



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

Actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica del extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav. "Lucraco".

AUTOR:

AYBAR GARIBAY OSNAR

ICA – PERÚ

2018

DEDICATORIA

A:

Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos. A mis padres, a mis hermanos, a mi abuela Eleuteria y tíos por creer en mí y porque siempre me apoyaron, todo esto te lo debo a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad. A mis padres, hermanos, abuela, a mi pareja, tíos y sobrinos, por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar.

A mis asesores de tesis: Dra. Hayde Chávez Orellana, Dr. Ernesto Torres Veliz, Dr. Felipe Surco Laos y Dr. Manuel Valle Campos por ser personas claves en el desarrollo de esta tesis.

Y a la Asociación Científica de Investigación Farmacéutica (ACIF) que me hace feliz el poder decir orgullosamente que pertenezco 5 años a una de las mejores familias dedicadas a la investigación.

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	vi
<i>Abstract</i>	vii
<i>Introducción</i>	viii
CAPITULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
1.1 <i>Descripción de la realidad problemática</i>	11
1.2 <i>Formulación del problema</i>	13
1.3 <i>Justificación e importancia</i>	14
1.4 <i>Objetivos de la investigación</i>	16
1.5 <i>Hipótesis y variables</i>	17
CAPITULO II. BASES TEORICAS	18
2.1 <i>Antecedentes</i>	18
2.2 <i>Marco teórico</i>	19
2.2.1 <i>Sistemas de defensa antioxidante</i>	19
2.2.1.1 <i>Sistema de defensa antioxidante endógeno</i>	21
2.2.1.2 <i>Sistema de defensa antioxidante exógeno</i>	25
2.2.2 <i>Determinación de capacidad antioxidante in vitro</i>	31
2.2.2.1 <i>Reacciones SET y Reacciones HAT</i>	33
2.2.2.2 <i>Método ABTS</i>	34
2.2.2.3 <i>Método DPPH</i>	36
2.2.2.4 <i>Método del Poder Reductor</i>	37
2.2.2.5 <i>Trolox</i>	38
2.2.3 <i>Inflamación</i>	39
2.2.3.1 <i>Fases de la inflamación</i>	40
2.2.3.2 <i>Clasificación de la inflamación</i>	41
2.2.4 <i>Mecanismo del edema subplantar inducido por carragenina</i>	45
2.2.5 <i>Dolor</i>	46
2.2.5.1 <i>Clasificación del dolor</i>	47
2.2.6 <i>Nociceptores</i>	48

2.2.6.1 Mecanismos de activación y modulación de los nociceptores.....	49
2.2.7 Test de la placa caliente o Hot Plate.....	50
2.3. Marco conceptual.....	50
CAPITULO III. METODOLOGÍA.....	52
3.1 Tipología de la investigación.....	52
3.2 Nivel de Investigación.....	52
3.3 Diseño de investigación.....	52
3.4 Materiales.....	52
3.5 Técnicas y procedimientos de recolección de los datos.....	54
3.5.1 Recolección.....	54
3.5.2 Screening fitoquímico.....	55
3.5.3 Evaluación de la actividad antioxidante.....	58
3.5.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	61
3.5.5 Evaluación de la actividad analgésica.....	62
3.6 Técnicas de procesamiento de la información.....	63
3.7 Aspectos éticos.....	64
CAPITULO IV. RESULTADOS.....	65
4.1 Resultados.....	65
4.2 Discusión.....	74
Conclusiones.....	79
Recomendaciones.....	80
Fuentes de información.....	81
Anexo.....	89
Anexo N° 1 Matriz de consistencia.....	89
Anexo N° 2 Imágenes.....	90

RESUMEN

*El Perú es conocido por su inmensa riqueza en recursos naturales, la cual es una de las razones por la que se mantiene en forma muy activa y funcional la llamada “Medicina Tradicional”, que, sin embargo, requiere de sustento científico, para de esta manera rescatar y respaldar su uso¹. Bajo esta idea se plantea como objetivo de la presente investigación: Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica del extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav “Lucraco”. En el extracto etanólico de la especie *Waltheria ovata* Cav. se determinó la presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, alcaloides, triterpenos, leucoantocianidinas, taninos, grupos aminos libres y grupos fenólicos, su actividad antioxidante fue evaluada por los métodos de: inhibición frente al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y por el Poder Reductor (Ferrocianuro de Potasio), la actividad antiinflamatoria fue evaluada por el método de edema subplantar en ratones inducido por carragenina y la actividad analgésica por medio del método Placa Caliente. Los resultados obtenidos muestran que la fracción D fue la más activa frente al método DPPH, que presentó un IC_{50} a una concentración de 0.7388 mg/mL y ante el método ABTS un TEAC de 0.34 mg/mL y un TEAC de 2.94 mg/mL por el método de Poder Reductor (Ferrocianuro de Potasio). En el ensayo de la actividad antiinflamatoria el extracto etanólico a dosis de 500 mg/kg obtuvo 55.93% y un porcentaje de analgesia de 174.76%. El extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav. posee actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica.*

Palabras claves: *Waltheria ovata, analgésica, antiinflamatoria, antioxidante, DPPH, ABTS.*

ABSTRACT

*Peru is known for its immense wealth in natural resources, which is one of the reasons why the so-called "Traditional Medicine" is maintained in a very active and functional way, which, nevertheless, requires scientific sustenance, for this way to rescue and support its use¹. Under this idea, the objective of the present investigation is proposed: To determine the antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activity of the ethanolic extract of the flowers of *Waltheria ovata* Cav "Lucraco". In the ethanolic extract of the species *Waltheria ovata* Cav. the presence of secondary metabolites was determined: flavonoids, alkaloids, triterpenes, leucoanthocyanidins, tannins, free amino groups and phenolic groups, their antioxidant activity was evaluated by the methods of: inhibition against the free radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS) and by the Reducing Power (Potassium Ferrocyanide), the anti-inflammatory activity was evaluated by the method of subplantar edema in mice induced by carrageenan and the analgesic activity by means of the Hot Plate method. The results obtained show that fraction D was the most active against the DPPH method, which presented an IC₅₀ at a concentration of 0.7388 mg / mL and before the ABTS method a TEAC of 0.34 mg / mL and a TEAC of 2.94 mg / mL the Reducing Power method (Potassium Ferrocyanide). In the assay of the anti-inflammatory activity, the ethanolic extract at a dose of 500 mg / kg obtained 55.93% and an analgesia percentage of 174.76%. The ethanolic extract of the flowers of *Waltheria ovata* Cav. It has antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activity*

Key words: *Waltheria ovata, analgesic, anti-inflammatory, antioxidant, DPPH, FRAP, ABTS.*

INTRODUCCIÓN

La alta diversidad de especies vegetales con importantes propiedades terapéuticas ha promovido en los últimos años un incremento en las investigaciones científicas, que buscan comprobar los conocimientos de la medicina popular. Esto deriva en la búsqueda y obtención de drogas alternativas que presenten menos efectos colaterales que los fármacos convencionales y de ser posible, se conviertan en herramientas útiles para mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades que usan y comercializan plantas medicinales nativas. Siendo los metabolitos secundarios de las plantas medicinales los responsables de sus diversos efectos terapéuticos que se les atribuyen, se hace necesario extraerlos, purificarlos y elucidar su estructura química empleando métodos modernos de la fitoquímica².

Además, el uso de fitofármacos es una alternativa válida para implementar una política de atención primaria de salud por su bajo costo y su uso tradicional por lo que se debe garantizar que el fitofármaco tenga la calidad requerida y una eficacia probada³.

Waltheria ovata Cav. (Familia: Sterculiaceae) es conocido como "Lucraco" por la población del sur del Perú (Región, Ica), que se utiliza como remedio para el tratamiento de inflamación de la próstata, trastornos gastrointestinales, diarrea y dolores de cabeza. El uso de la medicina tradicional en Perú es una de las actividades a lo largo de la historia⁴. Waltheria ovata Cav se usa como una medicina alternativa, pero no existe evidencia científica para apoyar su uso. Por lo tanto, es necesario validar

la información farmacológica de esta planta para la evaluar la eficacia y seguridad.

Los antioxidantes son importantes por la capacidad que tienen de proteger a las macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo. El organismo dispone de sistemas de defensa antioxidante (superóxido dismutasa, catalasa, proteínas, glucosa, grupos sulfhidrilos, entre otros) que actúan impidiendo la formación de radicales libres, bloqueando su propagación o interaccionando directamente con ellos. También, es posible que se ingiera con la dieta sustancias naturales o de origen sintético con capacidad antioxidante, como flavonoides, polifenoles, β -caroteno, vitamina E, vitamina C, y otros más⁵.

La respuesta inflamatoria saludable es benéfica temporalmente, pero desafortunadamente esta compleja regulación de la inflamación tiene un equilibrio precario que puede alterarse causando daño involuntario al tejido y generar una inflamación anormal o crónica. Este desequilibrio genera un estado “pro inflamatorio” descontrolado y capaz de provocar enfermedades⁶.

Las diversas enfermedades son consecuencia del estrés oxidativo, que a su vez no es más que el resultado del daño originado por las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), lo cual tiene como base de generación a la inflamación⁷.

La inflamación es considerada fuente potencial en la producción de radicales libres. Es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos

bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Las principales manifestaciones locales de la inflamación son rubor, edema, calor y dolor⁸.

El dolor es un mecanismo que sirve para proteger al organismo. Aparece siempre que ha sido lesionado cualquier tejido y hace que el individuo reaccione eliminando o alejándose del estímulo doloroso⁹.

*De lo mencionado anteriormente, resalta la importancia de este trabajo en la investigación de *Waltheria ovata* Cav “Lucraco” utilizada tradicionalmente en el Perú, la cual tiene potencial efecto: antioxidante, antiinflamatorio y analgésico. A su vez esta investigación será un soporte científico al uso tradicional de este recurso natural, como terapia alternativa para la población con bajos recursos económicos.*

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1.1. Descripción de la realidad problemática

El uso de la medicina tradicional en Perú es una de las actividades más extendidas través de la historia. El Perú, es considerado el tercer país mega diverso del planeta, cuenta con un promedio de 25 000 especies de plantas medicinales, de las cuales una buena parte crece en los valles interandinos y es utilizada por sus diversas propiedades, siendo una fuente valiosa de prevención y curación para los pobladores rurales. Estas son una fuente importante de productos naturales biológicamente activos y se consideran una vía prometedora para el descubrimiento de nuevos fármacos debido al fácil acceso y costo relativamente bajo, ya que crecen de forma natural en abundancia relativa. Ante la diversidad biológica que nuestro país posee, se hace necesaria la búsqueda de componentes bioactivos que contribuyan a la solución de diversos problemas de salud¹⁰.

El estrés oxidativo ha sido implicado en el desarrollo de numerosas enfermedades crónicas y procesos de envejecimiento, generando especies reactivas de oxígeno (ERO), que tiene como potencial, el causar daño al ADN¹¹.

Muchas enfermedades cursan con inflamación, por lo que los grupos farmacológicos usados para controlarla son ampliamente usados en terapéutica. En los últimos 30 años se ha producido un aumento

notable de estos fármacos, pero unido a su beneficio terapéutico tienen el potencial riesgo de sus efectos adversos que afectan los sistemas gastrointestinales, renal, cardiovascular, cuya severidad depende de la estructura particular de cada compuesto¹².

El dolor es la respuesta a mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, serotonina, histamina, interleucinas y otros sistemas de regulación que pueden conducir a la sensibilización de los nociceptores y neuronas somatosensoriales. Sin embargo, esta condición representa un grave problema que limita la calidad de vida, y más de 1,5 mil millones de personas con dolor crónico se gastan millones de dólares cada año en los fármacos analgésicos. Además, estos medicamentos son tóxicos para el hígado generar un riesgo para los pacientes, especialmente con dolor crónico. El tratamiento del dolor se considera que es una de los principales problemas clínicos¹³.

El dolor y la inflamación son unas de las quejas más frecuentes dentro de la población, que acompañan a la inmensa mayoría de las enfermedades y constituyen casi siempre la causa que lleva a la persona a buscar ayuda o a tratar de obtener alivio.

Aunque los radicales libres están vinculados a una transición de dolor agudo a crónico, estudios recientes han demostrado la relación entre los radicales libres y el dolor crónico con dos oxidantes como

son: superóxido y peroxinitrito que están implicados en el desarrollo del dolor crónico y la resistencia de algunos analgésicos opioides¹⁴.

El género *Waltheria* está representado a nivel mundial por unas 60 especies, ampliamente distribuidas en los países tropicales.

Caracterizados por tener una gran cantidad de compuestos fenólicos y alcaloides. *Waltheria ovata* Cav (Familia: Sterculiaceae) es conocido como "Lucraco" por la población del sur de Perú (Región Ica), que se utiliza como un remedio folclórico para el tratamiento de la inflamación de la próstata, trastornos gastrointestinales, diarrea y dolores de cabeza⁴.

La infusión de las hojas y tallo de *Waltheria ovata* Cav, son usadas para tratar afecciones bronquiales y problemas de tos. En las últimas décadas, las raíces de la planta se han utilizado como antiinflamatorio prostático¹⁵.

Waltheria ovata Cav es utilizado como una medicina alternativa, pero no existe ninguna evidencia científica que apoye su uso. Por lo tanto, es necesario para validar los efectos farmacológicos de esta planta para la evaluación de la eficacia y seguridad.

1.2. Formulación del problema

¿Presenta actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica el extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav "Lucraco"?

1.3. Justificación e importancia

El uso de plantas como medicina ha hecho posible el aislamiento y caracterización de principios activos con interés farmacológico y hoy en día hay al menos 120 sustancias químicas derivadas de plantas que son considerados como drogas importantes e ingredientes en la industria farmacéutica¹⁶.

Muchos antioxidantes naturales, en especial los flavonoides, muestran un amplio rango de efectos biológicos incluyendo funciones antibacteriales, antivirales, antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas y vasodilatadores. Una terapia antioxidante provee una alternativa barata para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo ya que se ha demostrado el efecto antioxidante de productos naturales provenientes de las plantas. La actividad antioxidante y su relación con la propiedad curativa de una gran cantidad de plantas medicinales ha sido reportada en diversas investigaciones¹⁷

Los compuestos fenólicos son moléculas de importancia demostrada de actividad antioxidante, que presentan un numeroso grupo ampliamente distribuido en la naturaleza y son componentes importantes en la dieta humana. Existe un interés creciente en los compuestos fenólicos debido a su efecto contra algunas enfermedades como ciertos cánceres y desórdenes cardíacos derivados de su poderosa actividad antioxidante¹⁸.

La inflamación es un fenómeno desagradable y doloroso, considerada fuente potencial en la producción de radicales libres. Es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. En estas células dañadas producen radicales libres, particularmente las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) y especies reactivas del Nitrógeno como el óxido nítrico (NO). Para neutralizar el efecto de estas moléculas, nuestro organismo posee sistemas fisiológicos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos⁸.

El tratamiento de distintas enfermedades inflamatorias y dolorosas ha llevado a la búsqueda de nuevos componentes antiinflamatorios y analgésicos y es aquí donde las plantas medicinales juegan un papel importante como fuente principal de sustancias activas. Existen estudios sobre las propiedades antiinflamatorias y analgésicas de otras especies como Aloe vera, Propóleo de Apis mellífera y de la Uncaria tomentosa “uña de gato”²⁰.

