadísticamente significativo en relación a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo extracto (A) 200 mg/kg ($P < 0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo extracto (B) 400 mg/kg, ($P < 0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo Extracto (C) 600 mg/kg, ($P < 0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo Extracto (D) 800 mg/kg, ($P < 0,05$)

TABLA N° 24 Eficacia antiinflamatoria según tratamientos a las cinco horas

Tratamientos	N	Media	Desv. típica	ANOVA	Prueba de Tukey					
					Grupo Dexam (X)	Grupo Diclof. (D)	Grupo extracto (A) 200 mg/Kg	Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	Grupo Extracto (C) 600 mg/Kg	Grupo Extracto (D) 800 mg/Kg
Grupo Dexametasona (X)	6	0,30	0,10	0,000*					**P=0.000	**P=0.002
Grupo Diclofenaco (D)	6	0,16	0,10				**P=0.02	**P=0.03	**P=0.000	**P=0.000
Grupo extracto (A) 200mg/Kg	6	0,45	0,16							
Grupo extracto (B) 400 mg/Kg	6	0,54	0,20							
Grupo Extracto (C) 600 MG/Kg	6	0,76	0,17							
Grupo Extracto (D) 800 MG/Kg	6	0,69	0,17							

*p<0,05 **P<0,05

De la tabla se aprecia que se encontró que la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Dexametasona es menor significativamente $P<0,05$ en relación a la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Grupo Extracto (C) 600 mg/kg $P<0,05$ y menor estadísticamente significativa en relación a la media Eficacia antiinflamatoria Grupo Extracto (D) 800 mg/kg $P<0,05$, asimismo se encontró que media Eficacia antiinflamatoria Grupo Diclofenaco es menor estadísticamente significativo en relación a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo extracto (A) 200 mg/kg ($P<0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo extracto (B) 400 mg/kg, ($P<0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo Extracto (C) 600 mg/kg, ($P<0,05$), a la media de la Eficacia inflamatoria del Grupo Extracto (D) 800 mg/kg, ($P<0,05$).

