

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTOBÁL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale* R.Br. "berro". Ayacucho 2017.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR EL:

Bach. AYVAR AGUILAR, Jorge Didier

Ayacucho-Perú

2018

Este trabajo va dedicado a mis padres y hermano, por ser mis mejores guías durante mi formación profesional y por el apoyo brindado.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater* Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por haberme albergado cinco años en sus aulas y por ser forjador de excelentes profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud y a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, a los excelentes docentes que en ella laboran, quienes contribuyeron en mi formación y haberme brindado las herramientas necesarias para mi desenvolvimiento profesional.

Un reconocimiento especial a mi asesor Dr. Q.F. Edwin Carlos Enciso Roca, por permitirme recurrir a su capacidad y experiencia para que sea posible realizar y culminar esta investigación.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente han contribuido a la materialización del presente trabajo de investigación

INDICE

	Página
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes del estudio	3
2.2. <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro”	5
2.2.1. Clasificación taxonómica de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro”	5
2.2.2. Nombres comunes	5
2.2.3. Descripción botánica	6
2.2.4. Hábitat y distribución	6
2.2.5. Composición química	6
2.2.6. Propiedades farmacológicas	7
2.2.7. Contraindicaciones y precauciones	8
2.3. Compuestos fenólicos	8
2.4. Flavonoides	8
2.4.1. Distribución	8
2.4.2. Estructura química	9
2.4.3. Clasificación	9
2.4.4. Efectos farmacológicos	10
2.4.5. Identificación	10
2.5. Inflamación	10
2.5.1. Inflamación aguda	11
2.5.2. Inflamación crónica	11
2.5.3. Efectos sistémicos de la inflamación	11
2.5.4. Mediadores de la inflamación	11
2.6. Fármacos antiinflamatorios	12
2.6.1. Antiinflamatorios esteroides o glucocorticoides	13
2.6.2. Antiinflamatorios no esteroides (AINES)	13
2.7. Hidrocortisona	13
2.7.1. Mecanismo de acción	14
2.7.2. Indicaciones	14

2.7.3. Efectos secundarios	14
2.8. Método para evaluar la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	14
2.9. Radicales libres y antioxidantes	16
2.9.1. Radicales libres	16
2.9.2. Antioxidantes	19
2.10. Método para evaluar la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Lugar de ejecución	25
3.2. Población y muestra	25
3.2.1. Población	25
3.2.2. Muestra	25
3.2.3. Muestreo	25
3.3. Metodología y recolección de datos	25
3.3.1. Recolección de la muestra	25
3.3.2. Desección de la muestra	25
3.3.3. Molienda	26
3.3.4. Obtención del extracto etanólico	26
3.3.5. Aislamiento de la fracción flavonoica	26
3.3.6. Ensayos químicos	26
3.3.7. Cuantificación de flavonoides totales	28
3.3.8. Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	29
3.3.9. Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	30
3.4. Tipo y diseño de investigación	31
3.4.1. Tipo de investigación	31
3.4.2. Método de investigación	31
3.4.3. Diseño de investigación	31
3.5. Análisis de datos	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	41
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	59

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Clasificación de flavonoides, estructura y parte de sustitución	9
Tabla 2	Acciones de los principales mediadores de la inflamación	12
Tabla 3	Clasificación de los antioxidantes	22
Tabla 4	Clasificación de los antioxidantes según su sitio de acción	22
Tabla 5	Metabolitos secundarios analizados en el extracto etanólico de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro". Laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.	35
Tabla 6	Cuantificación de flavonoides en la fracción de acetato de etilo de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro". Laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.	37

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Núcleo básico de un flavonoide	9
Figura 2. Dianas moleculares de la acción de fármacos antiinflamatorios	15
Figura 3. Secuestro del DPPH (radical libre) por un flavonoide	17
Figura 4. Agentes oxidantes derivados del metabolismo celular	18
Figura 5. Sales de hierro generando radicales oxidantes a partir de peróxidos	19
Figura 6. Mecanismo antirradicalario de las moléculas antioxidantes	20
Figura 7. Curva de calibración obtenida para la Quercetina en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	36
Figura 8. Porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos de los flavonoides aislados del extracto de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro" y el estándar hidrocortisona. Laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	38
Figura 9. Porcentaje de capacidad antioxidante de los flavonoides aislados del extracto de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro" vs el estándar Trolox. Laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	39

INDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Certificado de identificación botánica de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro”. Ayacucho 2018.	61
Anexo 2	Esquema para la obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro”. Ayacucho 2018.	62
Anexo 3	Esquema del fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro”. Ayacucho 2018	63
Anexo 4	Recolección y secado de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” Ayacucho 2018.	64
Anexo 5	Proceso de obtención del extracto etanólico de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacología Ayacucho 2018.	65
Anexo 6	Ensayo de identificación fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.	66
Anexo 7	Proceso de extracción de la fracción flavonoica del extracto etanólico de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	67
Anexo 8	Identificación fitoquímica de flavonoides mediante el ensayo de Shinoda en la fracción de acetato de etilo obtenido de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.	68
Anexo 9	Proceso de sembrado y desarrollo de cromatografía en capa fina para la identificación de fenoles en las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	69
Anexo 10	Dilución del estándar Quercetina para la elaboración de la curva de calibración en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	70
Anexo 11	Flujograma del procedimiento para la determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.	71

Anexo 12	Preparación de la suspensión de glóbulos rojos al 10% v/v en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	72
Anexo 13	Preparación y lectura de absorbancias de la mezcla de reacción (muestra, control y estándar) en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.	73
Anexo 14	Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo DPPH del extracto de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.	74
Anexo 15	Curva de calibración obtenida para el estándar Trolox en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.	75
Anexo 16	Preparación de la solución patrón y solución de trabajo para la determinación de la actividad antioxidante en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	76
Anexo 17	Dilución del radical libre DPPH para la elaboración de la curva de calibración del Trolox en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	77
Anexo 18	Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH de la fracción de acetato de etilo en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	78
Anexo 19	Absorbancias y porcentajes de protección de la membrana de glóbulos rojos de la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	79
Anexo 20	Absorbancias y porcentajes de la actividad antioxidante de la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro”. Ayacucho 2018	80
Anexo 21	Análisis de varianza del porcentaje de protección de membrana de los glóbulos rojos para la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro”. Ayacucho 2018	81
Anexo 22	Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey del porcentaje de protección de membrana de los glóbulos rojos para la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de	82