Por ello es relevante estudiar la actividad antioxidante y su correlación con la antiinflamatoria y analgésica de las plantas medicinales que justifiquen su uso tradicional ya que son una gran alternativa debido a su accesibilidad, uso y bajo costo.

*Sin embargo, no hay evidencias de estudios científicos sobre la actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica de las flores de *Waltheria ovata* Cav “Lucraco”, razón por la cual se realizó el presente trabajo de investigación.*

1.4. Objetivos de la investigación

- **Objetivo general**

*Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica del extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav “Lucraco”.*

- **Objetivos específicos**

- 1. Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav “Lucraco”.*
- 2. Evaluar la actividad antioxidante por los métodos de: inhibición frente al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ABTS ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y por el Poder Reductor (Ferrocianuro de Potasio).*
- 3. Evaluar la actividad antiinflamatoria por el método de edema subplantar en ratones hembra inducido por carragenina.*
- 4. Evaluar la actividad analgésica en ratones hembra por medio del método Placa Caliente.*

1.5. **Hipótesis y Variables**

- **Hipótesis**

El extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav “Lucraco” presenta alta actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica

- **Variables**

Variable dependiente

Actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica

Variable independiente

El extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav “Lucraco”

CAPITULO II: BASES TEÓRICAS

2.1. Antecedentes

- ✓ *Gressler et al., (2008), aisló tres flavonoides de la planta entera de Waltheria indica. Estos compuestos inhiben la producción dosis dependiente significativamente de mediadores inflamatorios como óxido nítrico (NO), interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α)¹⁵.*
- ✓ *Zongo et al., (2013) evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la raíz de Waltheria lanceolata demostrando una inhibición de la cepa Streptococcus pneumoniae ATCC 49619²².*
- ✓ *Eduardo G, Samuel R, (2014), evaluaron el ensayo toxicológico del extracto acuoso de Waltheria douradinha, modelo en vivo²³.*
- ✓ *Oscar H, (2014), evaluó el efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto etanólico de la raíz de Waltheria ovata Cav. "Lucraco" en línea celular de cáncer de próstata DU-145²⁴.*

No existen estudios reportados las actividades farmacológicas de la especie Waltheria ovata Cav "Lucraco" motivo de la presente investigación.

En la ciudad de Ica esta planta es administrada a la población con afecciones a la próstata, en forma de bebida haciendo un cocimiento de la raíz.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Sistemas de defensa antioxidante

En un sistema biológico, un antioxidante es capaz de reaccionar con radicales libres siendo entonces un terminador de la cadena oxidativa. La capacidad antioxidante de una sustancia o molécula se define como la habilidad para inhibir la degradación oxidativa (por ejemplo, lipoperoxidación). La capacidad antioxidante está determinada a su vez por: a) reactividad química del antioxidante asociada a la actividad antirradicalaria o estabilizadora de radicales libres; b) capacidad para acceder al sitio de reacción y; c) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales libres²⁵.

Ante un incesante daño que ejercen los radicales libres en los sistemas vivos, la naturaleza ha brindado diferentes fuentes de protección que permiten mediar este daño.

*Estos sistemas, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse como endógenos y exógenos (**Ver figura 01**). Los sistemas de defensa antioxidante endógeno consisten en una serie de elementos biológicos que brindan protección ante la producción continua de radicales libres generados por funciones celulares como la respiración y síntesis de ATP a nivel mitocondria; el sistema antioxidante endógeno a su vez, se divide en enzimático y no enzimático. El primero lo constituyen las enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión*

reductasa, glutatión S-transferasa, entre las más importantes. El segundo lo integran el glutatión, la coenzima Q y el ácido tiotico o lipoico. El sistema de defensa antioxidante exógeno se forma por todos los elementos provistos del medio ambiente (alimentos, plantas, etc) que han sido sometidos a estudios científicos y se les ha identificado actividad antioxidante, entre los estudiados se encuentran la vitamina E, vitamina C, beta carotenos y polifenoles²⁶. (Ver figura 02).

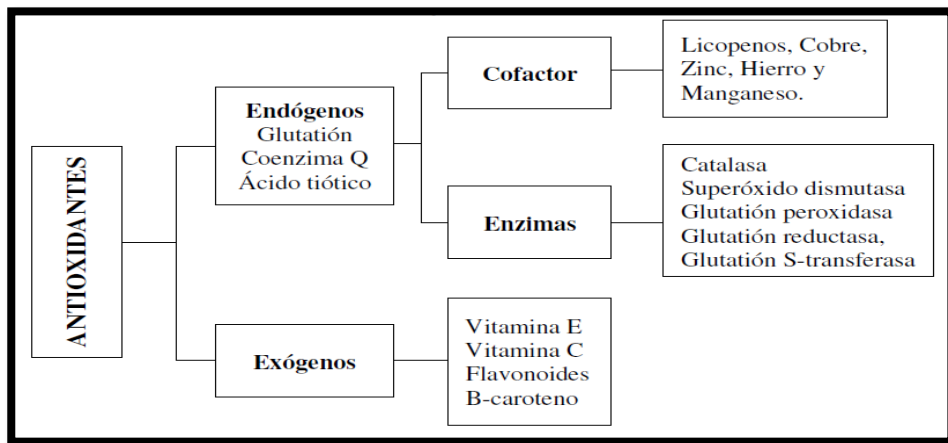


Figura 01. Clasificación de los antioxidantes ^(25,26)

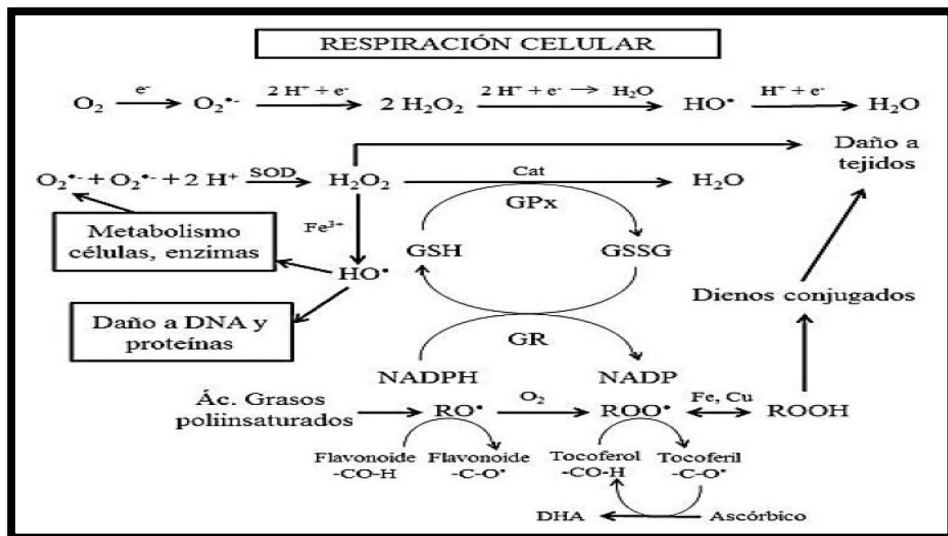


Figura 02. Representación de las principales rutas metabólicas productoras de radicales libres²⁶

2.2.1.1. Sistemas de defensa antioxidante endógeno.

Enzimas antioxidantes.

Las enzimas antioxidantes forman parte del sistema de defensa antioxidante endógeno de los organismos y ha surgido a lo largo de la evolución de las especies como mecanismo de protección frente al daño originado por ERO. Los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante consisten en una serie de enzimas que actúan coordinadamente: las superóxido dismutasas dependientes de cobre y zinc (CuZnSOD) y manganeso (MnSOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y el enzima málico (ME)²⁷. En la **Figura 03** se muestra la acción y coordinación de estos sistemas y su relación con el ciclo redox del glutatión.

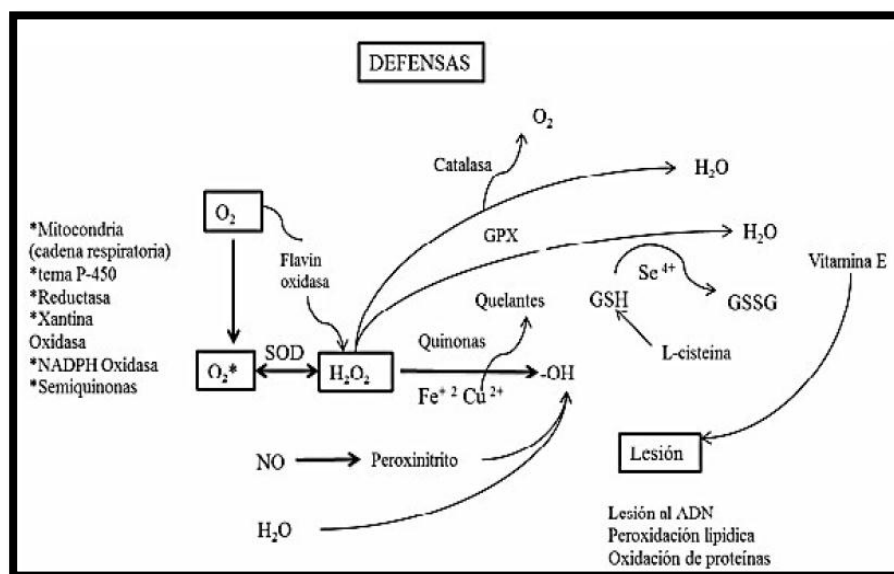
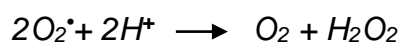


Figura 03. Detoxificación de las especies reactivas de oxígeno por sistemas enzimáticos de defensa antioxidante (SOD, catalasa y GPx)²⁷

Superóxido dismutasa (SOD).

La SOD es un componente muy importante del sistema antioxidante, su función consiste en catalizar la mutación del $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 en la siguiente reacción:



La familia de las SOD se conforma por las SOD dependiente de Cu y Zn (CuZnSOD) que se encuentra en el citosol de las células eucariotas, la SOD dependiente de Mn (MnSOD) localizada en la matriz mitocondrial en eucariotas y la SOD dependiente de Fe (SOD) en bacterias aerobias²⁸.

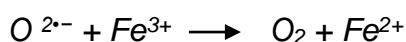
El $O_2^{\cdot -}$ se forma como producto de la cadena de transporte electrónico en los complejos I y III, es sabido que bajo condiciones normales existe una producción de ERO bien tolerada por la economía celular pero el aumento desmedido de estas especies radicalarias genera estrés oxidativo que provoca daño en diversas estructuras celulares, lipoperoxidación de membranas y daño al DNA lo cual conlleva a envejecimiento prematuro y enfermedades asociadas a éste como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes y carcinogénesis.

Catalasa (CAT).

La catalasa (peróxido de hidrógeno: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa) es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo

humano, aunque su actividad varía en dependencia del tejido; ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol.

Cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. En ausencia de esta enzima el H_2O_2 acumulado reacciona con metales como Fe^{2+} y Cu^{2+} que se encuentran en el medio para producir el radical $\cdot OH$, este tipo de reacciones se les conoce como Fenton.

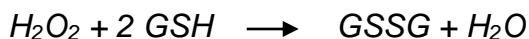


Esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores. En general las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidasa, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa²⁹.

Glutatión Peroxidasa (GPx).

Fue descubierta por Mills en 1957³⁰. Es una selenoproteína que, en las células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. En presencia de GSH como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente, cataliza la reacción

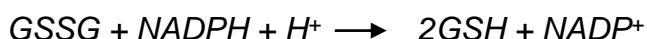
de oxidación del GSH a GSSG a expensas de H₂O₂ o de peróxidos orgánicos. Las reacciones son las siguientes:



En esta familia de proteínas existe la GPx dependiente de Selenio que actúa sobre hidroperóxidos de lípidos y la GPx no dependiente de Selenio que es dimérica de menor peso molecular y se relaciona con las Glutación S-transferasas porque participa en la eliminación de xenobióticos.

Glutación Reductasa (GR).

La GR fue observada por primera vez por Hopkins y Elliot en 1931, posteriormente fue aislada del hígado de conejo en 1932. Cataliza la reacción de restauración del glutati6n en su forma reducida con la presencia de equivalentes reductores de NADPH. La reacción en la que participa es la siguiente:



Glutati6n.

El glutati6n (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina) es el compuesto ti6lico no proteico m6s cuantioso en las c6lulas. El h6gado es el 6rgano donde se encuentra m6s abundantemente (5-10 mM). Existe en forma reducida (GSH) y oxidada (GSSG) en una proporci6n de 100 a 1. En las c6lulas se haya en tres reservorios en el citosol en un 90%, en la mitocondria en 10% y una peque6a cantidad en el ret6culo endopl6smico. Se forma b6sicamente en dos pasos, primero a partir

de glutamato y cisteína es convertida en γ -glutamilcisteína por acción de la γ -glutamilcisteína sintetasa, después la enzima GSH sintetasa utiliza γ -glutamilcisteína y glicina para formar GSH, estas reacciones se llevan a cabo en presencia de ATP. Se ha descrito previamente a este compuesto como potente antioxidante y agente reductor ya que puede reaccionar con diversas moléculas electrofílicas y oxidantes como H_2O_2 , O_2^{\cdot} y $\cdot OH$. Se le ha asociado también con procesos fisiológicos entre los que destaca el metabolismo de xenobióticos, reacciones de intercambio de grupos tiólicos y procesos de señalización en los que está implicado el ciclo celular, proliferación y apoptosis³¹. Debido a su poder reactivo el GSH es fácilmente reducido gracias a la presencia de sustancias químicas hepatotóxicas induciendo peroxidación lipídica, desestabilización de estructuras y daño celular.

2.2.1.2. Sistemas de defensa antioxidante exógeno.

Los antioxidantes exógenos están presentes en fármacos y en la dieta incluyendo frutas, verduras, semillas, granos, especias, etc. El termino Fitoquímico es la denominación genérica que reciben los compuestos orgánicos presentes en alimentos y plantas, muchos de ellos poseen un elevado potencial antioxidante. Estos compuestos antioxidantes conforman un heterogéneo grupo de moléculas capaces de capturar radicales libres que producen especies menos dañinas reduciendo el nivel de estrés oxidativo. Los compuestos más estudiados son la vitamina E, vitamina C, algunos minerales como el

selenio, cobre, zinc y magnesio, los β -carotenos y los polifenoles entre los que se incluyen los taninos y flavonoides³².

Vitamina C (Ácido Ascórbico).

Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con los radicales libres (RL) superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos. Este proceso transforma el ascorbato en el RL deshidroascorbato. El retorno a su forma nativa es por acción enzimática o por sustratos celulares tiólicos. A pesar de su manifiesta propiedad antioxidante, el ascorbato puede desempeñarse como un potente prooxidante en presencia de excesivas concentraciones de iones Fe^{+3} y Cu^{+2} (33). Hay estudios que sugieren que su acción antioxidante contra el estrés oxidativo de la mucosa gástrica puede deberse a la vitamina C, al ser un potente antioxidante soluble en agua atrapa y neutraliza una variedad de especies reactivas del oxígeno, como hidroxilo, alcoxilo, peroxilo, anión superóxido, radicales hidroperóxilo y radicales reactivos del nitrógeno a concentraciones muy bajas; además puede regenerar otros antioxidantes como el alfatocoferoxilo y el beta-caroteno a partir de sus especies radicales. Otros estudios han demostrado que el ácido ascórbico es además inhibidor de la nitrosación con potencial importancia como eliminador de nitritos in vivo, permite disminuir los riesgos de aparición de cáncer de estómago y esófago, aumenta la función inmunológica al aumentar las células natural Killer y la función de los linfocitos T y B,

inhibe el crecimiento de distintas células de melanoma humano e induce apoptosis en células leucémicas promielocíticas HL-60 y en fibroblastos de seres humanos, combate el cáncer al promover la síntesis de colágeno y prevenir así que los tumores invadan otros tejidos; y se ha sugerido que un complemento diario de 1 g de vitamina C podría proteger a las personas contra la mutagénesis inducida por la quimioterapia³⁴.