TEST DE IRRITACIÓN OCULAR

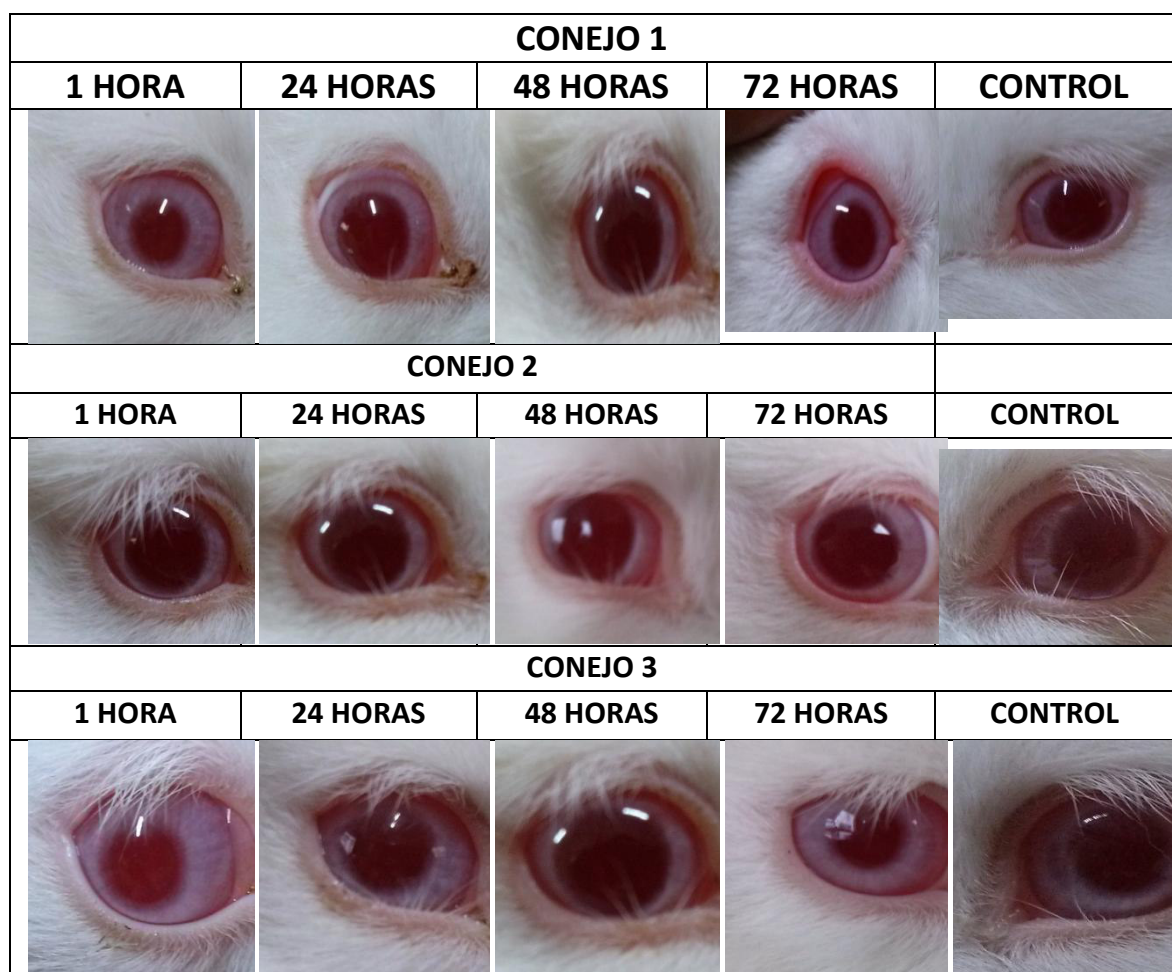


Fig. 26 Irritación ocular a la hora, 24 horas, 48 horas y 72 horas.

IV. DISCUSIÓN

Se preparó el extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana* al 70% debido a que permite una mejor separación de principios activos entre sí, además que es lo más cercano al uso tradicional de esta planta, a diferencia de un extracto acuoso que es poco selectivo y poco estable en el tiempo, [54]. El extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana* es mayormente soluble en agua y medianamente soluble en metanol y etanol (**Tabla N°4**), lo cual podría evidenciar un mayor contenido de compuestos polares. El análisis fitoquímico preliminar evidenció la posible presencia de alcaloides, lo que es muy común en la familia de las papaveráceas. También se encontraron resultados positivos para flavonoides, taninos, fenoles aminoácidos y carbohidratos, (**Tabla N°5**) en estudios anteriores se comprobó que el extracto metanólico y etanólico de las flores de *A. mexicana* contienen alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos, mientras que el extracto acuoso del mismo no evidenciaba ninguno de los metabolitos antes mencionado [55]. De acuerdo a la bibliografía consultada en el estudio fitoquímico de distintas partes de la planta existe presencia de alcaloides como protopina, berberina, benzofenantridina y benzyloquinolina, cuatro alcaloides cuaternarios isoquinolina, como dehydrocorydalmina, jatrorrhizina, columbamina, y oxyberberina, que se han aislado de la planta entera(56). El alcaloide berberina ha mostrado actividad contra las infecciones por hongos (*Candida albicans*), parásitos y bacterias, virus e infecciones [57]. La familia de las Papaveraceas presenta flavonoides del tipo flavonol, la quercetina ha sido reportada en flores de *Eschscholtzia californica* [82], y en las flores de *Papaver somniferum* [83] Los flavonoides fueron analizados y fraccionados por cromatografía de papel, se obtuvo dos

fracciones, cuyas propiedades fluorescentes fueron analizadas en la lámpara de luz UV con y sin vapores de amoníaco (**Tabla N° 6**), luego se realizó la reacción de Shinoda, que reconoce flavonoides con núcleo benzopirona (flavonas, flavanonas, flavanoles)[58], la fracción 2 dio reacción positiva (Color rojizo), la fracción 1 dio negativo, posteriormente se procedió con su lectura en el espectrofotómetro UV – visible, en el espectro ultravioleta de la fracción 2 se observa la presencia de dos bandas de fuerte absorción, guardando correlación con el tipo de espectro esperado para los flavonoides[59], ubicadas a unas longitudes de onda de 230 y 290 nm, para las bandas II y I, respectivamente (**Anexo 7**), comportamiento que se asemeja a las aproximaciones experimentales determinadas por (Tom J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas [60] para las flavonas y flavanoles cuya ubicación de las bandas corresponde generalmente en 240-280 nm para la banda II y de 300-380 nm para la banda I. Al realizar la cuantificación de flavonoides se obtuvo 4.94 mg/100 g de extracto seco al cual puede atribuirse su actividad farmacológica tanto antiinflamatoria como antioxidante (**Tabla N°7**), (**Anexo 8**) esta última no está simplemente relacionada con los compuestos fenólicos totales determinados en los extractos, debido quizás a la existencia de agliconas libres, pueden ocurrir interacciones entre los componentes del extracto. El sinergismo de los flavonoides con tocoferoles, palmitato ascorbil y ácido cítrico ya ha sido reportado[61] .