	<i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” y el estándar hidrocortisona. Ayacucho 2018	
Anexo 23	Análisis de varianza de la capacidad antioxidante (%) para la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro”. Ayacucho 2018	83
Anexo 24	Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey de la capacidad antioxidante (%) para la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” y el estándar Trolox. Ayacucho 2018	84
Anexo 25	Diagrama de flujo del espectrofotómetro ultravioleta (UV)	85
Anexo 26	Flujograma de equipos para la determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i> de la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018	86
Anexo 27	Matriz de consistencia. Ayacucho 2018	87

RESUMEN

Las hojas de *Nasturtium officinale* tienen notables propiedades nutricionales y medicinales como antioxidante, antiinflamatorio, antihipertensivo, etc. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de la fracción flavonoica aislada de las hojas de berro. El estudio se realizó en los laboratorios de Farmacognosia y Farmacología de la Facultad de Ciencias de la Salud. La planta fue recolectada en la localidad de Huatatas, distrito de San Juan Bautista, provincia de Huamanga. El extracto hidroalcohólico se obtuvo por maceración con etanol al 80% y posterior concentración en baño maría a 45 °C hasta sequedad. Seguidamente se realizó el desengrasado con éter de petróleo y finalmente el aislamiento de la fracción flavonoica con acetato de etilo. La actividad antiinflamatoria se evaluó por el método de estabilización de membrana de glóbulos rojos, y la actividad antioxidante, por el método de captación de radicales libres. Los resultados indican que la estabilización máxima de la membrana fue de 98,9% a la concentración de 1000 µg/mL mientras que la hidrocortisona mostró 97,7% de protección de la membrana a 100 µg/mL. La máxima capacidad antioxidante de la fracción flavonoica aislada fue de 88,4% a 400 µg/mL con una CI_{50} de 106,5 µg/mL. Con respecto al Trolox se obtuvo un porcentaje de capacidad antioxidante máxima de 97,4% a 400 µg/mL y una CI_{50} de 69 µg/mL. Concluyéndose que en las condiciones experimentales se ha demostrado que la fracción flavonoica de *Nasturtium officinale* presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro*.

Palabras clave: *Nasturtium officinale*, fracción flavonoica, actividad antiinflamatoria, actividad antioxidante

I. INTRODUCCIÓN

La gestión de las enfermedades relacionadas con la inflamación y oxidación es un problema real en la comunidad rural; la población en estas áreas utiliza muchos fármacos alternativos, así como también, sustancias producidas a partir de plantas medicinales.¹ La respuesta clásica a la inflamación incluye rubor, tumefacción, calor y dolor.² La producción de radicales libres puede desencadenar una serie de enfermedades que conducen a un desequilibrio en el organismo.³

La región andina posee una variada flora y dentro de ella, muchas especies con reconocida actividad benéfica para la salud, dentro de estas especies se encuentra *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" una planta anual cultivada en una amplia gama de entornos de América del Sur, con variadas propiedades biológicas.^{4,5} Se han encontrado en sus hojas cantidades significativas de componentes bioactivos: aminoácidos, glucósidos, minerales, vitaminas A,C,D y E, compuestos fenólicos, etc.⁶ Los flavonoides son el mayor grupo de compuestos fenólicos presentes en la naturaleza, que se produce en diferentes partes de la planta, tanto en estado libre y como glucósidos.⁷ Las flavonas y flavonoles son los más ampliamente distribuidos de todos los compuestos fenólicos.⁸

La muestra fue sometida a un proceso de extracción hidroalcohólica, desengrasada con éter de petróleo y la extracción de fracción flavonoica se realizó con acetato de etilo.⁹

El estudio para determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* se basa en la estabilización de la membrana lisosomal ya que es importante para limitar la respuesta inflamatoria inhibiendo la liberación de constituyentes lisosómicos de neutrófilos activados, tales como enzimas bactericidas y proteasas, que causan una mayor inflamación y daño en los tejidos al liberarse extracelularmente. La membrana eritrocitaria es análoga a la membrana lisosomal y su estabilización implica que el extracto puede estabilizar también las membranas lisosómicas.¹⁰ La estabilización de la membrana de glóbulos rojos humanos fue tomada como una

medida *in vitro* de la actividad antiinflamatoria de los extractos del berro. Debido a que no se ha realizado un enfoque sistémico para evaluar el potencial antiinflamatorio por el método *in vitro*, se aisló la fracción flavonoica de las hojas y se demostró su actividad antiinflamatoria obteniéndose resultados favorables con una marcada actividad antiinflamatoria dependiente de la concentración y la variedad.

Los radicales libres son especies químicas, atómicas o moleculares, con un electrón desapareado en su orbital más externo.¹¹ Este tipo de configuración electrónica hace que sean muy inestables y altamente reactivos.¹² Como las plantas producen gran cantidad de fracciones químicas que actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo causado por la radiación solar y el oxígeno, pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes.¹³

En este sentido nos enfocamos en el estudio de la actividad antioxidante del extracto a diferentes concentraciones de las hojas de *Nasturtium officinale R. Br.* “berro”, para lo cual se utilizó al DPPH (1,1 difenil-2 picrilhidrazilo) como un radical libre estable, dando como resultados positivos la disminución de la coloración del DPPH, que va de un color violáceo hasta el desvanecimiento de dicha coloración, comparándose con el estándar de Trolox.

Objetivo general.

- Determinar la actividad antiinflamatoria mediante la protección de la membrana de glóbulos rojos y la actividad antioxidante *in vitro* de la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale R. Br.* “berro”.

Objetivos específicos.

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Nasturtium officinale R. Br.* “berro”.
- Cuantificar los flavonoides totales presentes en la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale R. Br.* “berro”.
- Evaluar el porcentaje de protección de la membrana para determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale R. Br.* “berro” a diferentes concentraciones.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale R. Br.* “berro” a diferentes concentraciones.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Russo *et al.*¹⁴ explican que existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL). 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 reconocidas propiedades antioxidantes, la catalasa (CAT) y el superóxido dismutasa (SOD). De esta forma los flavonoides interfieren en las reacciones de propagación de RL y en la formación del radical en sí.

En un estudio realizado por Chippada *et al.*¹⁵ plantearon como objetivo evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro* de *Centella asiática* por el método de estabilización de la membrana de glóbulos rojos, a diferentes concentraciones de los extractos metanólicos y tomando como estándar al diclofenaco. Los resultados mostraron que la estabilización máxima de la membrana fue de 94,97% a una dosis de 2000 µg/mL, mientras que el estándar diclofenaco, obtuvo 98,76% a la misma concentración; por lo tanto, este estudio apoya el aislamiento y el uso de los componentes activos de *Centella asiática* en el tratamiento de inflamaciones.