Vitamina E.

Su nombre genérico hace referencia a sus ocho isómeros estructurales de tocoferol, de los cuales el α -tocoferol es el isómero de mayor potencia antioxidante y, junto el γ -tocoferol, se le considera esencial en la defensa celular. Para estabilizar un RL, el tocoferol se convierte en el RL tocoferoxilo, este retorna a su estado original a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A. Algunos investigadores sostienen que una sobreproducción de ERO puede llevar a una disminución significativa de la concentración tisular de vitamina E³³.

Se ha comprobado que la vitamina E es el antioxidante más concentrado que se encuentra en las LDL, en una cantidad 20 a 300 veces mayor que cualquier otro antioxidante. In vitro la vitamina E inhibe la oxidación de las LDL y su acción es superior si la suplementación combina esta vitamina con la vitamina C y el β caroteno³⁵.

Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, tales como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otras. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos³⁶.

En las plantas, los flavonoides se encuentran como O ó C-glucósidos. Los O-glucósidos presentan sustituciones de azúcares, las cuales están unidos a los grupos hidroxilo de las agliconas, generalmente, las posiciones C-3 o C-7, mientras que los C-glucósidos, los grupos de azúcar están unidos a carbonos de la aglicona, usualmente C-6 o C-8. Los carbohidratos más comunes son ramnosa, glucosa, galactosa y arabinosa.

El reciente interés en los flavonoides se debe a su amplia actividad farmacológica, ya que poseen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa II. Entre todas, las propiedades biológicas de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los

cuales han sido objeto de un sin número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional³⁷.

Mecanismos antioxidantes y relación estructura-actividad de los flavonoides.

La actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes del hierro y secuestradoras de radicales libres³⁶. La inhibición sobre determinadas oxidasas representa otro de los mecanismos a través de los cuales los flavonoides ejercen sus actividades antioxidantes. Tal es el caso de la lipoxigenasa (LO), la ciclooxigenasa (CO), la mieloperoxidasa (MPO), la NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO), que evitan la generación de las ERO in vivo, así como de hidroperóxidos orgánicos. Por otra parte, se ha podido conocer que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos, como la fosfolipasa A2 (FLA2). Al mismo tiempo que estimulan otras con actividad antioxidante reconocida, tales como: la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD)³⁸. De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación del radical libre y en la formación del radical en sí.

Los flavonoides secuestran aniones superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilos ($\cdot OH$), también inhiben los efectos degradativos provocados por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)³³.

En el caso particular de los flavonoides, el estudio de la relación estructura-actividad es complicado, debido a la relativa complejidad

de las moléculas. Algunas de las características estructurales que determinan la actividad antioxidante se presentan a continuación (ver figura 04)

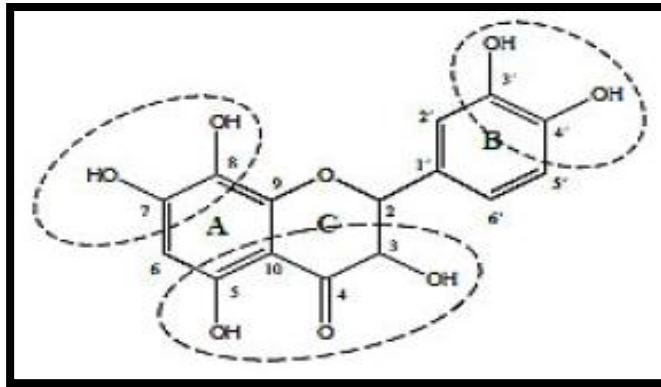


Figura 04. Características estructurales de flavonoides con actividad atrapadora de radicales libres³⁹

La posición del grupo OH en el anillo B; en particular, una estructura orto-dihidroxi (grupo catecol) produce una elevada actividad, ya que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones³⁶; actuando además como sitio de fijación preferida para trazas de metales.

La presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B (grupo pirogalol) ha sido reportada por incrementar la actividad antioxidante, en comparación con la de flavonoides que contienen un simple grupo hidroxilo. Sin embargo, bajo las mismas condiciones, tales compuestos pueden actuar como prooxidantes, neutralizando el efecto antioxidante³⁹.

2.2.2. Determinación de capacidad antioxidante in vitro.

El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen un gran número de métodos para determinar la capacidad antioxidante de extractos.

Sin embargo, es difícil determinar la capacidad antioxidante de una muestra por un solo método, es por eso que en la actualidad se combinan varios. Esto se debe a varias razones; en primer lugar, los antioxidantes pueden ejercer su acción mediante mecanismos muy diversos; pueden suprimir la generación de los primeros radicales que inician el daño oxidativo, capturar radicales libres, quelar metales, formar complejos, reducir algunos compuestos, inducir la actividad de sistemas biológicos antioxidantes, y en un mismo extracto puede haber mezclas de diferentes antioxidantes con distintos mecanismos de acción y entre los que, además, se pueden establecer reacciones sinérgicas, por lo que serán necesarios distintos análisis para poder considerar los posibles mecanismos de acción de todos los antioxidantes presentes⁴⁰.

Por otro lado, además del mecanismo de reacción, existen otros factores que también deben considerarse al determinar la capacidad antioxidante de muestras tan complejas como son los extractos de vegetales, tales como las propiedades coloidales del sustrato, el estado de oxidación y la localización del antioxidante en las distintas fases, la composición del sistema, el tipo de sustrato oxidable, el modo de provocar la oxidación, la naturaleza heterogénea y

heterofásica del sistema, las interacciones con otros componentes, etc⁴¹.

Por todas estas razones, un gran número de autores han planteado la necesidad de combinar más de un método de medida en la determinación de la capacidad antioxidante in vitro⁴¹.

En cualquier caso, todos los ensayos in vitro sobre capacidad antioxidante de extractos de plantas, deben completarse con ensayos in vivo, así como con estudios sobre el posible efecto prooxidante de estos compuestos a dosis elevadas, ya que en estos compuestos existe un delicado equilibrio entre actividad antioxidante y prooxidante⁴¹.

Otro aspecto a considerar en la determinación de la capacidad antioxidante in vitro es que, debido a las múltiples modificaciones hechas en cada uno de los métodos existentes, muchas veces la comparación entre resultados, aun correspondiendo al mismo método de medida, se deben efectuar con precaución, ya que pueden haber existido cambios en la manipulación, en la temperatura del ensayo, en la variedad de la muestra o sus condiciones de procesado, en el modo de combinar las muestras con los reactivos (por ejemplo, tiempo de exposición de los compuestos activos a los reactivos, etc.), en la metodología empleada en la extracción (tamaño de partícula, ciclos de extracción, modo de agitación de la muestra, relación muestra: solvente, etc.)⁴².

2.2.2.1. Reacciones SET y reacciones HAT.

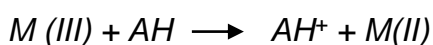
Aunque, como se ha explicado, existen una gran cantidad de mecanismos por los que los antioxidantes reaccionan con los radicales libres, como en el caso de los polifenoles, que detienen el proceso en cadena de oxidación lipídica (*chain-breaking*), esta reacción se puede llevar a cabo por dos posibles vías: reacciones de transferencia de un átomo de H (*Hydrogen Atom Transfer, HAT*) o de transferencia de un electrón (*Single Electrón Transfer, SET*)⁴³, aspectos que se deben tener en cuenta al seleccionar un método de medida de capacidad antioxidante, por lo que, a continuación, se explicará brevemente en qué consiste cada uno de estos dos mecanismos.

En las reacciones HAT, la reacción sería de este tipo, siendo X[•] el radical libre y AH el antioxidante:



El nuevo radical formado es mucho más estable que el inicial.

Por el contrario, en las reacciones SET el antioxidante transfiere un electrón para reducir un compuesto, incluyendo metales, carbonilos y radicales, y serían reacciones de este tipo, siendo de nuevo X[•] el radical libre y AH el antioxidante:



Estas reacciones son también dependientes del pH. Son métodos muy sensibles al ácido ascórbico y al ácido úrico, que juegan un papel importante en el mantenimiento del status redox del plasma. Algunos elementos traza y contaminantes (sobre todo metales) pueden interferir con estos métodos, resultando en una alta variabilidad y una baja reproducibilidad y consistencia de los resultados⁴⁴.

A continuación, se describen tres de los métodos utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante, indicando el tipo de reacción que se lleva a cabo en aquellos.

2.2.2.2. Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS).

*Se trata de una reacción SET y HAT, en el método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico) el radical tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (persulfato potasio), enzimática (peroxidasa, mioglobulina) (**ver figura 05**), o también electroquímica. Con este método, se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza tanto hidrofílica como lipofílica. El cromóforo ABTS presenta un color azul/verde con máximo de absorción a λ 342 nm, el cual es soluble tanto en agua como en disolventes orgánicos y químicamente estable. El radical ABTS^{•+} una vez generado por medio de enzimas o químicamente pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a λ (414, 645, 744 y 815 nm), pero se mide a una longitud de onda λ*

734 nm. El radical $ABTS^{\bullet+}$ es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los compuestos fenólicos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (λ 734 nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria⁴⁵.

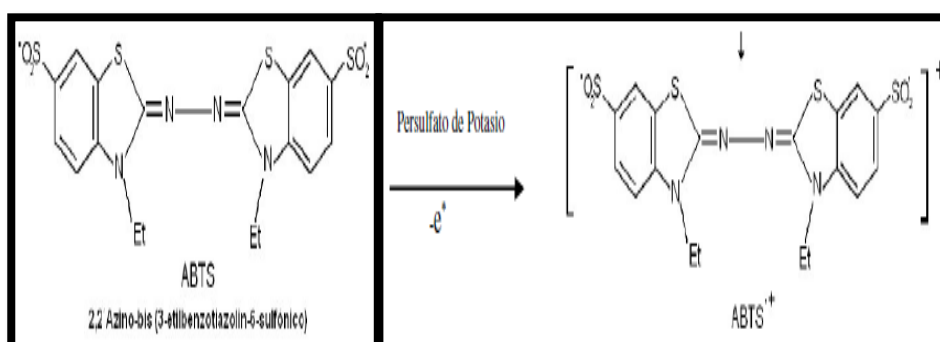


Figura 05. Formación del radical $ABTS^{\bullet+}$

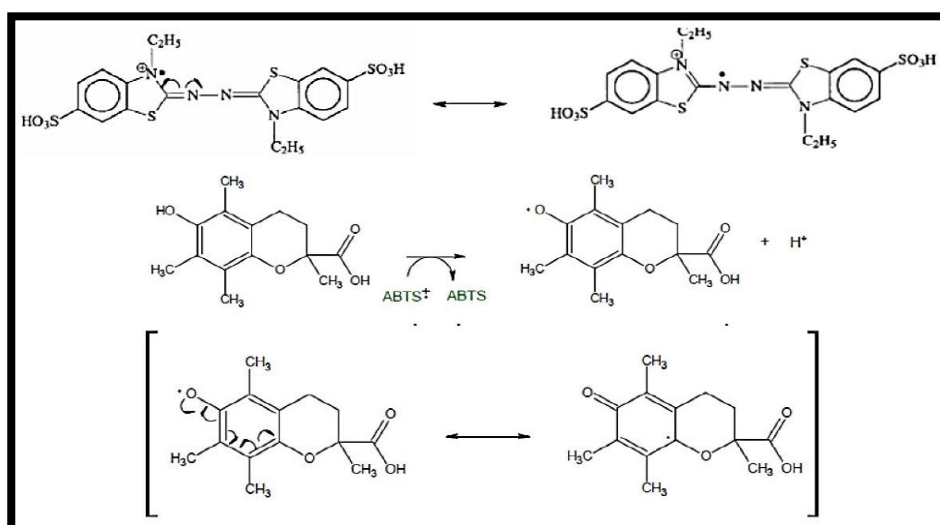


Figura 06. Mecanismo de estabilización del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ (arriba), reacción del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ con el trolox (centro) y mecanismo de estabilización del radical formado en el trolox (abajo)⁴⁵

2.2.2.3. Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH).

El método del DPPH se basa en la reducción del radical DPPH[•] por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes (ver figura 07). La decoloración del radical se determina a una λ de 515 nm hasta alcanzar el equilibrio. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido, sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH⁴⁶.

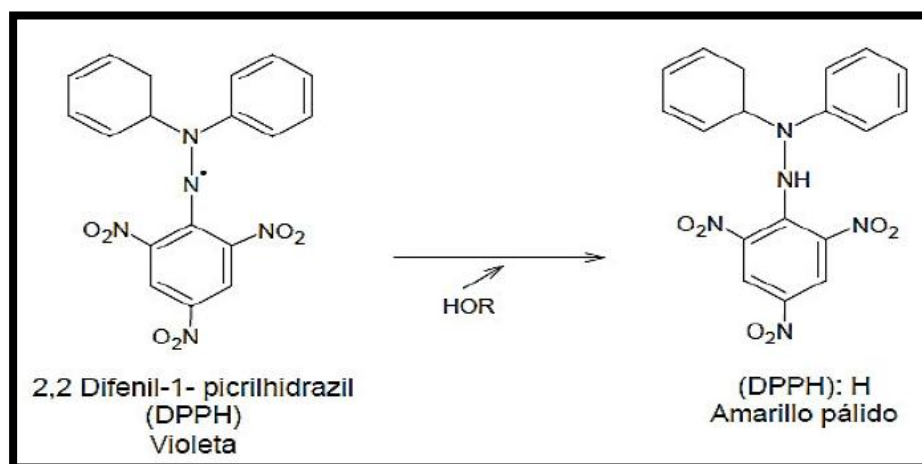


Figura 07. Reducción del radical libre 2,2-difenil-1-

picrilhidraizil⁴⁶

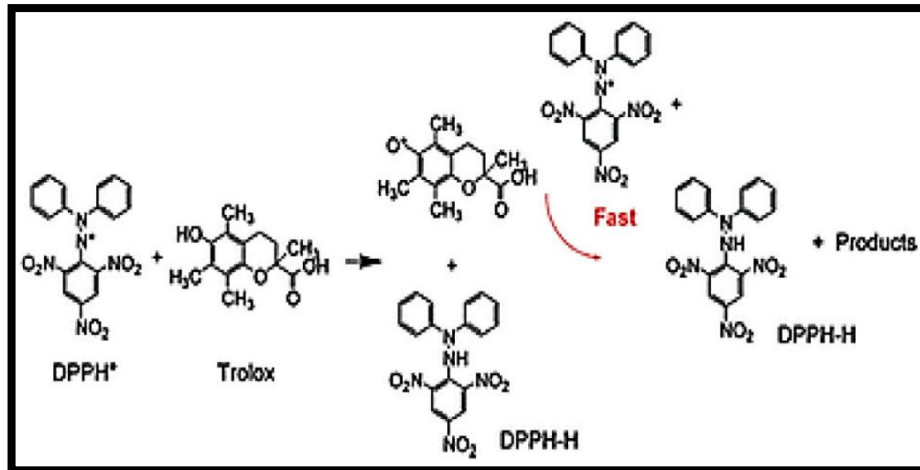


Figura 08. Mecanismo de reacción del radical DPPH con el estándar Trolox⁴⁶

2.2.2.4. Método del Poder Reductor (Ferrocianuro de Potasio)

Los métodos para medir el poder reductor son de los pocos que utilizan compuestos inorgánicos para la medida de la capacidad reductora de sustancias, principalmente en su habilidad para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . Este método se basa en la formación de Ferrocianuro férrico, este compuesto reacciona con el $FeCl_3$ produciéndose una intensa coloración verde esmeralda que absorbe a 700 nm, cuya intensidad es dependiente de la concentración de los antioxidantes que se encuentran en la muestra, cuanto mayor sea la absorbancia en el medio de la reacción mayor será el poder reductor de las sustancias antioxidantes que se evalúan. El valor del poder de reducción está ligado a la cantidad de radicales libres que un agente antioxidante está en capacidad de captar para anular su alta reactividad, y esta capacidad a la vez tiene relación directa con la concentración del agente antioxidante, al aumentar la concentración

aumenta el poder de reducción, el incremento de la absorbancia da a entender un poder reductor de los extractos⁴⁷.