Se determinó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* mediante el método del DPPH, a una concentración de 100 µg/mL se obtuvo un 91.20% de captación de radical libre, (**Tabla N° 9**) con un IC 50 de 51.43 µg/mL (**Tabla N° 8**), en un trabajo anterior

[62] donde se determinó la actividad antioxidante in vitro por el DPPH del extracto etanólico de la raíz de *A. mexicana* se obtuvo a 100 µg/mL un 87.17%, el látex de *Argemone mexicana* podría ser una posible fuente de antioxidantes naturales que podría ser un agente terapéutico para prevenir o retardar el estrés oxidativo relacionado a las enfermedades degenerativas como el pterigium.[62] La actividad antiinflamatoria se determinó por la inducción de edema por lambda Carragenina en la pata posterior, este es un modelo estándar experimental de inflamación aguda, y exhibe un alto grado de reproducibilidad. Este induce una inflamación local característica por incrementar la permeabilidad vascular, edema y extravasación neutrófila [63]. La lambda Carragenina induce una respuesta bifásica, es decir, en la primera fase se libera histamina, serotonina y quininas en la primera hora. En la segunda fase se libera prostaglandinas, lisosomas, bradiquininas y proteasas de 1 - 3 horas [64]. Los grupos tratados con los estándares y los extractos (A, B,C,Y D) mostraron diámetros promedio de inflamación menores que el grupo control (**Fig 23**) y a partir de las 3 – 5 horas hubo mejor recuperación del proceso inflamatorio inducido ($p < 0.05$) (**Tabla N° 18**), como se evidencia en la eficacia antiinflamatoria: 63.47%, 49%, 46.55% y 45.18% a las cinco horas (Fig 25)(**Tabla N° 24**), respectivamente a la dosis de 200, 400, 600 y 800 mg/kg, efecto próximo al Diclofenaco (77.62%) y superior a dexametasona (55.17%). En un trabajo anterior se determinó la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de hojas de *Argemone mexicana* [80] a dosis de 500 mg/kg (59.15% de eficacia) comparado con el estándar (Fenilbutazona, 61.27% de eficacia), a partir de la tercera hora de la prueba. La eficacia antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de látex de *Argemone mexicana* de la dosis de 200 mg/Kg , se

observó a partir de la tercera hora, (segunda fase) (**Tabla N° 16**) inhibiendo posiblemente la liberación de prostaglandinas, especialmente leucotrienos por acción del a PGH2 [65] que deriva del ácido araquidónico por acción de las ciclooxigenasas, esto también puede deberse a que la actividad inflamatoria de la carragenina va acompañada de una elevación de radicales libres, como el óxido nítrico, tanto la ciclooxigenasa como el óxido nítrico trabajan juntos en la respuesta inflamatoria, [66] como se mencionó antes el extracto hidroalcohólico de latex de *A. mexicana* también muestra actividad antioxidante, debido a que posee compuestos polifenólicos como flavonoides, el cual inhibe la 5 – lipooxigenasa y la enzima ciclooxigenasa, óxido nítrico directamente secuestrado por los flavonoides, este proceso juega un rol importante en el efecto terapéutico de los flavonoides.[67]. Asimismo los alcaloides sanguinaria y berberina presente en las hojas inhiben la ciclooxigenasa 1 y 2 , lo cual parece indicar un efecto sinérgico(68). Las otras dosis del extracto que mostraron menor actividad antiinflamatoria a mayor dosis ($p>0.05$),(Fig. 20, 21, 22) podría explicarse debido a los fenómenos de sinergia y polivalencia, un extracto puede contener diversos principios activos con efectos antagónicos, o efectos sinérgicos, esto implica que muchos otros compuestos pueden estar presentes en la planta y ser activos para un rango de dianas, modificando de esta manera su farmacocinética o incrementando los síntomas de la enfermedad.(69) La seguridad del extracto hidroalcohólico de latex de *A. mexicana* se evaluó por el test de toxicidad aguda (DL50) (**Tabla N° 2**) según el método de Prueba Límite de la OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, Acute Oral Toxicity – Test guideline 425, debido a que se emplea un menor número de animales de experimentación [70] . Se procedió a evaluar