Leelaprakash y Mohan Dass² realizaron un estudio para determinar el efecto antiinflamatorio *in vitro* del extracto metanólico de *Enicostemma axillare* por el método de estabilización de la membrana de glóbulos rojos, ensayo de desnaturalización de albumina y actividad inhibitoria de la proteinasa. En el estudio usaron como fármacos estándar a la aspirina, diclofenaco sódico e indometacina. Los resultados para los diferentes métodos fueron los siguientes: La hemólisis fue inhibida significativamente ($p < 0,05$) a la concentración de 500 µg/mL con un 75% en comparación al diclofenaco que obtuvo un 51%, el intervalo de concentración de 100-500 µg/ml protege significativamente ($p < 0,01$) la desnaturalización de la proteína inducida por el calor, la concentración de 400 y 500 µg/ml mostró una

inhibición significativa ($p < 0,01$) de 42% y 53% de la acción inhibidora de proteinasa pero a la concentración de 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ no mostró actividad significativa ($p > 0,05$).

Bafna y Mishra¹⁶ analizaron la actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de *Curculigo orchioides* mediante el ensayo del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), barrido de superóxido, barrido de óxido nítrico, determinación del poder reductor y peroxidación lipídica *in vitro*. El extracto de metanol presentó distintos niveles de actividad antioxidante en los modelos analizados. También apoyó la actividad antioxidante al presentar un poder reductor significativo. El estudio demostró la actividad antioxidante *in vitro* del extracto metanólico de *Curculigo orchioides*.

Félix¹⁷ determinó mediante la marcha fitoquímica la presencia de metabolitos secundarios en hojas de *Perezia multiflora* (H. Et B) Less “escorzonera” como compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides y taninos. Se demostró además que, los flavonoides de tipo flavona presentes en la especie, son los responsables de la actividad antiinflamatoria.

Ramírez¹⁸ determinó la actividad antioxidante *in vitro* del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” por el método DPPH. Las concentraciones evaluadas fueron de 50, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$ encontrándose valores de 30,2%; 49,9%; 72,0; 86,4% respectivamente, comparados frente al Trolox, este presentó una capacidad antioxidante de 44,3%; 51,5%; 74,0% y 85,7%. De igual forma, se calculó el CI_{50} para el Trolox 3,4 $\mu\text{g/mL}$ y el CI_{50} para el extracto fue 218,35 $\mu\text{g/mL}$. Concluyéndose que *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” manifiesta actividad antioxidante, que la ubica como una especie nativa muy importante en la línea de los recursos naturales.

Casanova¹⁹ realizó una investigación sobre la actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformes* R.p. Sub sp. *Cuneiformes* “ayapa zapatun”, utilizando el método con DPPH como fuente de radicales libres, los resultados mostraron que el extracto liofilizado de *Calceolaria cuneiformes* presentó una buena actividad antioxidante, con un porcentaje de 86,90% al tratamiento de 125 $\mu\text{g/mL}$.

Fernández *et al.*¹⁰ realizaron un estudio que tuvo como objetivo determinar la actividad antiinflamatoria *in vitro* en glóbulos rojos de ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* “ratania” a concentraciones de 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ de extracto. El resultado mostró mayor eficacia antiinflamatoria al

utilizar ratania en concentración de 50 y 200 µg/mL (35,8% y 35,9% respectivamente) con respecto a la hidrocortisona 400 µg/mL que presentó un 12,4% de protección, concluyéndose que en las condiciones experimentales *Krameria lappacea* “ratania” tiene actividad antiinflamatoria *in vitro*.

Huamani²⁰ realizó una investigación sobre la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de tres variedades de *Allium sativum* L. “ajo”. Se demostró la actividad antioxidante con un porcentaje de captación de 63,13% a 35 µg/mL.

Chiclla⁴ en su tesis titulada Estudio Fitoquímico y Farmacológico de *Roripa nasturtium-aquaticum* (L.) Hayec “berro” determinó mediante la marcha fitoquímica la presencia de metabolitos secundarios como taninos, flavonoides, esteroides, triterpenos, cardenólidos, alcaloides y cumarinas. Efectuó la determinación de la toxicidad aguda en ratones de donde concluyó que por vía intraperitoneal a dosis de 0,24; 0,5 y 1 g/Kg no produjo muerte de ningún animal. De la misma manera, administrado por vía oral a dosis de 2,27; 4,55; 9,09 g/Kg, tampoco presentó toxicidad.

2.2. Nasturtium officinale R. Br. “berro”

2.2.1. Clasificación taxonómica de *Nasturtium officinale* R. Br. “berro”

La determinación botánica se realizó según el sistema de Cronquist A. (1988) a cargo de la Blga. Laura Aucasime Medina de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA

CLASE : MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE : DILLENIIDAE

ORDEN : CAPPARALES

FAMILIA : BRASSICACEAE

GÉNERO : Nasturtium

ESPECIE : *Nasturtium officinale* R. Br.

N.V : “berro”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas (Anexo 1)

2.2.2. Nombres comunes

El berro recibe diferentes nombres comunes que varían de acuerdo a la localidad o el país: berros, curuba, tacso, parcha, curuba de castilla, curuba del indio.²¹

2.2.3. Descripción botánica

El berro pertenece a la familia de las crucíferas, es una hierba perenne rizomatosa con tallos de 10 a 80 cm de largo. Es una planta silvestre que crece en los lugares pantanosos, y de forma abundante en zonas acuáticas como riachuelos con poca profundidad y con muy poca corriente.²¹

Posee un olor característico y un sabor bastante amargo y leve picante, muy apreciado para la preparación de ensaladas de verduras crudas.²¹

2.2.3.1. Hoja

Las hojas más antiguas son compuestas, con cada hoja que consta de 3 a 11 folíolos lisos u ondulados, ovalada o en forma de lanza que crecen de un tallo central. Las medidas de hojas enteras tienen un aproximado de 4 a 12 cm de largo, con el follaje final generalmente mucho más grandes que los otros, y sus hojas jóvenes son simples y no compuestas.^{22,23}

2.2.3.2. Tallo

La planta del berro al final tiene un tallo muy carnoso de aproximadamente entre 10 a 60 cm de largo, pero se rompe fácilmente, y está en posición vertical en los extremos, el cual forma raíces en sus nudos inferiores.²⁴

2.2.3.3. Flores

Las flores del berro son de color blanco y hasta un tono blanco rosado de 4 a 6 milímetros de diámetro, su cáliz se compone de cuatro sépalos, la corola contiene cuatro pétalos, el androceo consta de seis estambres y el gineceo formado por un solo pistilo.²⁴

2.2.3.4. Fruto

El berro muestra delgadas vainas de tipo cilíndricas, con una ligera curvatura, son de 1.3 a 1.8 centímetros de longitud, al final de los pedúnculos miden de 0.8 a 1 centímetros de longitud.²⁵

2.2.4. Hábitat y distribución

Esta planta es originaria de Europa y Asia central. Se considera una de las más antiguas consumidas por los seres humanos. Actualmente, al tratarse de una planta muy apreciada en ensaladas se ha extendido por todo el mundo. Se ha convertido en una especie invasora en la región de los Grandes Lagos, donde fue localizada por primera vez en 1847.²⁵

2.2.5. Composición química

En la composición de sus partes aéreas aparece un glucósido llamado gliconasturcina y además esencia de berro y gran cantidad de vitaminas A, C, D y

E. Según investigaciones, los berros pueden contener de 19 a 88 centigramos de vitamina C en cada Kg de planta fresca.²⁶

Ácidos: ascórbico, aspártico, glutámico (planta).