2.2.2.5. Trolox

*Es un antioxidante como la vitamina E y se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo o daño celular. El compuesto ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico, Trolox (**ver figura 09**), es un análogo soluble en agua de la vitamina E, que se puede comparar con varios antioxidantes comerciales⁴⁸.*

Las reacciones entre el Trolox y varios radicales libres oxidantes incluyendo los radicales peroxi y varios radicales hidroxilos se examinaron mediante el uso de la técnica de pulso-radiólisis, demostrando que el Trolox puede someterse a reacciones rápidas de transferencia de electrones, así como los procesos de transferencia de hidrógeno; el radical fenoxilo resultante demuestra ser relativamente estable, en común con el radical fenoxi derivado de la vitamina E. Las reacciones entre el Trolox (radical fenoxilo) y una variedad de compuestos reductores biológicamente pertinentes se examinaron mediante el uso de radiolisis pulsos. Los resultados evidencian que el Trolox (radical fenoxilo) se repara fácilmente por el ascorbato y ciertos tioles, pero no por urato, NADH o galato de propilo. Las pruebas evidencian que el Trolox repara proteínas que se han oxidado por radicales libres.

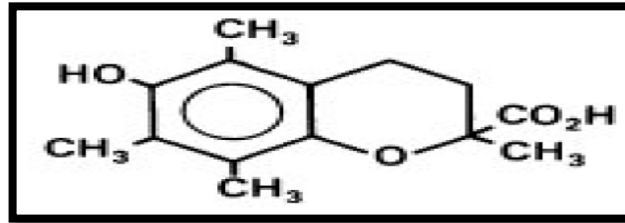


Figura 09. Fórmula estructural del trolox⁴⁸

2.2.3. Inflamación

La inflamación es la respuesta fisiológica de defensa del organismo a estímulos nocivos, como los patógenos, las células dañadas, los traumas físicos o irritantes, se trata de un proceso complejo que involucra la acción coordinada de múltiples células, caracterizado por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales, como esteroides, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno. La sobreproducción de estas últimas puede inducir estrés oxidativo y generar daños a nivel celular, que promueven la aparición de enfermedades crónicas⁴⁹.

A nivel macroscópico, la inflamación generalmente se caracteriza por la presencia de calor, dolor, rubor, tumefacción (hinchazón) y alteración o pérdida de la función en el área afectada⁵⁰.

La intensidad de la respuesta inflamatoria es crucial: si es insuficiente puede conducir a las infecciones y cáncer. Por otro lado, un exceso de respuesta causa morbilidad y mortalidad que acompañan a las enfermedades con un importante componente inflamatorio, como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la isquemia cerebral y del corazón, las enfermedades de Crohn y

Alzheimer. En algunos casos, la respuesta inflamatoria alcanza la circulación sistémica, como en la sepsis, meningitis y muchos otros traumas⁵¹. En estos casos, la inflamación puede ser mucho más dañina para el organismo que el estímulo original.

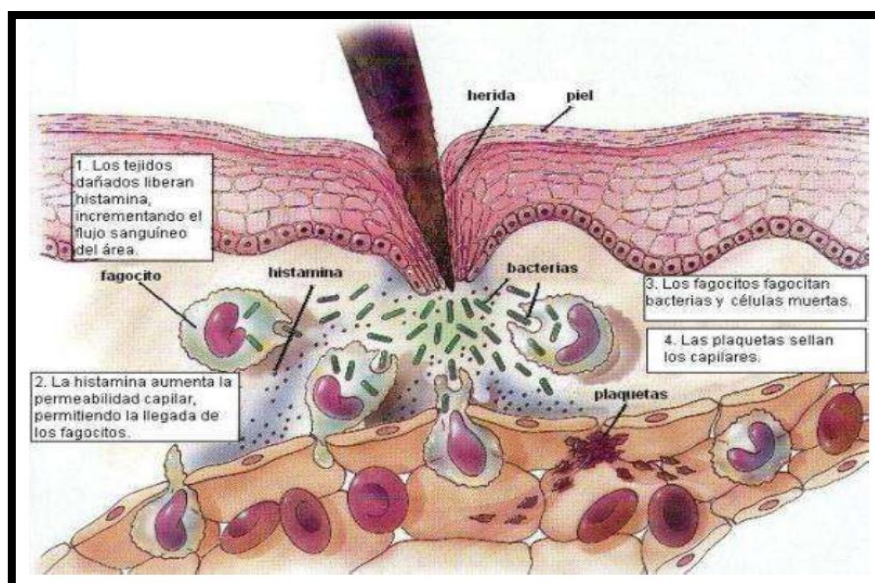


Figura 10. Pasos de la respuesta inflamatoria⁵⁰

2.2.3.1. Fases de la inflamación⁵²

- ✓ **Liberación de mediadores.** Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
- ✓ **Efecto de los mediadores.** Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
- ✓ **Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.** Proceden, en su mayor parte, de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.

- ✓ **Regulación del proceso inflamatorio.** Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
- ✓ **Reparación.** Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

2.2.3.2. Clasificación de la inflamación

Clínicamente se distinguen la inflamación aguda y la inflamación crónica.

Inflamación aguda

Suele ser de iniciación brusca, con síntomas muy manifiestos y de corta duración. Se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos. Constituye una respuesta natural, de carácter protector, que pretende librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias que esta provoca. La alteración de la permeabilidad constituye la característica principal y de mayor especificidad, provoca el exudado profuso hacia el intersticio. La pérdida de proteínas del plasma reduce la presión osmótica intravascular y el incremento en el intersticio; secundario a la vasodilatación aumenta la presión hidrostática intravascular, lo que conduce a una importante salida y acumulación de líquido en el tejido intersticial, formándose finalmente el edema ofensor⁵³.

Esta es notable por la intensidad de los síntomas generales y locales. Según su rapidez se distingue la inflamación aguda como el grado más alto de la inflamación con caracteres anatómicos muy marcados y síntomas intensos. Mientras la inflamación subaguda presenta los síntomas poco intensos, su curso es menos rápido que en las inflamaciones ordinarias, además es la transición de la inflamación aguda a la crónica⁵⁴.

Varios son los elementos implicados en la respuesta inflamatoria aguda (RIA), entre ellos: el plasma, células circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos), los vasos sanguíneos y los constituyentes celulares (mastocitos, fibroblastos y macrófagos) y extracelulares (colágeno, elastina, glicoproteínas de adhesión como la fibronectina, laminina, colágeno no fibrilar, tenascina, y proteoglicanos) del tejido conjuntivo además; la respuesta celular y vascular de la RIA están mediadas por factores químicos provenientes del plasma o de las células que son activadas por el propio estímulo inflamatorio. Estos mediadores actúan de forma aislada, secuencial o en combinación, y en fases posteriores amplifican la respuesta inflamatoria e influyen en su evolución. Las células y tejidos necróticos también pueden activar la formación de mediadores químicos⁵³.

Medidor Químico	Acción
Histamina y serotonina (aminas vasoactivas)	Incremento de la permeabilidad.
Bradicinina	Incremento de la permeabilidad y dolor.
C3a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad opsonina.
C5a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria.
Prostaglandinas (metabolismo del ácido araquidónico)	Vasodilatación, dolor, fiebre, activa a otros mediadores.
Leucotrieno B4 (metabolismo del ácido araquidónico)	Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria.
Leucotrieno C4, D4, E4 (metabolismo del ácido araquidónico)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, vasoconstricción.
Metabolitos del oxígeno (radicales libres)	Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular.
Factor activador de plaquetas (PAF)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, cebado de leucocitos.
Interleucina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF)(citocinas)	Reacciones de fase aguda, activación endotelial, quimiotaxis.
Oxido nítrico	Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad.

Mediadores químicos de la respuesta inflamatoria aguda⁵³

Inflamación crónica

La inflamación crónica puede comprender una duración prolongada en el tiempo (semanas, meses) comprendido por el constante estímulo inflamatorio. Este proceso se origina por una progresión de episodios agudos mal resueltos y repetidos. Además, su etiología es variable. Puede originarse por organismos infecciosos que han resistido o evadido la fagocitosis, sobreviviendo en regiones dañadas y mal drenadas como los abscesos. El origen del estímulo inductor de la inflamación crónica reside en la regulación de la respuesta inmunitaria y la producción de anticuerpos contra tejidos propios (autoanticuerpos). Clínicamente la inflamación crónica se caracteriza por la ausencia de algunos signos como: calor, enrojecimiento son menores y la fiebre es menor y cíclica⁵⁵.

Se caracteriza porque implica principalmente células mononucleares, fibroblastos y formación de nuevos vasos

sanguíneos llamados “tejidos de granulación”. Este proceso además de ser exudativo (sólido, blanco o grisáceo), suele ser productivo o proliferativo. Es así que las células tienden a producir sustancias que añaden tejido nuevo, como el colágeno y los nuevos vasos sanguíneos, siendo así más hinchadas y firmes. De esta manera tiene cierta relación con el proceso de reparación⁵⁶.

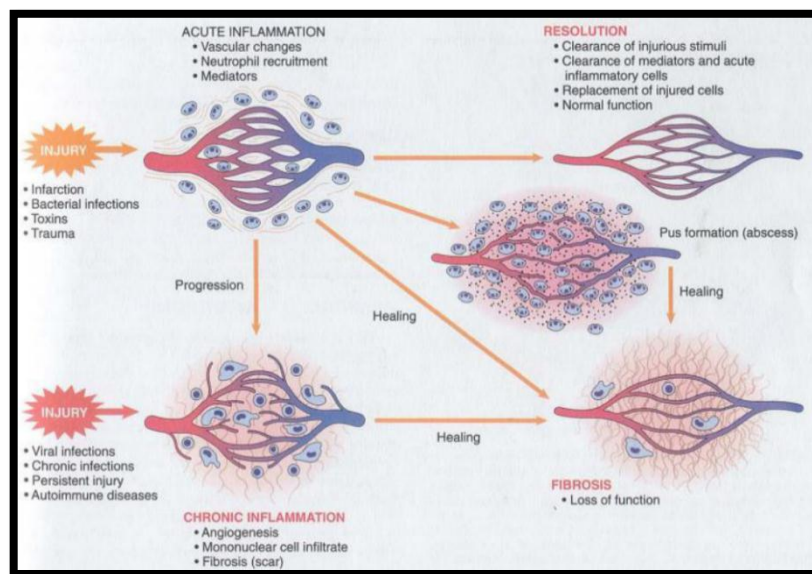


Figura 11. Respuesta inflamatoria crónica⁵⁶

Características histológicas. La inflamación crónica⁵⁵ se caracteriza por:

- ✓ *Infiltración por células mononucleares, como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, que refleja reacción persistente a la lesión.*
- ✓ *Destrucción tisular, inducida principalmente por las células inflamatorias.*

- ✓ *Intentos de reparación mediante sustitución por tejido conjuntivo del tejido lesionado, con proliferación de vasos de pequeño calibre (angiogénesis) y en especial con fibrosis.*

2.2.4. Mecanismo del edema subplantar inducido por carragenina

*Este método consiste en la administración subplantar de una solución de carragenina, un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondus crispus*. Este mucopolisacárido de origen marino provoca una respuesta inflamatoria caracterizada por una serie de fases. La primera es precoz y debida al trauma de la inyección, a la que sigue un proceso: en la primera fase, que se extiende durante la primera hora, intervienen aminas vasoactivas como la histamina y serotonina, mientras que, en la segunda fase, comprendida entre 1.5 y 2.5 h, interviene las cininas. En una fase tardía, desde las 2.5 a las 6 h, son las prostaglandinas PGE1, PGE2 y PGF2 los principales mediadores.*

Es en esta fase tardía, cuando la respuesta vascular se hace máxima y estable (entre las 4 y 6 h). 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 del AA⁵⁷.

En este modelo los niveles de COX-2 se ven incrementados por la reacción inflamatoria y por consiguiente hay un aumento de prostaglandinas que incrementan la formación del edema y filtración

leucocitaria al promover el flujo sanguíneo de la región inflamada. En ese sentido la inhibición de la COX da como resultado una disminución en la producción de prostaglandinas en el sitio de la inflamación, así como a nivel espinal⁵⁸.

2.2.5. Dolor

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor ha definido el dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a una lesión tisular real o potencial o descrita en términos de tal daño⁵⁹.

La llegada del estímulo doloroso al sistema nervioso central puede provocar varios tipos de respuesta, a veces simultáneas y otras bien diferenciadas; la primera respuesta es un acto reflejo medula involuntario y las demás requieren que el estímulo alcance estructuras superiores en el sistema nervioso central⁶⁰.

La conciencia del dolor requiere de la participación de la corteza cerebral y el componente efectivo depende, fundamentalmente del sistema límbico⁶⁰.

Los nociceptores son terminaciones periféricas de fibras aferentes primarias que perciben el dolor, pueden ser activados por diversos estímulos, como calor, ácidos o presión. Los mediadores inflamatorios liberados por células no neuronales durante la lesión de los tejidos aumentan la sensibilidad de los nociceptores y potencian la percepción del dolor. Algunos de los principales componentes son la bradicinina, neurotransmisores como la

serotonina y el ATP, neutrófinas (factor de crecimiento), LT, y PG. Las citosinas al parecer liberan PG y algunos de los demás mediadores. Es posible que los neuropéptidos, como la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, también desencadenen el dolor⁶⁰.

2.2.5.1. Clasificación del dolor

El dolor puede clasificarse como **AGUDO** o **CRONICO**. La diferencia entre ambos no es únicamente una cuestión de temporalidad:

Dolor agudo

Dolor cuya duración es menor de tres meses, es la consecuencia inmediata de la activación de los sistemas nociceptivos por una noxa. Tiene función de protección biológica (alarma a nivel del tejido lesionado). Los síntomas psicológicos son escasos y aparece por la estimulación química, mecánica o térmica de nociceptores específicos⁶⁰.

Dolor crónico

Cuando ha tenido una duración mayor de tres meses, en forma continua o intermitente, no posee una función protectora, y más a que un síntoma se considera como una enfermedad. Es un dolor persistente que puede auto perpetuarse por un tiempo prolongado después de una lesión, e incluso en ausencia de ella. Suele ser refractario a los tratamientos y se asocia a importantes síntomas psicológicos⁶⁰.