las dosis de 20 000, 2500, 250, 25 y 2.5 mg/Kg, la prueba se realizó en ratones hembra, debido a que muestran mayor sensibilidad [70], no hubo mortalidad a ninguna de las dosis probada, pero si se observó a la dosis de 20 000 mg/ kg debilidad muscular y movimientos lentos que desaparecieron a las 8 horas. **(Tabla N° 10)** El test de Irritación ocular se trabajó con diluciones de 1/10 y 1/5 para evaluar la irritación, posteriormente se trabajo con el látex puro, se observó por un periodo de 72 horas **(Fig. 19)**, dando como resultado un IIO de 1.25, **(Tabla N° 11 y 12)** se clasifica como sustancia no irritante. [70]

V. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana* presenta metabolitos secundarios como flavonoides y compuestos polifenólicos.
- El extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana* posee una mayor eficacia antiinflamatoria a la dosis de 200 mg/kg y una mayor actividad antioxidante a 100 µg/mL.
- El valor de DL50 del extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana* es mayor a 20g /kg.
- El extracto hidroalcohólico de látex de *A. mexicana*, así como el látex puro no presenta irritación ocular.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda aislar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antiinflamatoria, y realizar pruebas bioquímicas que evalúen la inflamación aguda y subaguda, para poder determinar los posibles mecanismos de acción del efecto antiinflamatorio del extracto estudiado, asimismo realizar cultivos celulares para la determinación de la actividad anticancerígena del extracto.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. OMS .Suiza.2002. 78 p.
2. Hossain H HK, Mansur A, Haq MM. Antiinflammatory activity, total flavonoids and tannins content from the ethanolic extract of spilanthus paniculata leaf growing in Bangladesh. *Int J Pharm* 2012; 2(2):271-7.
3. Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif). 1996;12(4):274-7.
4. León M. Plantas medicinales del Perú: taxonomía, ecogeografía, fenología y etnobotánica. Asamblea Nacional de Rectores, 2011.
5. Manjamalai A SStSR, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM. Analysis of phytochemical constituents and anti-microbial activity of some medicinal plants in Tamilnadu, India. *Global J Biotechnol Biochem* 2010;5(2):120-8.
6. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(12):965-75.
7. Kumar V AA, Fausto N, Aster J. Robbins y Cotran. *Patología Estructural y Funcional*. México.6 ed: Saunders-Elsevier; 2000. p. 53-120.
8. León-Regal M A-BA, de-Armas-García J, Miranda-Alvarado L, Varens-Cedeño J, Cuesta-del-Sol J. Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista Finlay* [revista en Internet]. 2015;5(1): 15 p.
9. Freddy O. Contreras Santos RBG. *Fisiopatología*: McGraw-Hill. Interamericana. España. 2003. 7 p.
10. Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Current opinion in cell biology*. 1997;9(5):674-82.
11. Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(4):487-95.

12. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology*. 2003;24(6):327-34.
13. Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2007;82(6):1375-81.
14. Montes Montes J, Flores Flores J, Alfonso Barrón E. Histamina, receptores y antagonistas. *Rev Med Hosp Gen Mex*. 2005;68(3): 6p.
15. Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Inmunología celular y molecular 3ed*. Saunders.Madrid: Ed. Interamericana-McGraw Hill 1999.
16. Sigal E. The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *The American journal of physiology*. 1991;260(2 Pt 1):L13-28.
17. Andrés O. Pérez Ruiz LCP, Víctor Valencia Fernández. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Rev Cubana Estomatol*. 1998;35(2): 6 p.
18. T. Martin Dominguez JELGJLP-A. *Química Clínica* 1993 10 p.
19. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontology* 2000. 2013;63(1):149-64.
20. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New biology*. 1971;231(25):232-5.
21. Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Journal of medicinal chemistry*. 2007;50(7):1425-41.
22. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. 1996;384(6610):644-8.
23. Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, Kalgutkar AS, et al. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(46):45763-9.