Aminoácidos: alanina, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, prolina, tirosina, treonina, valina (planta).

Betacaroteno (planta).

Fibra (planta)

Gluconasturina (planta).

Glucósidos: sinigrina, sinalbina, glucotropeolina (aceite esencial 0,066%).

Minerales: calcio, cobre fosforo, hierro, magnesio, manganeso, potasio sodio, yodo zinc (planta) y agua.

2.2.6. Propiedades farmacológicas

El berro posee diversas propiedades preventivas y curativas. Es un alimento rico en vitaminas y minerales como yodo y hierro. Por eso está especialmente indicado contra enfermedades como el escorbuto o para remineralizar el organismo, también posee propiedades depurativas, digestivas, diuréticas. Es útil contra la diabetes y el ácido úrico, también posee un valor desinfectante y antiséptico, especialmente para las vías respiratorias y para contrarrestar el efecto tóxico de la nicotina.²⁶

Sus excelentes virtudes son conocidas vulgarmente con el calificativo “fuente de salud”. Tónico general, estimulante del corazón y del sistema nervioso.²⁶

Utilizado externamente el berro constituye uno de los mejores vulnerarios que existe, capaz de ayudar a curar los posibles problemas que se producen en la piel ayuda a aliviar el enrojecimiento debido al sol y al viento. Esta capacidad le viene otorgada principalmente por la existencia de dos componentes que poseen propiedades antisépticas y curativas o regenerativas de la piel: Zinc y Vitamina C, mientras que el flavonoide rutina le proporciona propiedades bactericidas que ayuda a conservar la vitamina C.²⁶

Ayuda a combatir y controlar la tensión arterial debido a su contenido de potasio, ayuda a controlar la glucemia, es ideal para las dietas, pues aportan tan solo 21 calorías por cada 100 gramos, es diurético y contiene una gran cantidad de fibra. Es un buen protector de hígado, en casos de bilirrubina alta, ayuda a fortalecer las encías y limpia los dientes.²⁴

Ayuda a prevenir el cáncer, esta capacidad se debe a unas sustancias llamadas glucosinolatos que previenen el desarrollo de células cancerosas. Los

glucosinolatos no son exclusivos de los berros, sino que aparecen en otras plantas como las coles, el brócoli, las coles de Bruselas, los nabos, los rábanos y la mostaza, etc.²⁶

2.2.7. Contraindicaciones y precauciones

No lo deben usar en gran cantidad las mujeres en el período del embarazo. Es contraindicado en gastritis y problemas de tiroides. En dosis muy altas pueden producir irritaciones en el estómago y en el riñón. Se debe limpiar cuidadosamente la planta, pues frecuentemente en las hojas existen huevos y larvas de parásitos que pueden provocar infecciones.²⁶

2.3. Compuestos fenólicos

Son un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo, y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinado con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua.²⁷

Las estructuras fenólicas son metabolitos secundarios que pueden proceder de la ruta del ácido shikímico o de la ruta del acetato.²⁷

- Proceden de la ruta del ácido shikímico: fenoles sencillos, ácidos fenólicos (benzoico, cinámicos, etc.), cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianinas y taninos.
- Proceden de la ruta de los acetatos o ruta del ácido mevalónico, los siguientes derivados fenólicos: antraquinonas y heterósidos antracénicos.

2.4. Flavonoides

Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.²⁸ Estos pigmentos naturales presentes en los vegetales protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc.²⁸

2.4.1. Distribución

Están distribuidos ubicuamente entre los vegetales superiores vasculares, Abundan, sobre todo, en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, como las hojas, los frutos y las flores, ya que la luz solar favorece su síntesis. Se encuentran generalmente en mezclas como, agliconas y/o glicósidos, siendo más

comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas.²⁸

2.4.2. Estructura química

Los flavonoides contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico (Fig. 1) y están arreglado bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos, que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Se forman biogenéticamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, y a partir de la cual se derivan las otras clases por posteriores modificaciones que ocurren en varias etapas. Cada una de las clases de flavonoides, suele encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, generalmente en los carbonos 3 y/o 7, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa.²⁷

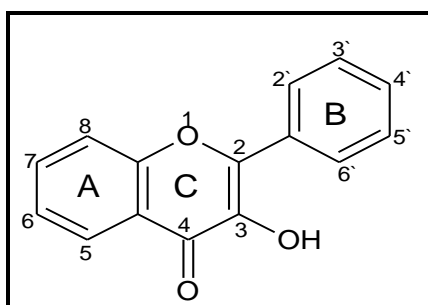


Figura 1. Núcleo básico de un flavonoide.²⁷

2.4.3. Clasificación

Las amplias gamas de flavonoides incluyen: flavanonas, flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianinas, flavanonoles, isoflavonas, chalconas, dihidrochalconas, auronas y neoflavonas.²⁸

Tabla 1. Clasificación de flavonoides, estructura y parte de sustitución.

Clase de flavonoide	Estructura anillo C	Parte de sustitución
Flavanona	Naringina	5,4'-OH;7-O-Neo ^a
	Hesperidina	5,3'-OH;4'-OMe ^a
	Eriodictiol	5,7,3',4'-OH
Flavona	Tangeritina	5,6,7,8,4'-OMe ^a
	Luteolina	5,7,3',4'-OH
	Apigenina	5,7,4'-OH
Flavonol	Kaemferol	5,7,3,4'-OH
	Guercetina	5,7,3,3',4'-OH
	Rutina	5,7,3',4'-OH;3-o-Rut ^a
Isoflavonoides	Genisteina	5,7,4'-OH
	Diadzeina	7,4'-OH
	Orobol	5,7,3',4'-OH
Antocianidinas	Apigenidina	5,7,4'-OH

Auronas	Luteolinidina	5,7,3,4'-OH
	Cianidina	3,5,7,3',4'-OH
	Sulfuretina	
	Leptosidina	