2.2.6. Nociceptores

Los nociceptores son un grupo especial de receptores sensoriales capaces de diferenciar entre estímulos inocuos y nocivos, reciben y transforman los estímulos locales en potenciales de acción que son transmitidos a través de las fibras aferentes sensoriales primarias hacia el SNC. Tienen la capacidad de codificar la intensidad del impulso en una frecuencia de impulsos. Los nociceptores no suelen adaptarse al estímulo, por el contrario, tienden a sensibilizarse, es decir, disminuye el umbral a medida que el estímulo lesivo persiste, lo cual en parte explica el fenómeno de la hiperalgesia⁶¹.

El umbral de dolor de estos receptores no es constante y depende del tejido donde se encuentren. Se distinguen 3 tipos de nociceptores: Nociceptores Cutáneos, Nociceptores Musculo – Articulares y Nociceptores Viscerales.

Nociceptores cutáneos⁶⁰

Presentan un alto umbral de estimulación y sólo se activan ante estímulos intensos y no tienen actividad en ausencia de estímulo nocivo. Existen 2 tipos:

- ✓ Nociceptores A – δ situados en la dermis y epidermis. Son fibras mielínicas con velocidades de conducción alta y responden a estímulos mecánicos, produciendo un dolor agudo (pinchazo y al pellizco aplicados a la piel o a la penetración de objetos punzantes).*

Se cree en general que los receptores A δ transmiten la sensación de “primer dolor” o “dolor rápido” (tarda unos 300 ms) mediando la primera respuesta adaptativa al dolor (retirada). Es un dolor bien delimitado. Considerados termo-nociceptores que se activan a temperaturas superiores a 45°C o inferiores a 5°C.

- ✓ *Nociceptores C amielínicos, con velocidades de conducción lenta. Se sitúan en la dermis y responden a estímulos de tipo mecánico, químico y térmico, y a las sustancias liberadas de daño tisular.*

2.2.6.1. Mecanismos de activación y modulación de los nociceptores⁶⁰

El estímulo doloroso libera sustancias que estimulan las fibras sensoriales periféricas, entre ellas:

- ✓ *Iones (H^+ y K^+)*
- ✓ *Aminas (serotonina, noradrenalina e histamina)*
- ✓ *Citocinas*
- ✓ *Eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos)*
- ✓ *Cininas*
- ✓ *Péptidos (sustancia)*

Algunas de estas sustancias estimulan directamente al nociceptor y otras modifican su sensibilidad frente a otros agentes.

En relación a la estimulación del receptor, hay que distinguir dos situaciones:

- ✓ *La estimulación inicial de un nociceptor no sensibilizado previamente.*

- ✓ *La estimulación nociceptiva en presencia de una lesión inflamatoria que induce la liberación de mediadores químicos y que es característica de procesos lesivos más duraderos. En este caso, aparecen fenómenos de SENSIBILIZACIÓN e HIPERALGESIA PERIFÉRICA que modifican el estado basal del nociceptor, alterando la respuesta habitual frente al estímulo.*

2.2.7. Test de la placa caliente o hot plate⁶²

El Hot Plate se trata de un test en el que el estímulo nociceptivo aplicado es de naturaleza térmica. Las respuestas consideradas como señal de nocicepción son de tipo elemental como el lamido de las patas y/o respuestas integradas a un nivel supraespinal como el salto.

En este test el aparato consta de una superficie metálica que mediante un sistema de resistencias eléctricas puede mantenerse a la temperatura deseada. Posee también un cilindro de material plástico transparente que permite el confinamiento del animal a la superficie caliente y la observación de este en todo momento. Así mismo dispone de un cronómetro que permite registrar con una exactitud de 0,1 segundos el tiempo de permanencia bajo el estímulo nociceptivo.

2.3. Marco conceptual

- ✓ **AINE:** *Antiinflamatorio No Esteroideo, son medicamentos que se usan para tratar tanto el dolor como la inflamación.*

- ✓ **Extracto Vegetal:** es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.
- ✓ **Screening Fitoquímico:** es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.
- ✓ **Antioxidante:** es cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación de otras moléculas.
- ✓ **Inflamación:** es la respuesta fisiológica de defensa del organismo a estímulos nocivos.
- ✓ **Dolor:** es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a una lesión tisular real o potencial.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Tipología de la investigación

Tipo Básico

3.2. Nivel de investigación

Nivel Descriptivo

3.3. Diseño de investigación

Diseño Experimental

3.4. Materiales

Material botánico

- *Flores de Waltheria ovata Cav “Lucraco”*

Material biológico

- *Ratones hembra con peso promedio de 25 a 30 g, procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS)*

Fármacos utilizados

- *Ácido acetil salicílico*
- *Tramadol*

Material de laboratorio

- *Probetas*
- *Pera de bromo*
- *Matraz*
- *Varilla de vidrio*
- *Embudo*
- *Vasos precipitados*
- *Pipetas*

- *Placa de porcelana*
- *Fiola*
- *Jaulas metalicas*
- *Equipo de disección*
- *Jeringas descartables de 1,5 mL*
- *Tubos de ensayos*
- *Viales*
- *Gradillas*
- *Entre otros*

Reactivos

- *Etanol 96°*
- *Diclorometano*
- *Agua destilada*
- *Reactivos para realizar Screening fitoquímico*
- *Suero fisiológico*
- *Reactivo 2,2 - difenil - 1- picrilhidrazil (DPPH)*
- *Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2- carboxílico 97%*
(Trolox)
- *Reactivo 2,2' - azinobis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfónico)*
(ABTS)
- *Carragenina*

Equipos

- *Balanza de precisión BL- 600.*

- *Evaporador rotatorio marca HEIDOLPH modelo LABOROTA 4000.*
- *Balanza analítica Sartorius ED 2245.*
- *Espectrofotómetro UV/Vis UNICO SQ-2802.*
- *Plancha eléctrica.*
- *Micropipeta BOECO LS - 80*
- *Hot Plate LE 7406*

3.5. Técnicas y procedimientos de recolección de datos

3.5.1. Recolección

*Se recolectó las flores de la especie *Waltheria ovata* Cav “Lucraco” durante la mañana en las inmediaciones de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, ubicado a 14°05'18.4"S y 75°44'01.4"W de latitud y longitud, a una elevación de 378 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m), provincia de Ica, departamento de Ica en el mes de Mayo del 2018, época de floración. Una vez recolectado fueron transportadas en bolsas hechas con papel craft. Posteriormente las flores fueron pasadas por un tamiz para eliminar el polvo y seleccionadas las que se encontraban en buen estado, separando manualmente las deterioradas, manchadas y con señales de ataque por insectos y/o hongos.*

Luego se realizó una desecación natural bajo sombra, en una superficie limpia por un periodo de 15 días y luego fueron estabilizadas en una estufa a 35°C, se trituraron de forma manual

obteniendo 500 g de flores secas y se almacenó en un ambiente fresco y seco.

La planta fue enviada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su clasificación taxonómica.

3.5.2. Screening fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico, es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta. Consiste en la extracción de esta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración⁶³.

Se utilizó 500 g de flores secas de la especie *Waltheria ovata* Cav “Lucraco”, se maceraron con 700 mL de etanol de 96° por 20 horas a temperatura ambiente y luego se reflujo por espacio de 4 horas con etanol de 96°. Se filtró, y a este filtrado se llamó Fracción “A”, del cual se separó 50 mL para efectuar reacciones de identificación. El resto 650 mL se concentró a presión reducida utilizando una bomba de vacío.

Luego se extrajo con HCl al 1% (2x20mL) empleando un embudo de decantación, se filtró y se obtuvo dos partes: la insoluble y la solución ácida (soluble).

Insoluble: Se lavó hasta pH neutro con agua destilada, seguidamente fue disuelto con 5 mL de Diclorometano (CH_2Cl_2), se

secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró para obtener la Fracción "B"

Solución Ácida: Se colocó en una pera de bromo, se neutralizó con hidróxido de amonio y se extrajo con diclorometano (2x25mL), obteniéndose dos fases orgánicas

Fase Diclorometánica: Se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se obtuvo la Fracción "C".

Fase Acuosa: Se saturó con sulfato de sodio anhidro y se extrajo con diclorometano: etanol (3:2) (2x25mL) un embudo de decantación. Así se obtuvo dos fases: la fase orgánica (Diclorometánica-etanólica), que constituyó la Fracción "D" y por último la fase acuosa remanente formó parte de la fracción "E".

Finalmente, todas las fracciones fueron secadas para realizar las reacciones de identificación correspondiente a cada una de ellas.

(Ver figura 12).

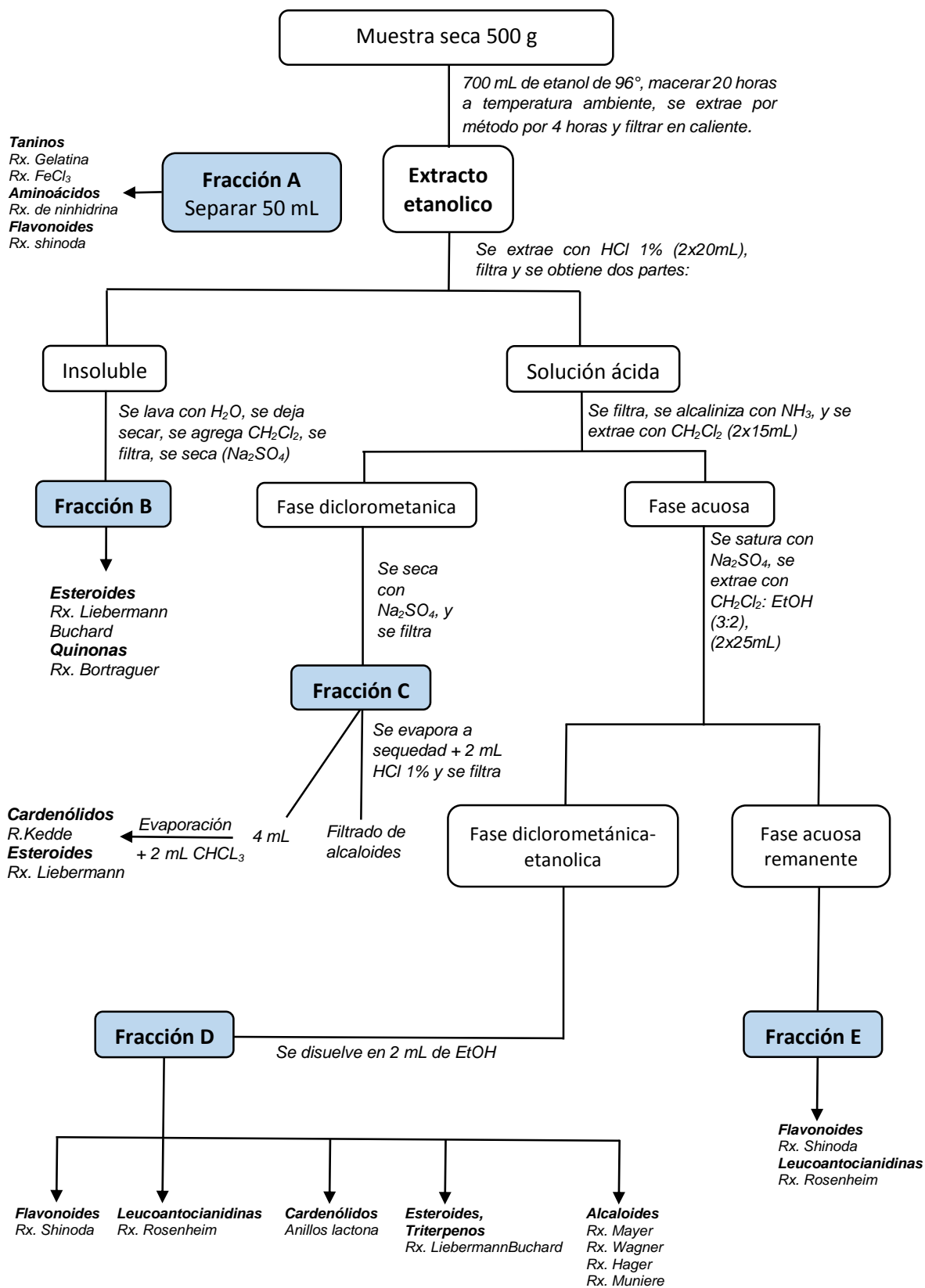


Figura 12. Esquema general de una marcha fitoquímica⁶⁴

3.5.3. Evaluación de la actividad antioxidante

*La actividad antioxidante del extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav “Lucraco” fue evaluada por tres métodos diferentes debido a que se conoce que los antioxidantes pueden actuar por diferentes mecanismos dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria u oxidante. Los resultados fueron expresados en unidades aceptadas internacionalmente como capacidad antioxidante equivalentes en Mm de Trolox.*

La actividad antioxidante fue evaluada en función al Poder Reductor (Ferrocianuro de Potasio), Inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) donde se determinó el IC₅₀ y Reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio) (ABTS).

Método de inhibición frente al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH):

El método que se empleó en el trabajo, es el propuesto por Brand-Williams et al. (1995)⁶⁵ con algunas modificaciones. Dicho radical tiene un electrón desapareado y presenta un color violeta el cual cambia a amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante, se medirá esta reacción en un espectrofotómetro.

Se preparó una solución a 0,1 mM de DPPH, pesando 3,9 mg de DPPH en un matraz aforado previamente tarado y se disolvió en 100 mL de etanol, la solución se colocó en un sonicador para asegurar la buena disolución y luego comprobar que la absorbancia a 517 nm

esté entre 0,9 y 1,1. El matraz se cubrió con papel de aluminio para la protección frente a la luz.

En los viales con las concentraciones correspondientes, se agregó 2,9 mL de DPPH posteriormente se adicionará 0,1 mL en cada una de las diluciones de las fracciones A, B, C, D y E de *Waltheria ovata* Cav, esta mezcla se dejó en reposo y oscuridad durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 517 nm.

La fracción D que resultó más activa, se determinó su actividad antioxidante por los métodos ABTS y Poder Reductor expresando en mili equivalente de trolox.

Método del poder reductor (Ferrocianuro de Potasio)

El poder del extracto de reducir el ion Fe^{3+} fue determinado mediante el método de Hazra et al⁶⁶.

Se determinó la actividad antioxidante mediante diferentes concentraciones (0,3125 hasta 5 mg/mL). El extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav "Lucraco" (0.5 mg) se mezcló con 0.5 mL de solución amortiguadora de fosfato (0,2 M pH 6,6) y 0.5 mL ferrocianuro de potasio (0,1 %), seguido de incubación a 50 °C en un baño de agua durante 20 minutos. Luego se añadió 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % para determinar la reacción. Se adicionó 1 mL de solución de $FeCl_3$ (0,01%). La mezcla se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 700 nm contra agua destilada como blanco. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron

en relación al Trolox. Para ello se realizó una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 1.00 a 0.0625 mM y se procedió igual que la muestras.

Método reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio) (ABTS).

Se realizó según el método propuesto por Re R. et al. (1999), empleando la capacidad antioxidante del ABTS⁺ y su habilidad de secuestrar radicales de larga vida⁴⁵. En este método, la generación del radical ABTS[•] se produce por medio químico mediante la adición de persulfato de potasio antes de la adición de la muestra, lo que evita que los componentes de la misma puedan reaccionar con el reactivo, otra ventaja es que se trabaja a pH fisiológico (pH 7,1), a una temperatura de 37°C simulando las condiciones fisiológicas.