24. Brunton L LJ, Parker K. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica: McGraw-Hill Interamericana Editores. S.A de C.V.; México. 2012. 34 p.
25. Brayfield A. Martindale. The Complete drug reference. 36 ed: Pharmaceutical Press; Reino Unido. 2009.
26. Florez J. Farmacología Humana.pdf. 5 ed. Barcelona: Elsevier Masson; 2008.
27. Guerra JIE. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes.pdf. Anales de Medicina Interna. Aran Ediciones. Madrid 2001;18(6):326-35.
28. Núñez-Naveira L, Montero Martínez C. Oxidación, Inflamación y modificaciones estructurales. Arch Bronconeumol. 2007;43(Supl. 1):18-29.
29. J. HBaG. Free Radical in Biology and Medicine: Oxford, Clarendon Press; Reino Unido. 1989.
30. Autores NSAyCd. Conceptos y definiciones de la terapia antioxidante En: El reto en la terapia antioxidante. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 2008.
31. Rodríguez Perón J, Trujillo López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cubana Med Milit 2001;30(1):36-44
32. Oteiza P. Modificación activa de las proteínas. Antioxidante y Calidad de Vida 1995;2:12-20.
33. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. Annals of the New York Academy of Sciences. 1989;570:7-22.
34. Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. Current medicinal chemistry. 2004;11(8):1041-64.
35. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). The Journal of biological chemistry. 1969;244(22):6049-55.

36. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999;32(8):595-603.
37. Sacca SC, Roszkowska AM, Izzotti A. Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. *Mutation research*. 2013;752(2):153-71.
38. Ringvold A. Corneal epithelium and UV-protection of the eye. *Acta ophthalmologica Scandinavica*. 1998;76(2):149-53.
39. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free radical biology & medicine*. 1997;22(5):749-60.
40. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2002;13(10):572-84.
41. Pavese JM, Farmer RL, Bergan RC. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer metastasis reviews*. 2010;29(3):465-82.
42. Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;38(2):99-107.
43. Gonzalez R, Ballester I, Lopez-Posadas R, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2011;51(4):331-62.
44. Williams RJ, Spencer JP. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(1):35-45.
45. Stoner GD, Wang LS, Casto BC. Laboratory and clinical studies of cancer chemoprevention by antioxidants in berries. *Carcinogenesis*. 2008;29(9):1665-74.
46. Escamilla CI CE, Guevara J. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 2009;52(2):73-5.

47. Basu TK, Temple NJ, Garg ML. Antioxidants in human health and disease. Wallingford: CABI Pub.; 1999. 437 p.
48. Martens S, Mithofer A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*. 2005;66(20):2399-2407.
49. Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical research*. 2010;27(6):962-78.
50. Polier G, Ding J, Konkimalla BV, Eick D, Ribeiro N, Kohler R, et al. Wogonin and related natural flavones are inhibitors of CDK9 that induce apoptosis in cancer cells by transcriptional suppression of Mcl-1. *Cell death & disease*. 2011;2:e182.
51. Smith JA, Poteet-Smith CE, Xu Y, Errington TM, Hecht SM, Lannigan DA. Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation. *Cancer research*. 2005;65(3):1027-34.
52. Teixeira S, Siquet C, Alves C, Boal I, Marques MP, Borges F, et al. Structure-property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet. *Free radical biology & medicine*. 2005;39(8):1099-108.
53. Yamashita N, Tanemura H, Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu(II). *Mutation research*. 1999;425(1):107-15.
54. Hernández E AB, Martín Y Estudio de estabilidad físico-química e identificación fitoquímica de extractos etanólico de *Trichilia hirta*. *Revista Cubana de Química*. 2010;XXII(1):5 p.
55. Joshi N BS, Dhyani S, Nain j. Phytochemical screening of secondary metabolites of *Argemone mexicana* Linn. Flowers. *Int J Curr Pharm Res*. 2013;5(2):4 p.
56. Singh S, Singh TD, Singh VP, Pandey VB. Quaternary alkaloids of *Argemone mexicana*. *Pharmaceutical biology*. 2010;48(2):158-60.