Neo^a: neohesperidosa; Me^a: metilo; Rut^a: rutinosa

Fuente: Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica.1994.²⁹

2.4.4. Efectos farmacológicos

Los flavonoides actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianas, fotorreceptores, atractores visuales, repelentes de alimentación, y para la detección de la luz. Muchos estudios han sugerido que los flavonoides presentan actividades biológicas, incluyendo antialérgico, antiviral, antiinflamatorio (por inhibición de la COX), y las acciones vasodilatadoras.²⁸

Son compuestos polifenólicos de importancia farmacológica por exhibir actividad antioxidante, antialérgica, antitumoral, antimicrobiana y hormonal.²³ Se reportó la actividad inhibitoria de TNF- α en macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS, otro estudio demostró que los flavonoides también tienen propiedades de inhibir la producción de NO y la expresión de iNOS.²⁸

Presentan una rápida absorción y pueden sufrir oxidación y reacciones de reducción, así como la metilación, la glucuronidación y sulfatación, y tienen excreción biliar.²⁷

2.4.5. Identificación

La reacción más usual para la identificación de flavonoides en un extracto de planta es la reacción de Shinoda. Al extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo se coloca un pequeño trozo de magnesio y unas gotas de HCl concentrado, el desarrollo inmediato de coloración es un indicativo de presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo-rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.²⁹

2.5. Inflamación

Se trata de una respuesta fundamentalmente protectora, diseñada para librar al organismo de la causa inicial de la lesión inicial (microbios, toxinas) y también de las consecuencias de estas lesiones (células y tejidos necróticos). Esto se logra mediante la dilución, destrucción o la neutralización de agentes perjudiciales.³⁰

Sin inflamación, las infecciones no serían controladas, las heridas nunca se cicatrizarían y los tejidos lesionados serían una fuente de lesión permanente. En la práctica de la medicina, la importancia de la inflamación radica en que en ocasiones se activa de forma inadecuada o se controla mal y es la causa de las

lesiones tisulares en muchos procesos.³¹ Las reacciones inflamatorias son la base de enfermedades crónicas frecuentes, como la artritis reumatoide, la aterosclerosis o la fibrosis pulmonar, y también de las reacciones de hipersensibilidad que ponen en riesgo la vida frente a las picaduras de insectos, los fármacos y las toxinas. Por este motivo, nuestras farmacias son ricas en antiinflamatorios, que deberían controlar las secuelas perniciosas de la inflamación, si es posible sin interferir con sus efectos beneficiosos.³⁰

2.5.1. Inflamación aguda

La inflamación aguda es una respuesta rápida (minutos) que sirve para hacer llegar leucocitos y proteínas plasmáticas, como los anticuerpos, al foco de infección o lesión tisular. La inflamación aguda está constituida por tres componentes esenciales: 1) alteraciones del calibre vascular que aumentan el flujo de sangre; 2) cambios estructurales de los microvasos que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos, y 3) emigración de los leucocitos de la microcirculación, acumulación de los mismos en el foco de lesión y activación para eliminar el agente.³¹

2.5.2. Inflamación crónica

A diferencia de una inflamación aguda, que suele ser autolimitada y de corta duración, la inflamación crónica se autoperpetua y puede durar semanas, meses e incluso años. Se caracteriza por infiltración de células mononucleares (macrófagos) y linfocitos en lugar del aflujo de neutrófilos que suele observarse en la inflamación aguda. También implica proliferación de fibroblastos en lugar de exudados y formación de cicatrices.³²

2.5.3. Efectos sistémicos de la inflamación

En condiciones óptimas la respuesta inflamatoria permanece confinada en un área localizada. Sin embargo, cuando los mediadores inflamatorios son liberados en la circulación la lesión local puede producir manifestaciones sistémicas importantes tales como: alteraciones del recuento de glóbulos blancos (leucocitosis o leucopenia), fiebre, elevación de proteínas plasmáticas sintetizadas en el hígado (PCR), alteración del fibrinógeno y la proteína amiloide A sérica (SAA), trombocitosis, aumento del pulso y presión arterial, sepsis y shock séptico.^{1, 3}

2.5.4. Mediadores de la inflamación

Se han descrito muchos mediadores que pertenecen a diferentes clases químicas tales como aminas biógenas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citoquinas, anticuerpos, quininas, etc.), especies reactivas

de oxígeno y lípidos (factores activadores de plaquetas, prostanoïdes, leucotrienos) y todavía no se comprende por completo cómo funcionan de forma coordinada.³³ La tabla 4 resume las principales fuentes de los mediadores esenciales y su implicación en la reacción inflamatoria.³

Tabla 2. Acciones de los principales mediadores de la inflamación

Mediador	Fuentes principales	Acciones
Derivados de las células		
Histamina	Mastocitos, basófilos, plaquetas	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación endotelial
Serotonina	Plaquetas	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular
Prostaglandinas	Mastocitos, leucocitos	Vasodilatación, dolor, fiebre
Leucotrienos	Mastocitos, leucocitos	Aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis, adherencia y activación de los leucocitos
Factor activador de plaquetas	Leucocitos, Mastocitos	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, adherencia leucocitaria, quimiotaxis, desgranulación, explosión oxidativa
Especies reactivas del oxígeno	Leucocitos	Destrucción de los microbios, lesión tisular
Óxido nítrico	Endotelio, macrófagos	Relajación del músculo liso vascular, destrucción de los microbios
Citocinas (TNF, IL1)	Macrófagos, células endoteliales, Mastocitos	Activación endotelial local (expresión de moléculas de adherencia), fiebre/dolor/anorexia/hipotensión, reducción de la resistencia vascular (shock)
Quimiocinas	Leucocitos, macrófagos activados	Quimiotaxis, activación de los leucocitos
Derivados de las proteínas plasmáticas		
Productos del completo (C5a, C3a, C4a)	Plasma (producido en el hígado)	Quimiotaxis y activación de los leucocitos, vasodilatación (estimulación de los mastocitos)
Cininas	Plasma (producido en el hígado)	Aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, vasodilatación, dolor
Proteasas activas durante la coagulación	Plasma (producido en el hígado)	Activación endotelial, reclutamiento de leucocitos

Fuente: Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 2010.³

2.6. Fármacos antiinflamatorios

El tratamiento de los pacientes con inflamación incluye: El alivio del dolor, disminución o suspensión del proceso lesivo tisular.³³

Existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

- Fármacos antiinflamatorios esteroides o corticosteroides (hormonas glucocorticoides suprarrenales), cuyo prototipo es la hidrocortisona.
- Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), cuyo prototipo es la aspirina.