Se evaluó la actividad antioxidante de la fracción D que fue la más activa mediante diferentes concentraciones (0,0196 hasta 0.3125 mg/mL). Se pesó 0.0504 g de la sal amónica cristalizada de ABTS y se disolvió en 5 mL de agua ultra pura, luego se adicionó 6.7 mg de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) y se dejó agitando por espacio de media hora protegido de la luz, pasado este tiempo se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se enrasó con agua ultra pura y se dejó reaccionar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 12 a 18 horas. Transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 1 mL y se adicionó 70 mL de tampón fosfato de pH 7.1 y se midió la absorbancia a 734 nm la cual debe estar entre 0.680 ± 0.2 .

Para la medida de la actividad antioxidante se tomó 2 mL del radical ABTS en una cubeta y se midió su absorbancia inicial a 734 nm, posteriormente se añadió 50 mL de la fracción más activa, se mezcló durante 10 segundos y después de 4 minutos de incubación se midió la absorbancia final a 734 nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados se expresaron en base al trolox como en el método anterior.*

3.5.4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria por el método edema subplantar en ratones hembra inducido por carragenina.

Este método se basa en la administración subplantar de sustancias capaces de desencadenar una respuesta inflamatoria (edema) la cual es medida por diferencia ponderal de las patas. La capacidad del extracto en estudio, (administrado previamente), de inhibir dicha respuesta es determinada comparando con drogas de actividad conocida (patrones positivos) y un grupo control.

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se usó como agente flogístico carragenina al 3% en suero fisiológico, usándose ácido acetilsalicílico como patrón positivo. Con la finalidad de determinar la dosis más efectiva, se ensayarán dosis de: 250, 500 y 750 mg/Kg. Los animales de experimentación fueron divididos en 5 grupos de 5 animales cada uno. El extracto etanólico a diferentes dosis, el fármaco estándar y vehículo fueron administrados por vía oral. Después de 60 minutos se inyectó 0.05 mL de Carragenina 3% (en solución salina) en la región subplantar de la pata derecha del

ratón hembra, la pata izquierda recibirá igual volumen de solución salina. La inflamación fue medida por diferencia ponderal de las patas.

El porcentaje de actividad antiinflamatoria fue calculado por comparación con el grupo control usando la fórmula siguiente:

$$\% \text{Actividad Antiinflamatoria} = \frac{I_c - I_t}{I_c} \times 100$$

Dónde: I_c = Inflamación media del grupo control.

I_t = Inflamación media del grupo tratado (extractos o fármaco de referencia).

3.5.5. Evaluación de la actividad analgésica por el método de placa caliente (hot plate)

El método de Placa caliente mide la latencia de la respuesta de fuga o de autoprotección cuando los ratones hembra son sometidas al estímulo térmico. Los extractos de prueba, control y fármaco de referencia se administraron 1 hora antes, determinándose la capacidad de los mismos de modificar dicha respuesta.

El ensayo consistió en tomar inicialmente el tiempo de reacción basal en el algesímetro de placa caliente (Hot Plate), calibrado a una temperatura de $53.5 \pm 1^\circ \text{C}$ para determinar la latencia de la respuesta nociceptiva, el tiempo máximo de contacto del animal con la placa caliente no deberá ser mayor de 30 segundos para evitar lesionar la patas.

Luego se les administró las diferentes dosis del extracto etanólico de 250, 500 y 750 mg/Kg, el grupo testigo recibió tramadol a una dosis

de 50 mg/Kg. y el grupo control un volumen equivalente del vehículo. A cada grupo por separado, después de 60 minutos se evaluó el tiempo de reacción llevando a los ratones nuevamente a la placa caliente (hot plate) y se determinó por los segundos que tarda el animal en presentar incomodidad (desplazarse rápidamente, lamerse las patas e incluso saltar), lo que es considerado como manifestación de dolor.

La actividad analgésica térmica se evaluó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad Analgésica} = \frac{TRt - TRc}{TRc} \times 100$$

Dónde:

TRt = Tiempo de reacción del grupo tratado.

TRc = Tiempo de reacción del grupo control.

3.6. Técnicas de procesamiento de la información

Los resultados se presentan en tablas de frecuencia con el promedio \pm media desviación estándar. Los datos fueron sometidos a pruebas estadísticas para determinar la normalidad de datos. Para la contrastación de hipótesis se ha utilizado la prueba de Kruskal Wallis y el test de Dunn como post-test (statistical package for social sciences). Para el análisis de datos se ha empleado el programa SPSS v. 20.0 for Windows. Se consideró como nivel de significación un valor de $p < 0,05$.

3.7. Aspectos éticos

Al momento de presentar el proyecto de tesis, la universidad de Ica no contaba con un código de ética para animales de experimentación aprobado pero que actualmente si cuenta con este código.

El presente trabajo se utilizó como animales de experimentación ratones hembra, por lo cual se empleó el menor número posible de animales que permitieron efectuar los análisis estadísticos. Se siguió los aspectos fijados en las “Normas para la Investigación en Animales”, aprobados por el directorio del Consejo Nacional de Investigaciones Científica y Tecnológica (CONICIT), Caracas-Venezuela y las directrices éticas de la Organización Mundial de la Salud. En el presente trabajo se utilizó el menor número posible de animales de experimentación.

CAPITULO IV

4.1. Resultados

4.1.1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto

etanólico *Waltheria ovata* Cav. "Lucraco"

Tabla 01. Resultados del screening fitoquímico del extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav "Lucraco"

FRACCIONES	METABOLITOS	RESULTADO
A	Flavonoides	+
	Grupos aminos libres	+
	Grupos Fenólicos	+
	Taninos	+
B	Triterpenos y/o Esteroides	+
	Quinonas	-
C	Alcaloides	+
	Triterpenos y/o Esteroides	-
D	Alcaloides	+
	Flavonoides	+
	Triterpenos y/o esteroides	+
	Leucoantocianidinas	+
E	Leucoantocianidinas	+
	Flavonoides	+

Fuente: El autor

(+): Presencia

(-): Ausencia

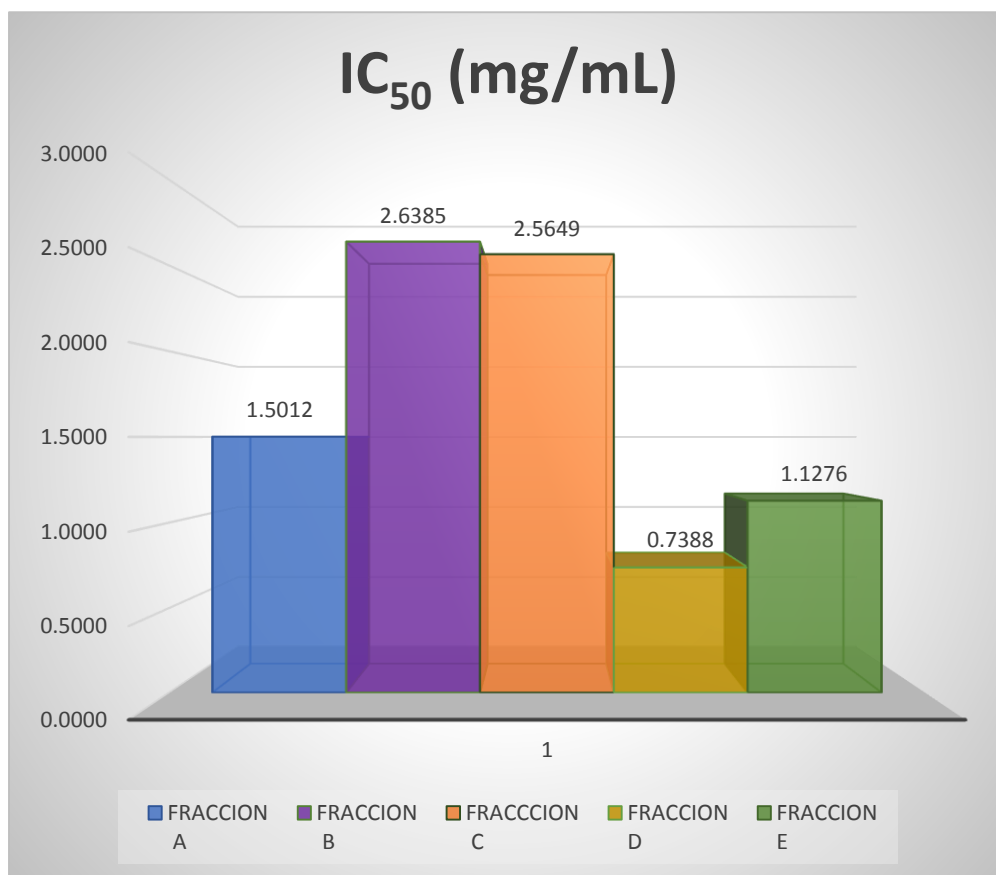
4.1.2. Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Tabla 02. Resultados del IC₅₀ (mg/mL) de las concentraciones de las diferentes fracciones del extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav. “Lucraco”

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (mg/mL)	ABS INICIAL	ABS FINAL	% DE INHIBICIÓN	IC ₅₀ mg/mL
FRACCIÓN A	0.3125	0.977	0.781	20.0614	1.5012
	0.625	0.982	0.625	36.3544	
	1.25	0.979	0.421	56.9969	
	2.5	0.979	0.247	74.7702	
	5	0.973	0.069	92.9085	
FRACCIÓN B	0.312	0.977	0.885	9.4166	2.6385
	0.625	0.981	0.812	17.2273	
	1.25	0.977	0.617	36.8475	
	2.5	0.977	0.449	54.0430	
	5	0.976	0.188	80.7377	
FRACCIÓN C	0.312	0.98	0.854	12.8571	2.5649
	0.625	0.979	0.755	22.8805	
	1.25	0.978	0.607	37.9346	
	2.5	0.978	0.440	55.0102	
	5	0.977	0.205	79.0174	
FRACCIÓN D	0.078	0.981	0.899	8.3588	0.7388
	0.156	0.978	0.829	15.2352	
	0.312	0.980	0.713	27.2449	
	0.625	0.983	0.546	44.4557	
	1.25	0.978	0.203	79.2434	
FRACCIÓN E	0.1562	0.978	0.874	10.6339	1.1276
	0.3125	0.977	0.785	19.6520	
	0.625	0.983	0.628	36.1139	
	1.25	0.977	0.349	64.2784	
	2.5	0.986	0.079	91.9878	

Fuente: El autor

Se puede observar en la **tabla 02** que la concentración de la fracción D, es la que presenta una baja concentración de 0.7388 g/mL para un IC₅₀



Gráfica 01. IC₅₀ de las diferentes fracciones del extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav “Lucraco”

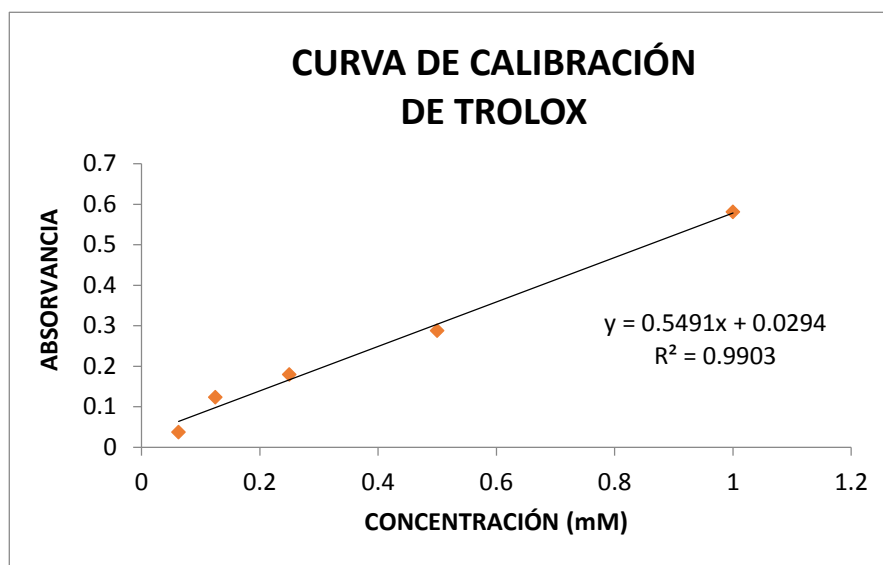
4.1.3. Método de reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS)

Tabla 03. Valores de la curva de calibración de Trolox por el método de ABTS

CONCENTRACION (mM)	ABSORVANCIA	SD
0.0625 mM	0.0380	0.0014
0.125 mM	0.1235	0.0007
0.25 mM	0.1795	0.0021
0.5 mM	0.2885	0.0007
1 mM	0.5815	0.0021

Fuente: El autor

SD: Desviación estándar



Gráfica 02. Curva de calibración de Trolox por el método de ABTS

Partiendo de los datos obtenidos frente al radical ABTS del trolox, se construyó una curva de calibración (ver figura 02) que permite verificar la dependencia lineal de las absorbancias del radical vs la concentración del Trolox, obteniéndose un R^2 de 0.9903

Tabla 04. Valores de la curva de calibración de las diferentes concentraciones (mg/mL) equivalente al Trolox

CONCENTRACION (mg/mL)	ABSORVANCIA	EQUIV. A TROLOX
0,0196 mg/mL	0.0815	0.0948 ± 0.0035
0,0391 mg/mL	0.1285	0.1804 ± 0.0021
0,0782 mg/mL	0.1790	0.2724 ± 0.0141
0.1562 mg/mL	0.3175	0.5267 ± 0.0035
0.3125 mg/mL	0.5290	0.9098 ± 0.0056

Fuente: El autor

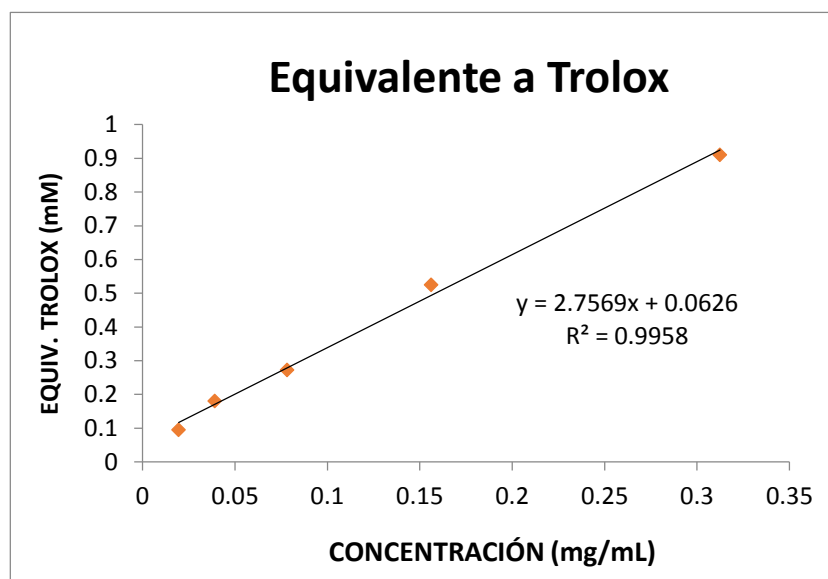


Gráfico 03. Actividad antioxidante equivalente en mM de Trolox de extracto etanólico de flores de *Waltheria ovata Cav* "Lucraco"

La actividad antioxidante del extracto etanólico de *Waltheria ovata Cav* "Lucraco" por el método de ABTS, se calculó como equivalente en mM de Trolox, tomando como base la ecuación de la recta de calibración:

$$y = 2,7569x + 0,0626; R^2 = 0,9958$$

$$TEAC (1mM) = 0,34mg/mL$$

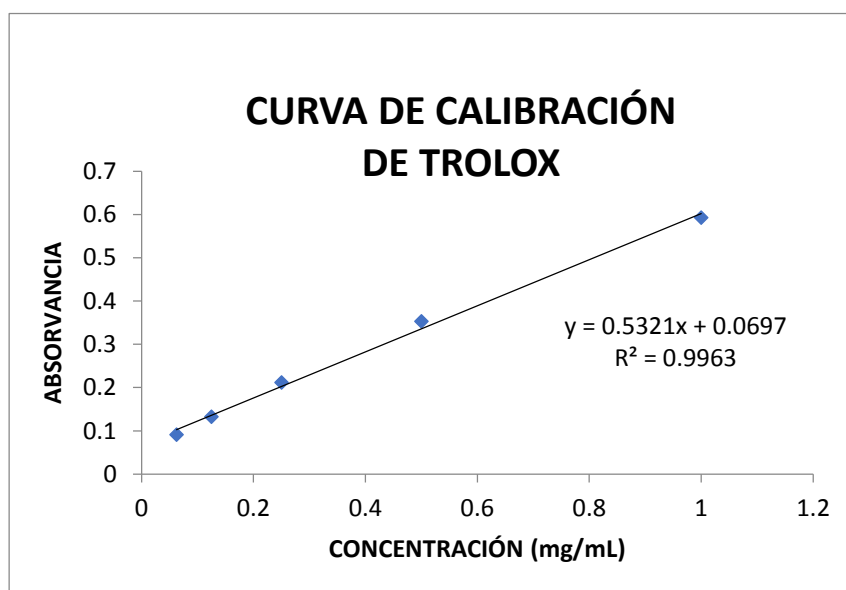
4.1.4. Método del Poder Reductor (Ferrocianuro de Potasio)

Tabla 05. Valores de la curva de calibración de Trolox por el método del Poder Reductor.