57. Ramawat KG. Berberin: Therapeutic potential of an alkaloid found in several medicinal plants. *Altern Med Rev.* 2009;2: 94-103.
58. Rengifo-Penadillos R. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Pharmacencia.* 2014;1(2):51-6.
59. M. Andersen KRM. Flavonoids - Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group L, editor. Boca Raton, FL: CRC Press; 2006. 1212 p.
60. Tom J. Mabry KRM, M. B. Thomas. The Systematic Identification of Flavonoids. New York. 1970: Springer-Verlag. 345 p.
61. Hraš AR, Hadolin M, Knez Ž, Bauman D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food chemistry.* 2000;71(2):229-33.
62. Perumal P, Sekar V, Rajesh V, Gandhimathi S, Sampathkumar R, Nazimudin K. In vitro antioxidant activity of *Argemone mexicana* roots. *International Journal of PharmTech Research.* 2010;2(2):1477-82.
63. Gamache DA, Povlishock JT, Ellis EF. Carrageenan-induced brain inflammation. Characterization of the model. *Journal of neurosurgery.* 1986;65(5):679-85.
64. Purnima A, Koti BC, Thippeswamy AH, Jaji MS, Swamy AH, Kurhe YV, et al. Antiinflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of *Mimusops elengi* Linn. *Indian journal of pharmaceutical sciences.* 2010;72(4):480-5.
65. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in molecular biology.* 2003;225:115-21.
66. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British journal of pharmacology.* 1996;118(4):829-38.
67. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Houlst JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic

dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochemical pharmacology*. 1991;42(9):1673-81.

68. Sweeney JF, Nguyen PK, Atkins KB, Hinshaw DB. Chelerythrine chloride induces rapid polymorphonuclear leukocyte apoptosis through activation of caspase-3. *Shock*. 2000;13(6):464-71.

69. Pulok K Mukherjee PJH. *Evaluation of Herbal Medicinal Products*. 1st. ed. London Pharmaceutical Press; 2009. 519 p.

70. OECD/OCD. *Acute Oral Toxicity Up and Down Procedure*. OECD, editor: OECD; Test Guideline 425 2008 .

71. Antonio Delgado Cirilo. *Introducción a la química terapéutica* . 2da edición. "Fármacos moduladores de la histamina" (2000) 18:338

72. E.C. Vaquero-Raya y X. Molero-Richard. Especies reactivas de oxígeno en las enfermedades inflamatorias del páncreas: ¿una posible diana terapéutica?. *Gastroenterol Hepatol*. 2005;28(8):473-84

73. Juan Andrés Castaño Bello. Et col. El Pterigión ¿una Lesión Tumoral? *Revista Salud Bosque* | volumen 1 | número 1 | Págs. 41-46.

74. OECD (OECD Guideline for testing of chemical. Acute eye irritation/corrosion. N° 405. Adoptada 2002).

75. Winter, C. A., Risley, E. A ., and Nuss, G. W. (1962) Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol*. 111, 544–547.

76. Sughisita E, Amagaya S, Ogihara Y. 1981 Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J Pharmacol Biodyn* 4: 565 - 575.

77. J. Necas, L. Bartosikova. (2013). Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina*, 58, (4): 187–205

78. *Manual de uso del Plestimómetro Digital LE7500*. V/26/10/12. Panlab. Harvad Apparatus.

79. Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26: 211 – 219.
80. Sourabie T.S., N. Ouedraogo. Biological evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of *Argemone mexicana*. (Papaveraceae) aqueous leaf extract. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. Vol 3 No 9 Sep 2012.
81. Laura Marzocchellaa, Massimo Fantinia. Dietary Flavonoids: Molecular Mechanisms of Action as Anti-Inflammatory Agents. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 2011, Vol. 5, 200-220.
82. Nabil A. M. Saleh, Salwa A. A Comparative Study of Flavonoids in some Members of the Papaveraceae. 1987. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol. 15, No. 6, pp. 673-675.

ANEXOS

ANEXO 1



Fig. 27 Anexo Huanipa Chilmay, Distrito Villa Chiara, Provincia de Andahuaylas, Departamento de Apurímac.