2.6.1. Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides

Son sustancias semisintéticas análogas estructurales de los corticoides (hormonas producidas en la corteza suprarrenal).³¹

Su principal acción antiinflamatoria consiste en inhibir la liberación del ácido araquidónico en las membranas celulares disminuyendo la producción de leucotrienos y prostaglandinas. La acción considerada más importante es la inhibición de la producción de citocinas.³¹

La mayor parte de los efectos conocidos de los glucocorticoides tiene la mediación de sus receptores, distribuidos de forma amplia. Estas proteínas son miembros de la superfamilia de receptores nucleares al cual se unen y producen cambios en el proceso de transcripción. Estos cambios tienen acciones amplias sobre la regulación de factores de crecimiento, citocinas proinflamatorias como interleukina (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) y factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófágicas (GM-CSF) y en un alto grado median los efectos inmunomoduladores e inmunodepresores de los glucocorticoides.³³ En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona, entre otros.³³

2.6.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Actúan inhibiendo la síntesis de eicosanoides que se producen por las acciones de dos ciclooxigenasas, la COX-1 que se expresa de forma constitutiva y la COX-2, inducible. Las prostaglandinas se dividen en series según sus características estructurales, las más importantes para la inflamación son PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂ (prostaciclina) y TxA₂ (tromboxano), cada uno de los cuales se genera mediante la acción de una enzima específica en un producto intermedio de la vía.³¹ Estos fármacos también ejercen efectos antipiréticos y analgésicos.³³

2.7. Hidrocortisona

La hidrocortisona es una hormona esteroide secretada por la corteza adrenal. Comercialmente, está disponible como la hormona nativa y como acetato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, fosfato sódico de hidrocortisona,

butirato de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, y succinato de hidrocortisona.³⁴

2.7.1. Mecanismo de acción

Los corticosteroides se clasifican en dos categorías, mineralocorticoides y glucocorticoides, en función de su actividad farmacológica primaria.³³

Los mineralocorticoides alteran el equilibrio de líquidos y electrolitos, facilitando la reabsorción de sodio y de hidrógeno y la excreción de potasio a nivel del túbulo renal distal. Los glucocorticoides ejercen algunos efectos mineralocorticoides pero también están implicados en cierto número de otras vías metabólicas, incluyendo la gluconeogénesis, redistribución de la grasa, metabolismo de las proteínas, y el equilibrio del calcio. La hidrocortisona posee ambas acciones mineralocorticoides y glucocorticoides. Las acciones antiinflamatorias de los corticoides se deben a sus efectos sobre las proteínas inhibidoras de la fosfolipasa A2.³⁴

2.7.2. Indicaciones

Enfermedades alérgicas severas o incapacitantes, que no responden a tratamientos convencionales, incluyendo como coadyuvante en reacciones anafilácticas y anafilactoides, angioedema y edema laríngeo. Enfermedades inflamatorias, severas dérmicas, intestinales, oftálmicas, respiratoria. Trastornos de la función adrenocortical. Coadyuvante de la terapia antineoplásica; hipercalcemia. edema del SNC por tumor. Otras enfermedades como Shock, neurotrauma, síndrome nefrótico, tiroiditis no supurativa, rechazo a trasplantes, triquinosis.³⁵

2.7.3. Efectos secundarios

El riesgo en la aparición de efectos indeseables aumenta con la dosis y duración del tratamiento. Frecuentes: aumento del apetito, indigestión, insomnio, pancreatitis, acné y otros problemas cutáneos, retención de sodio y líquidos, hipocalcemia, osteoporosis. Poco frecuente: diabetes mellitus, cataratas, disminución del crecimiento en niños y adolescentes.³⁵

2.8. Método para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro*

En la presente investigación se trabajó con el método de protección de la membrana de glóbulos rojos.

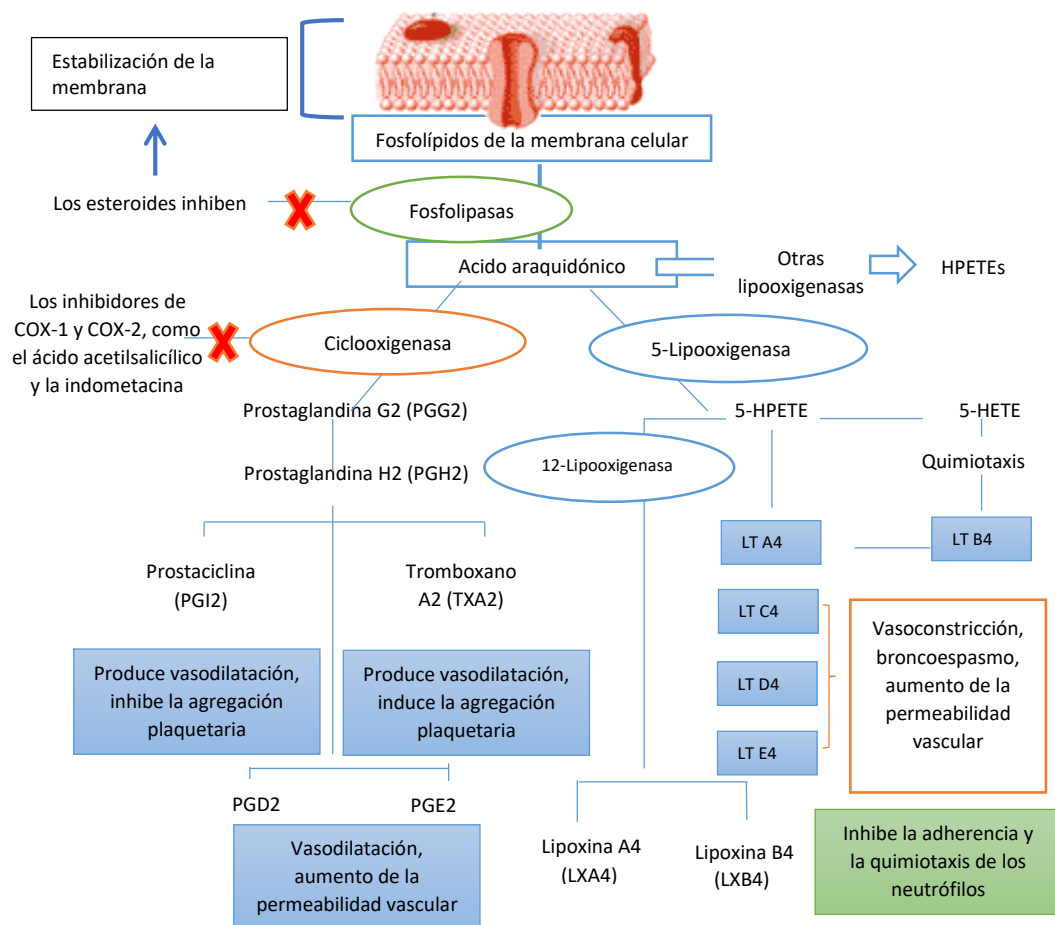


Figura 2. Dianas moleculares de la acción de fármacos antiinflamatorios.³¹

Se fundamenta en la estabilización de la membrana de los glóbulos rojos por un efecto protector de dicha membrana.¹⁰