CONCENTRACION (mM)	ABSORVANCIA	SD
0.0625 mM	0.0905	0.0021
0.125 mM	0.1325	0.0021
0.25 mM	0.2115	0.0049
0.5 mM	0.3525	0.0021
1 mM	0.5925	0.0190

Fuente: El autor

SD: Desviación estándar



Gráfica 04. Curva de calibración de Trolox por el método del Poder Reductor (Ferrocianuro de Potasio)

Los resultados de la medición de la actividad del Trolox frente al reactivo se encuentran en la tabla 05, corroborando la linealidad del Trolox para las concentraciones evaluadas que van de 0.0625 mM a 1 mM. Como se evidencia en la curva de calibración (ver gráfico 04), obteniéndose un R^2 de 0.9963.

Tabla 06. Valores de la curva de calibración de las diferentes concentraciones (mg/mL) equivalente al Trolox

CONCENTRACION (mg/mL)	ABSORVANCIA	EQUIV. A TROLOX
0,3125 mg/mL	0.2630	0.3637 ± 0.0014
0,625 mg/mL	0.3145	0.4587 ± 0.0049
1,25 mg/mL	0.4080	0.6310 ± 0.0070
2,5 mg/mL	0.5700	0.9297 ± 0.0424
5 mg/mL	0.8425	1.4523 ± 0.0077

Fuente: El autor

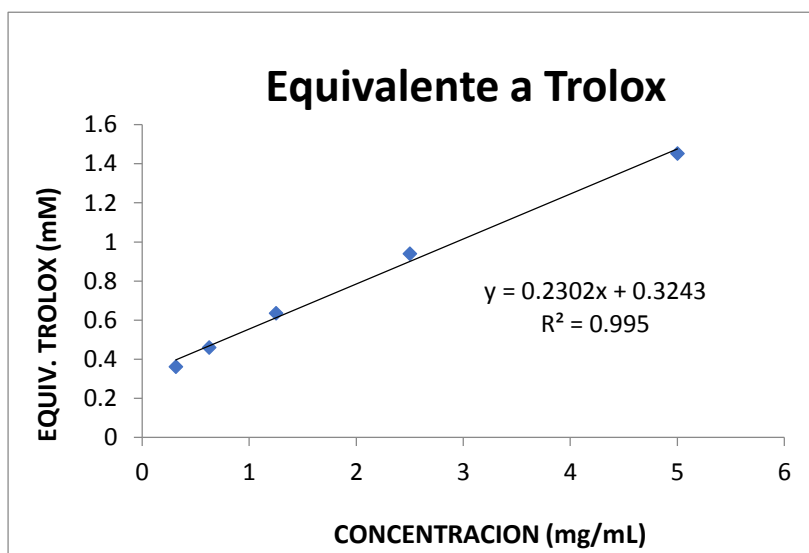


Gráfico 05. Actividad antioxidante equivalente en mM de Trolox de extracto etanólico de flores de *Waltheria ovata* Cav "Lucraco"

La actividad antioxidante del extracto etanólico de *Waltheria ovata* Cav "Lucraco" por el método del Poder Reductor (Ferrocianuro de Potasio), se calculó como equivalente en mM de Trolox, tomando como base la ecuación de la recta de calibración:

$$y = 0,2302x + 0,3243; R^2 = 0,995$$

$$TEAC (1mM) = 2,94 \text{ mg/mL}$$

4.1.5. Actividad antiinflamatoria por el método de edema subplantar en ratones inducido por carragenina

Tabla 07. Valores de la actividad antiinflamatoria a diferentes concentraciones

TRATAMIENTO Y DOSIS	% INFLAMACIÓN	% DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA
Control negativo	58.86 ± 12.1504	00.00
250 mg/Kg	46.73 ± 13.0657	20.62
500 mg/Kg	25.94 ± 5.7284*	55.93*
750 mg/Kg	37.82 ± 21.8121	35.75
Ácido acetilsalicílico 100 mg/Kg	23.86 ± 3.4909*	59.46*

Fuente: El autor

Posee diferencia significativa con respecto al control negativo $p < 0.05$ Test de Dunn's

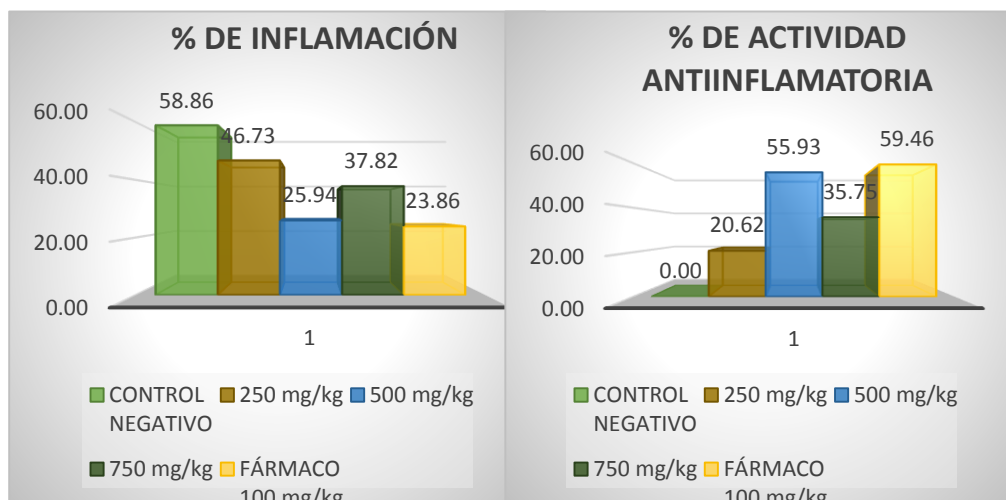


Gráfico 06. Actividad antiinflamatoria de extracto etanólico de flores de *Waltheria ovata Cav "Lucraco"*

Se puede observar en el **gráfico 05**, a la concentración de 500 mg/kg presenta una actividad antiinflamatoria de 55.93 % similar al fármaco de referencia ácido acetilsalicílico 100 mg/kg con 59.46 %, pues una explicación posible sería la actividad inhibitoria de las prostaglandina sintetasa.

4.1.6. Método de la Placa Caliente (Hot Plate)

Tabla 08. Valores de la actividad analgésica a diferentes concentraciones

TRATAMIENTO Y DOSIS	TIEMPO DE REACCIÓN (segundos)	% DE ACTIVIDAD ANALGÉSICA
Control negativo	8.90 ± 1.54	0.00
250 mg/Kg	14.34 ± 6.45	61.04
500 mg/Kg	24.47 ± 3.19	174.76*
750 mg/Kg	20.06 ± 2.20	125.31
Tramadol 50 mg /Kg	24.89 ± 3.19	179.54*

Fuente: El autor

Posee diferencia significativa con respecto al control negativo

$p < 0.05$ Test de Dunn's

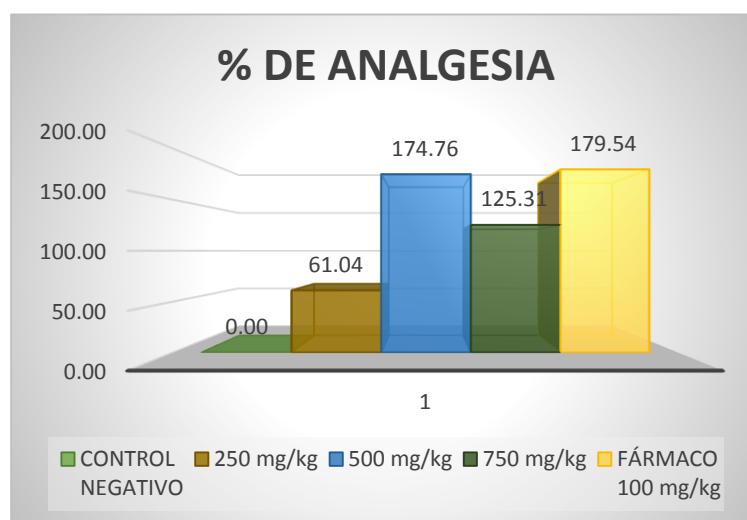


Gráfico 07. Actividad analgésica de extracto etanólico de flores de *Waltheria ovata* Cav "Lucraco"

Como se puede observar en el **gráfico 05**, a la concentración de 500 mg/kg presenta una actividad analgésica de 174.76% similar al fármaco de referencia tramadol 50 mg/kg con 179.54 %, ello se debería a los flavonoides, por inhibición de la ciclooxigenasa.

4.2. Discusión

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal: Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav. "Lucraco". En el estudio fitoquímico se ha identificado la presencia de metabolitos secundarios (ver tabla 01), tales como grupos fenólicos, alcaloides, leucoantocianidinas y flavonoides principalmente. Se evidenció la presencia de alcaloides y ausencia de quinonas en comparación a la especie de Waltheria indica según lo reportado por Nidia et al., (2008)⁶⁷, demostró la ausencia de alcaloides pero la si la presencia de quinonas, donde los alcaloides y quinonas son al parecer el marcador fitoquímico de esta especie, ello puede deberse a la zona climática. El no determinar la presencia de quinonas demuestra que las propiedades medicinales de Waltheria ovata Cav. que se desarrolla en el ecosistema de la ciudad de Ica, se le pueden atribuir a otros tipos de metabolitos secundarios. Las enfermedades humanas como trastornos neurodegenerativos, inflamación, infección viral, patologías autoinmunes y trastornos del sistema digestivo tales como inflamación gastrointestinal y úlcera gástrica que están relacionadas al estrés oxidativo de las células. Los mecanismos que inhiben estos efectos de los radicales libres son las sustancias antioxidantes tales como: las vitaminas E, A, C y B₆, carotenos, selenio, magnesio y zinc, así como compuestos vegetales, como polifenoles, taninos solubles y condensados,

flavonoides, fenoles sencillos y naftoquinonas⁶⁸. Entre todas las propiedades biológicas atribuidas a los flavonoides la de mayor interés ha sido su actividad antioxidante. El creciente interés por los posibles efectos beneficiosos de los antioxidantes ha hecho que se desarrollen un gran número de métodos para la determinación de extractos con actividad antioxidante. En un análisis previo se demostró que el extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav. "Lucraco" presentó actividad antioxidante, además se evidenció cualitativamente la presencia de flavonoides que podrían ser responsables de la actividad. Teniendo este análisis, se evaluó la actividad antioxidante de las fracciones (A, B, C, D y E) utilizando el método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH), donde se observó que hay una diferencia significativamente alta entre la fracción D que resultó la más activa y presentando un IC_{50} menor (0,7388 mg/mL) al del extracto etanólico (fracción A) (1,5012 mg/mL) (ver gráfica 01) y de la misma forma se pudo observar que hay una dependencia de la actividad antioxidante con la concentración, pues a medida que se incrementa la concentración, se tiende a incrementar la actividad antioxidante en los métodos ABTS (ver figura 03) y del Poder Reductor (ver figura 04).

En el edema por carragenina, este es un polisacárido sulfatado obtenido del *Chondrus crispus* y comúnmente usado para inducir inflamación aguda, se encuentran involucrados histamina y serotonina en la fase inicial, pero alrededor de las 4 h, la inflamación

está condicionada principalmente por la presencia de proteasas, bradicininas, prostaglandinas E2 y leucotrienos B4; basado en ello podría argumentarse que la supresión de la primera fase puede deberse a inhibición de la liberación de los primeros mediadores como histamina y serotonina y la acción en la segunda fase puede ser explicada por una inhibición de ciclooxigenasa. Esos mediadores desempeñan un rol importante en la respuesta inflamatoria y son capaces de estimular nociceptores y producir dolor; de ahí que los compuestos inhibidores de la síntesis de dichos mediadores o antagonistas de sus receptores resultan eficaces en la inhibición de edema inducido⁵⁶.

*Muchos de los flavonoides y fenoles cooperan en el efecto antiinflamatorio, pues una explicación posible sería la actividad inhibidora de la prostaglandina sintetasa, impidiendo por lo tanto la síntesis de prostaglandinas, componente responsable de la actividad inflamatoria, ante ello, al evaluar la actividad antiinflamatoria y analgésica de la fracción D no presentó actividad, ello es una prueba fehaciente que la actividad antiinflamatoria y analgésica ocurriría por otros mecanismos. Al evaluar la actividad antiinflamatoria causado por el agente carragenina al 3%, el extracto etanólico de las flores de la especie *Waltheria ovata* Cav. evidenció que a la concentración de 500 mg/kg se inhibió significativamente la inflamación y presentando alta actividad antiinflamatoria (55,93%) (ver gráfica 7) y no existiendo una diferencia significativa con el ácido acetilsalicílico*

100 mg/kg (59,46%) (ver gráfica 7). El resultado obtenido en el ensayo de la inflamación subplantar inducido por administración de carragenina al 3%, indica un posible efecto inhibitor de la ciclooxigenasa y/o lipooxigenasa o antagonismo de los receptores de los metabolitos proinflamatorios liberados. Basado en el resultado obtenido se puede decir que el extracto etanólico de las flores de *Waltheria ovata* Cav. posee actividad antiinflamatoria frente a procesos inflamatorios de naturaleza diversa, pudiendo sus metabolitos activos estar actuando en diferentes pasos de la cascada inflamatoria relacionados con la biosíntesis, liberación y/o antagonismo de los mediadores proinflamatorios que se generan, producto del metabolismo del ácido araquidónico.