Fig.28 Planta y Flor de *Argemone mexicana*

ANEXO 2



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Bioterio - Vicerrectorado de Investigación

CERTIFICADO

San Martín de Porres, 01 de diciembre del 2014

Mediante la presente se certifica que las 36 ratas hembras, adultas de la cepa albina Sprague Dawley, adquiridos el 01 de diciembre del 2014 por la Srta. Heydee Diaz Martinez, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizada en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente;

Dr. CHRISTIAN PITOT ALVAREZ
Jefe de Bioterio
LID - UPCH
C.M.V. 8985

ANEXO 3



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
Bioterio - Vicerrectorado de Investigación

CERTIFICADO

San Martín de Porres, 01 de diciembre del 2014

Mediante la presente se certifica que los 40 ratones hembras, de la cepa albina Balb, con pesos comprendidos entre 18 -21 g adquiridos el 01 de diciembre del 2014 por la Srta. Heydee Diaz Martinez, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizada en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente;

Dr. CHRISTIAN PITOT ALVAREZ
Jefe de Bioterio
LID - UPCH
C.M.V. 6966

ANEXO 4



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático"

CONSTANCIA N° 228 -USM-2014

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida de **Heydee DIAZ MARTINEZ**, ha sido estudiada y clasificada como: ***Argemone mexicana* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: MAGNOLIIDAE

ORDEN: PAPAVERALES

FAMILIA: PAPAVERACEAE

GENERO: *Argemone*

ESPECIE: *Argemone mexicana* L.

Nombre vulgar: "harhuancho"
Determinado por Mag. Hamilton Beltrán.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 18 de Julio 2014



Dra. HAYDEE MONTOYA TERREROS
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ANEXO 5



Fig. 29 Se filtró la solución con papel filtro, se concentró en Rotavapor Heidolph VV2000, la solución se llevo a evaporación por calor seco en estufa a una temperatura de 60°C hasta su completa evaporación.

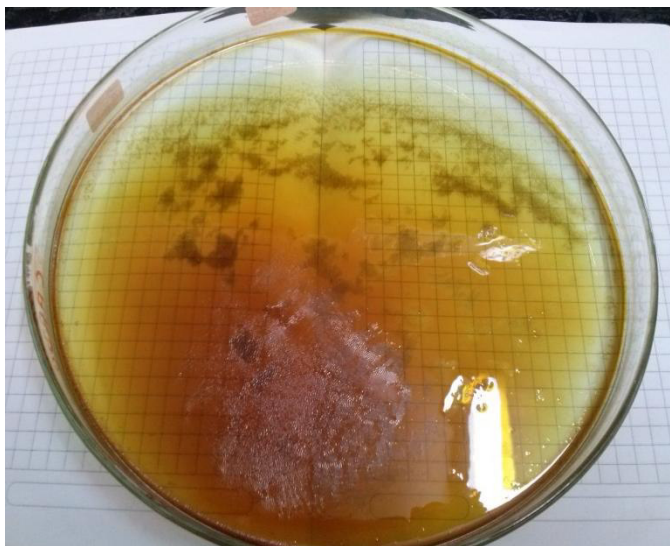
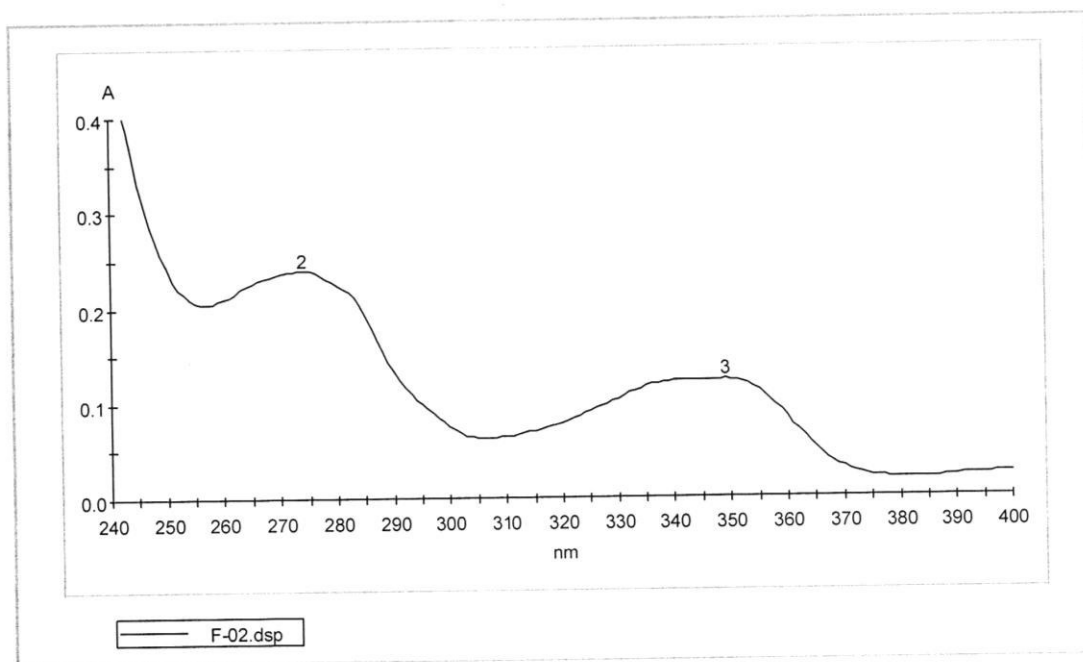