Los fármacos antiinflamatorios estabilizan la membrana de los lisosomas, partículas intracelulares que contienen proteasas y enzimas hidrolíticas, las que forman los mediadores químicos de la inflamación, de manera que así pueda evitar la desintegración de dichos lisosomas que se producen en los procesos inflamatorios y son responsables del daño y otros fenómenos inflamatorios, que así son impedidos.³⁴

La membrana de los eritrocitos es análoga a la membrana lisosomal y su estabilización implica que un extracto puede además estabilizar la membrana lisosomal. La estabilización de la membrana lisosomal es importante para limitar la respuesta inflamatoria mediante la prevención de la liberación de constituyente lisosomal de neutrófilos activados, enzimas bactericidas y proteasas lo que causa aún más inflamación y daño de los tejidos. Por lo tanto, la estabilización de la membrana celular de glóbulos rojos humanos por hipotonicidad induciendo la lisis

de membrana puede considerarse como una medida in vitro de la actividad antiinflamatoria de compuestos orgánicos.^{2, 14}

Las enzimas lisosómicas liberadas durante la inflamación producen una variedad de trastornos que conducen a la lesión del tejido, dañando las macromoléculas y ocasionando la peroxidación lipídica de membranas que se supone que son responsables de ciertas condiciones patológicas como ataques cardíacos, choques sépticos y artritis reumatoide etc. De estas enzimas se dice que está relacionada con la inflamación aguda o crónica.³⁵

La estabilización de la membrana de glóbulos rojos humanos al inducir lisis por hipotonicidad se tomó como una medida in vitro de la actividad antiinflamatoria del extracto de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro".

2.9. Radicales libres y antioxidantes

2.9.1. Radicales libres

Los radicales libres son moléculas que poseen un número impar de electrones, o sea que poseen un electrón desapareado, lo que las hace muy inestables. En los sistemas vivos tienden a reaccionar rápidamente con diversas macromoléculas como ácidos nucleicos, cadenas de aminoácidos y los dobles enlaces en ácidos grasos poliinsaturados, provocando modificaciones estructurales y funcionales; entre éstas últimas sobresale la peroxidación lipídica, en la que los lípidos insaturados de membrana son oxidados a través de una reacción en cadena iniciada por un radical libre, durante este proceso las funciones de la membrana son afectadas y provocándose con ello la muerte celular.³⁶

Los organismos aeróbicos generan normalmente radicales libres de oxígeno como parte de su metabolismo. Estas especies activas (anión superóxido O_2^- , peróxido de hidrógeno H_2O_2 , radical hidroxilo $OH\cdot$) se originan en transferencias univalentes de electrones, durante la reducción del oxígeno a agua. Estas transferencias pueden darse como subproductos de procesos metabólicos como la respiración Celular.^{36,37}

2.9.1.1. DPPH (1,1-difenil-2-picrihidraizil)

Viene a ser el 1,1-difenil-2-picrihidraizil; radical libre y estable, es un indicador para medir la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidante. La solución del reactivo DPPH es de color violeta y presenta una absorbancia a 517 nm. Su mecanismo de reacción consiste en la sustracción de un átomo de hidrógeno de un donador (ej. un compuesto fenólico puro o extracto) para generar el compuesto difenilpicrilhidrazina desarrollando un cambio de color

violeta a amarillo a medida que disminuye la concentración del radical libre; el que se lee en el espectrofotómetro después de veinte a treinta minutos de reacción, y una especie radical (ej. radical fenoxil). La reacción entre la sustancia a evaluar y el DPPH se observa en la siguiente figura.³⁷

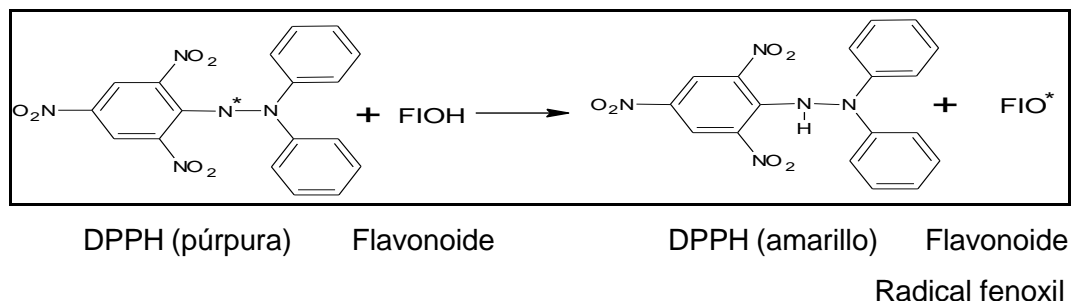


Figura 3. Secuestro del DPPH (radical libre) por un flavonoide (secuestrador de radical libre).³⁷

2.9.1.2. Radicales libres en el ser humano

El hombre fabrica radicales libres como: OH[•], O₂^{•-} y el NO. El anión superóxido se genera en las células fagocíticas como: monocitos, neutrófilos, eosinófilos, para incrementar su función bactericida. Existen enfermedades como la gastritis o la inflamación intestinal en las que hay una activación fagocítica excesiva, lo cual provoca lesiones en los tejidos y la formación de radicales de oxígeno.³⁷ El óxido nítrico cumple muchas funciones fisiológicas como, desencadenar la actividad citotóxica de los fagocitos y juega un papel fundamental en la lisis de las células tumorales, pero una cantidad elevada de NO está relacionada con enfermedades como la inflamación crónica, accidente cerebro vascular y choque séptico.³⁸

El radical hidroxilo, es una molécula muy tóxica para el organismo, y su generación parece ser accidental, probablemente por una reacción inicial en el O₂ y el NO, o derivado de reacciones promovidas por iones metálicos de transición como el Fe⁺⁺² y Cu⁺.³⁸

2.9.1.3. Principales fuentes de radicales libres

Nuestro organismo está expuesto a una gran variedad de EROS y ERNS que pueden generarse a partir de fuentes endógenas, relacionadas con el metabolismo del oxígeno y con las diversas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunitario, o de fuentes exógenas, como el tabaco, la contaminación del aire, la radiación UV, el ozono y ciertos medicamentos. Aunque la exposición a los EROS procedentes de fuentes exógenas sea extremadamente elevada, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante y extensa, debido a

que es un proceso que se da forma continua en las células de nuestro organismo a lo largo de la vida.³⁹

2.9.1.3.1. Fuentes endógenas de radicales libres^{36,37}

Podemos distinguir cuatro fuentes endógenas que originan la mayoría de los agentes oxidantes producidos por las células:

- En el transcurso normal de la respiración aeróbica, las mitocondrias consumen O_2 reduciéndolo en varias etapas a H_2O . Inevitablemente, a lo largo de este proceso aparecen subproductos como el O_2^- , H_2O_2 y OH^\cdot .