Se ha postulado que, en dolores relacionados con procesos inflamatorios, las prostaglandinas, citoquinas y aminas simpaticomiméticas mediarían el estímulo nociceptivo a través de receptores peritoneales locales (Nguemfo y col., 2007; Bezerra y col., 2008) ^(70,71). Por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de las flores de la especie *Waltheria ovata* Cav. descrito en la tabla 8, estaría mediado por una acción periférica, que podría reducir la síntesis de prostaglandinas o interferir en el mecanismo de transducción de los nociceptores primarios aferentes, ello se comprobó que a la concentración de 500 mg/kg se inhibió significativamente la respuesta dolorosa, presentando alta actividad analgésica

(174,76%) (ver gráfica 6) y no existiendo una diferencia significativa al Tramadol 100 mg/kg (179,54%) (ver gráfica 6).

*Es necesario realizar más estudios a nivel químico y farmacológico del extracto etanolico de las flores de *Waltheria ovata* Cav. por la buena actividad antioxidante que se demostró y por ser una especie prometedora en diferentes patologías, así mismo, los resultados proporcionan una base científica para el uso de *Waltheria ovata* Cav. “Lucraco” en la medicina tradicional y futuras investigaciones.*

Conclusiones

1. *El extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav. "Lucraco" presenta los siguientes grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, taninos, triterpenoides y/o esteroides, alcaloides, leucoantocianidinas, catequinas, grupos aminos libres y compuestos fenólicos.*
2. *Por el método DPPH resultó que la fracción D de Waltheria ovata Cav. presentó un IC_{50} a una concentración de 0.7388 mg/mL y ante el método ABTS un TEAC de 0,34 mg/mL y un TEAC de 2,94 mg/mL por el método del poder reductor.*
3. *Por el método de edema subplantar en ratones inducido por carragenina presenta actividad antiinflamatoria de 52.27 % a dosis de 500 mg/kg.*
4. *Por el método de Plato Caliente presenta un porcentaje de analgesia de 170.27 % a dosis de 500 mg/Kg.*

Recomendaciones

1. *Realizar estudios de Toxicidad del extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav. "Lucraco"*
2. *Con los resultados obtenidos de la actividad antioxidante, se recomienda hacer fraccionamientos con otros solventes y realizar una caracterización de los compuestos obtenidos.*
3. *Aislar y elucidar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav. "Lucraco" que le confieren la actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria.*
4. *Realizar otros estudios farmacológicos sobre las flores de Waltheria ovata Cav. "Lucraco"*

Fuentes de información

1. Poma E, Requis E, Gordillo G, Fuertes C. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L.(guanábana) de Cuzco. *Ciencia e Investigación*. 2011; 14(2): 298
2. Li E. El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los andes. *Estado del arte del sector de plantas medicinales en Perú*. Ministerio de la Producción. 2008
3. Palacios E. Economía y plantas medicinales. *Boletín CSI*. 2004; 52: 28-31.
4. Vilcapoma G, Zevallos PA. Estudio Etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por la población andina de Canta, Lima, Perú. *J Ethnopharmacol* 2007; 111: 284-94.
5. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 1994; 74(1), 139-62.
6. Carughi A. Gronert K. *Inflamación: Los ácidos grasos omega-3 y su relación salud/enfermedad*. [internet] [citado: 7 de mayo de 2018]. Disponible en: http://www.gnldcontent.com/omega3/sp/pdf/SABinflammatoryArticleFinal_v7_sp.pdf
7. Sánchez V, Méndez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Rev Invest Med Sur Mex*. 2013;20(3):161–8.
8. Bittner A, Castro P, Pérez O, Corbalán R, Troncoso R, Chiong M, et al. *Inflamación y estrés oxidativo en el síndrome coronario agudo: ¿dos fenómenos relacionados?* *Boletín de la Escuela de Medicina*. 2005

9. *Furones JA, Morón F, Pinedo Z, Acción analgésica de un extracto acuoso liofilizado de Aloe vera L. en ratones. Rev Cubana Plant Med. 1996; 1:15-7*
10. *Roserch C., Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú. Koeltz Scientific Boosk Koenigstein. Centro de Medicina 1994– Vol I y II.*
11. *Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. Mutat Res. 2011; 711:193-201.*
12. *Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Panamericana. XI Ed. México (2005)*
13. *Esmaeli MS, Rezaeezadeh RM, Esmaeil K, Abbasnejada M, Rasouliand B, et al. Olivo (Olea europea L). el extracto de hoja provoca actividad antinociceptiva, potencializa analgesia de la morfina y suprime la morfina hiperakgesia en ratas. Diario de Ethnopharmacology 132(1):200-205*
14. *Qnais E, Raad D, Bseiso Y. efectos analgésicos y anti-inflamatorios de un extracto y flavonoides de Artemisia herba-alba y sus mecanismos de acción. Neurofisiología 2014; 46: 238-46*
15. *Gressler, V., Stüker, C., Dias, G., Dalcol, I., Burrow, R., Schmidt, J., et al. Quinolone alkaloids from Waltheria douradinha. Phytochemistry. 2008; 69: 994-999*
16. *Wang, O., Liu, S., Zou, J., Lu, L., Chen, L., Qiu, S., et al. Anticancer Activity of 2a, 3a, 19b, 23b-Tetrahydroxyurs-12-en-28-oic Acid (THA), a*

Novel Triterpenoid Isolated from Sinojackiasarcocarpa. PLoS ONE.
2011

17. Pietta, P., Simonetti, P. and Mauri, P. *Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants. Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1998; 46, 4487-4490
18. Agarwal, Ch., Singh, R.P., Agarwal R. *Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release. Carcinogenesis.* 2002;23(11):1869–1876.
19. León F, Cabieses F. *Efecto Antiinflamatorio de la Uncaria tomentosa "uña de gato". Odontología Sanmarquina.* 2000; 1(6): 66-68
20. Zongo, F., Ribuot, C. Boumendjel, A., Guissou, I. *Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of Waltheria indica L. (syn. Waltheria americana): A review, Journal of Ethnopharmacology.* 2013;148 (1):14-26.
21. Eduardo G, Samuel R *Ensayo toxicológico del extracto acuoso de Whalteria douradinha, modelo en vivo, p. 264-272, 2014*
22. Herrera O. *Efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto etanólico de la raíz de Waltheria ovata Cav. "lucraço" en línea celular de cáncer de próstata DU-145. [tesis]. Ica: universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2014.*
23. Basaga H. *Biochemical aspects of free radicals. Biochem Cell Biol,* 1990;68:989-98

24. Camacho L, Mendoza J. La naturaleza efímera de los radicales libres. *Química y Bioquímica de los radicales libres. Los antioxidantes y enfermedades crónicas degenerativas. Vol 1. Pacheco Hidalgo, Mexico: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2009;27-76.*
25. Sanz N, Diez C, Alvarez A, Cascales M, Age dependt modifications in rat hepatocyte antiox defense system. *J Hepatol. 1997;27:525-34.*
26. Cascales M. Mecanismos de defensa hepatocelular I: Mecanismos de hepatotoxicidad. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid, 2001;99:123.
27. Pal Y, Byung Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews. 1994; 74(1):139-62.*
28. Mills G. Hemoglobin catabolism I glutathione peroxidase an erythrocyte enzima which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *I Biol Chem. 1957; 229:189-97*
29. Mari M, Morales A, Colell A, Garcia C, Fernandez J. Mitochondrial glutathione a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal. 2009; 11:2685-700.*
30. Céspedes T, Sánchez D. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Rev. Cubana Cardiología. 2000;14(1):55-60.*
31. Benitez D. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed. 2006;25(2).*
32. Zamora S, Juan D. Antioxidantes: micronutrientes en la lucha por la salud. *Rev Chil Nutr. 2007;34(1).*

33. Hari C, Ramesh A, Krishna G. Hepatoprotective and antioxidant effect of *Ecbolium viride* (Forssk.) Alston roots against paracetamol-induced hepatotoxicity in Albino Wistar rats. *Journal of pharmacy research* .2013;496-501.
34. Martínez -Flores, S, Gonzáles-Gallego, J, Culebras, J, Tuñon, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*. 2002;17(6):271-78
35. Pérez T. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigación Biomédicas*. 2003;22(1):48-57.
36. Sudheesg S, Sanhya C, Sarah K. Antioxidant activity of flavonoids from *Solanum melongena*. *Phytotherapy Research*. 1999;13:393-96.
37. Van A, Tromp M, Griffioen D. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology Medicine*. 1996;20:331-42
38. Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 2008;80(4), 1290–1296.
39. Frankel E, Meyer A. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000;80:1925-41.
40. Mukhopadhyay S, Lutharia D, Robbins R. Optimization of extraction process for phenolic acids from cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006;86:156-162.

41. Prior R, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(10);4290-302.
42. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002; 13, 572–584.
43. Re R, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 1999;26:1231-37
44. Einbond R, Reynertson K, Luo X, Basile M, Kennelly E. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem*. 2004;84:23-28.
45. Cardona Henao, L. E., Mejía, G., & Fernando, L. Evaluation of antioxidant effect of essential oils and extracts of *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* and *Thymus vulgaris*. *Biosalud*. 2009; 8(1), 58–70
46. Bisby R, Ahmed S, Cundall R. Repair of amino acid radicals by a vitamin E analogue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;119:245-51
47. Bayar D. Epigenetic mechanisms in inflammation. *J Dent Res*. 2011; 90(1): 9-17.
48. Crotan R, Kumar V, Robbins S. *Patología estructural y funcional. Volumen I. 4ª edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. Madrid.* 1999;39-67
49. Lansky E, Newman R. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 109: 177-206.

50. Bórdes R. *El proceso inflamatorio. Rev Enfermería.* 1994;4(4):9-12.
51. Regal M, Borges A, Armas J, Alvarado M, Cedeño V, Cuesta J. *Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. Rev Finlay.*2015;5(1):47-62.
52. Fallis A. *Inflammation. Journal of Chemical Information and Modeling.* 2013;53(9):1689-99
53. Blanco F, Cañete J, Pablos J. *Técnicas de investigación básica en reumatología. España: Ed. Médica Panamericana.* 2007; 46:156-158
54. García A, López J, Sánchez M. *Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. Medicina intensiva.* 2000; 24(8); 353-360.
55. Núñez F, Montero A, Agüero F. *Efecto Antiinflamatorio Preclínico del Polvo Seco de Caléndula officinalis. Lat. Am. J. Pharm.* 2007; 26 (4): 548-52
56. Rajagoundan R, ThangaveL S, Murugesan J. *Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of Oscillatoria willei in experimental animal models. Journal of Medicinal Plants Research.* 2009; 3(7),533-537
57. Wandji BA, Tatsinkou Bomba FD, Awouafack MD, Nkeng-Efouet PA, Kamanyi A, Nguelefack TB. *efectos antinociceptivos de los extractos acuosos y metanol de las hojas de mannii Pittosporum Gancho. F. (Pittosporaceae) en ratones. J. Ethnopharmacol* 2016; 187: 224-31.
58. Fernandiz M. *Fisiología del dolor. Barcelona: Hospital de la Santa Creu Sant Pau;*2006

59. Carregal A. *Fisiología de la nocicepción y de sus mecanismos reguladores*. España: Universidad de Vigo;2003.
60. Miño J, Gorzalczany S, Moscatelli V. *Actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de Erythrina crista-galli*. Buenos aires.2002;21(2):93-8
61. Kuklinski C. *Farmacognosia*. 1^{ra} Edición. Barcelona: Omega S.A.;2003
62. Lock O. *Investigación Fitoquímica*. Perú: Fondo Editorial PUCP; 1994:7-10
63. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. *Use of free a radical method to evaluate antioxidant activity*. *Lebens mittel wissens chaftund technologie/Food Science and Technology*.1995;28:25-30
64. Hazra, B.,Biswas, S.,Mandal,N. *Antioxidant and free radical scavenging activity of Spondias pinnata* . *BMC Complement. Altern. Med*.2008;8,63.
65. Nidia Rojas., Senovio S., Armando C. *Actividad antimicrobiana de Waltheria indica y Acacia farnesiana*. 2008; 40(2): 3
66. Boza J. *Alimentación y enfermedad*. *Anales de la real academia de ciencias veterinarias de Andalucía Oriental*. 2003; 16(1): 163-97.
- 67.Nguemfo, E.; Dimo, T.; Azebaze, A.; Asongalem, E.; Alaoui, K.; Dongmo, A.; Cherrah, and Kamtchouing, P. *Antiinflammatory and antinociceptive activities of the stem bark extracts from Allanblackia monticola STANER L.C. (Guttiferae)*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 114(3): 417-424.
- 68.Bezerra, M.; Lima, V.; Girao, V.; Teixeira, R. and Graca, J. *Antinociceptive activiy of sildenafil and adrenergic agents in the writhing test in mice*. *Pharmacological Reports*. 2008; 60(3):339-344.

Anexos

Anexo N°1. Matriz de consistencia

Título	Objetivos específicos	Hipótesis	Población y muestra	Evaluación de la actividad	Técnicas de procesamiento de la información
<p><i>Actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica del extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav "Lucraco".</i></p> <p>Problema general</p> <p><i>¿Presenta actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica el extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav "Lucraco"?</i></p> <p>Objetivo general</p> <p><i>Determinar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica del extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav "Lucraco".</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav "Lucraco". • Evaluar la actividad antioxidante fue evaluada por los métodos de: inhibición frente al radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ABTS ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y por el Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP). • Evaluar la actividad antiinflamatoria por el método de edema subplantar en ratones inducido por carragenina. • Evaluar la actividad analgésica por medio del método Placa Caliente. 	<p><i>El extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav "Lucraco" presenta actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica.</i></p> <p>Variables</p> <p>V. dependiente: <i>Actividad antioxidante, antiinflamatoria y analgésica</i></p> <p>V. independiente: <i>Extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav "Lucraco"</i></p> <p>Metodología</p> <p><i>Tipo: Básica</i> <i>Nivel: Aplicativo analítico</i> <i>Diseño de Investigación: Experimental</i></p>	<p>-Material botánico: <i>Flores de Waltheria ovata Cav "Lucraco"</i></p> <p>-Material biológico: <i>Ratones un peso promedio de 25 a 30 g, procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS)</i></p> <p>Técnicas y Procedimientos de Recolección de Datos</p> <p>Evaluación de la actividad antioxidante <i>La actividad antioxidante del extracto etanólico de las flores de Waltheria ovata Cav "Lucraco" será evaluada por tres métodos en función al Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP), Inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) donde se determinará el IC₅₀ y Reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato de amonio) (ABTS).</i></p>	<p>antiinflamatoria por el método subplantar en ratones inducido por carragenina.</p> <p><i>Este método se basa en la administración subplantar de sustancias capaces de desencadenar una respuesta inflamatoria (edema) la cual es medida por diferencia ponderal de las patas</i></p> <p>Evaluación de la actividad analgésica por el método de placa caliente (HOT PLATE)</p> <p><i>El método de Placa caliente mide la latencia de la respuesta de fuga o de autoprotección cuando los ratones son sometidos al estímulo térmico.</i></p>	<p><i>Los datos serán procesados utilizando el paquete estadístico SPSS (stadistical package for social sciences). Se aplicará el Test de Dun's. Se considerará significativamente una p<0.05, con un intervalo de confianza al 95%.</i></p>

Anexo N°2. Imágenes