Fig.30 Extracto Hidroalcohólico de *Argemone mexicana*

ANEXO 6

Espectro : F-02.dsp
Descripción:
Operario: DESKTOP\Administrador
Creado: 11/04/2015 04:40:48 p.m.
Espectrofotómetro: GENESYS 6
Número de serie: 2M6M040001
Firmware: 2.001
Lín. Base: 05/04/2014 06:12:38 a.m.



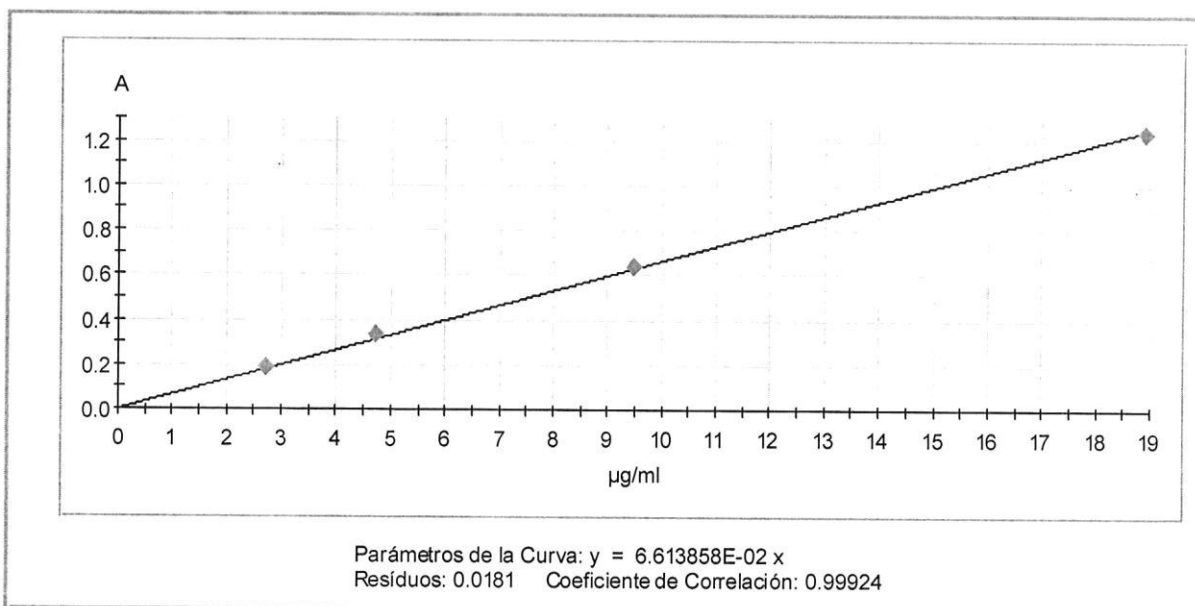
F-02.dsp

Picos	Umbral: 0.01 A
1 203 nm;	2.210 A
2 274 nm;	0.239 A
3 349 nm;	0.123 A

Fig. 31 Espectro de la Fracción 2

ANEXO 7

Método: flavonoides 27.04.15.mqa (415 nm)
Última modific.: 27/04/2015 05:50:49 p.m. por victor
Espectrofotómetro:
Número de serie:
Firmware:
Medida: 28/04/2015 11:54:32 a.m. por victor
Archivo resultado:



Datos de Patrón

Nº	Concentración [µg/ml]	A	Error [A]	Empleado
1	2.7	0.190	0.011	Si
2	4.725	0.334	0.022	Si
3	9.45	0.639	0.014	Si
4	18.9	1.236	-0.014	Si

Fig. 32 Curva de calibración del estándar de Quercetina