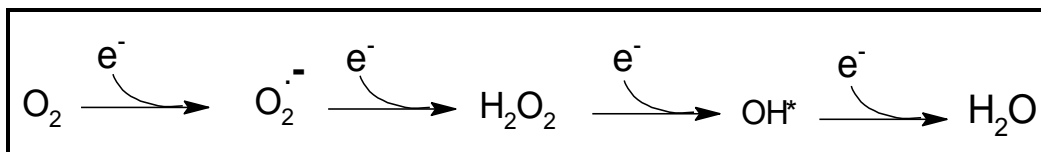


Figura 4. Agentes oxidantes derivados del metabolismo celular.³⁶

- Las células fagocíticas (leucocitos, neutrófilos, macrófagos y eosinófilos) al activarse por medio de mediadores proinflamatorios o de productos bacterianos, víricos o de parásitos, destruyen las células infectadas por medio de un ataque oxidativo (literalmente una “explosión” oxidativa) en el que se producen grandes cantidades de O_2^- , H_2O_2 y OH^\cdot . Las infecciones crónicas llevan a una actividad fagocítica continua que provoca una inflamación crónica que es el principal factor de riesgo del cáncer.
- Los peroxisomas, orgánulos encargados de la degradación de ácidos grasos y otras moléculas produce, H_2O_2 como subproducto, que es degradado de forma natural por la enzima catalasa. Bajo ciertas condiciones, algunos de los peróxidos escapan la degradación y se libera a otros compartimentos celulares provocando un incremento del daño por oxidación en el ADN.
- Las enzimas del complejo Citocromo P450, son las principales responsables del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. La inducción de estas enzimas previene los efectos de toxicidad aguda de agentes extraños al organismo, pero también produce subproductos oxidantes que pueden dañar el ADN.

2.9.1.3.2. Fuentes exógenas de radicales libres^{36,37}

Entre las principales fuentes exógenas de radicales libres destacan:

- Los óxidos de nitrógeno del humo de tabaco.
- Las sales de hierro y cobre que promueven la generación de radicales oxidantes a partir de peróxidos.



Figura 5. Sales de hierro generando radicales oxidantes a partir de peróxidos.³⁶

- Los alimentos que ingerimos a través de la dieta, especialmente los de origen vegetal, que se oxidan en mayor o menor grado generando diferentes tipos de oxidantes como peróxidos, aldehídos, ácidos grasos oxidados y metales de transición.

2.9.1.4. Enfermedades producidas por radicales libres

Los radicales libres son útiles contra bacterias y virus; pero siguen actuando después de haber cumplido con sus funciones en el metabolismo natural y en la lucha contra las infecciones. Cuando hay un desequilibrio entre la generación de radicales libres y de sustancias protectoras contra éstos, los daños de oxidación llevan a envejecimiento prematuro, cataratas, carcinogénesis y aterosclerosis; a su vez ésta provoca hipertensión, angina, isquemia y accidentes cerebro vasculares.³⁹

2.9.2. Antioxidantes

Es definido como una sustancia que, presente a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato, retrasa o previene la oxidación de dicho sustrato.³⁷

Los antioxidantes pertenecen a dos clases: preventivos, que reducen la velocidad de la cadena, y los interruptores de la cadena, que interfieren con su propagación. Entre los preventivos encontramos a las catalasas y peroxidasas; y los interruptores son a menudo fenoles o aminas aromáticas (vitaminas C, E y betacarotenos).³⁸ Los preventivos se encuentran en el organismo de los seres vivos, por ejemplo, el superóxido dismutasa, que cataliza la disminución del anión superóxido, originando peróxido de hidrógeno; la catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua; y también tenemos el glutatión peroxidasa que participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno como dador de electrones utiliza el glutatión reducido. Los interruptores están presentes en la dieta ingerida sobre todo en las frutas y verduras.³⁸

Existen antioxidantes naturales (fisiológicas), presentes en nuestro organismo; dentro de un grupo los antioxidantes pueden ser enzimas que aumentan la velocidad de ruptura de los radicales libres, otros que previenen la participación de iones de metales de transición en la generación de radicales libres y los

inactivadores o barredores y de esta manera protegerían de las infecciones, deterioro celular, del envejecimiento prematuro y probablemente del cáncer.³⁷

Los antioxidantes pueden actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción. Para que un antioxidante (AH) tenga actividad antirradicalaria debe cumplir una característica básica que es generar un radical más estable y menos dañino (RH) después de reaccionar con la especie radical (R^\cdot). Esta reacción se basa en una transmisión redox en la que está implicada la donación de un electrón (o un átomo de hidrógeno) a la especie radicalaria (Figura 6). Como resultado de esta transferencia, se formará un radical derivado del antioxidante (A^\cdot) que puede tener carácter inerte, estable o presentar cierta reactividad.³⁷

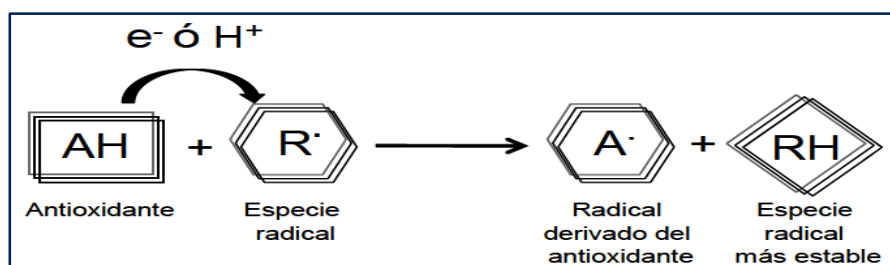


Figura 6. Mecanismo antirradicalario de las moléculas antioxidantes.³⁷

El antioxidante al reaccionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil, con escasos o nulos efectos tóxicos y que en algunos casos como la vitamina E, pueden regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. Tienen diferentes mecanismos de acción; unos impiden la formación de los RL y/o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los RL (sistema barredor) y otros favorecen la reparación y la reconstitución de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación). Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, puede actuar en los diferentes procesos de la secuencia oxidativa y tener más de un mecanismo de acción.³⁷

2.9.2.1. Antioxidantes en alimentos

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes/antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos. Por tanto, es de vital importancia el consumo de alimentos que contengan antioxidantes naturales y de esta manera se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes/antioxidantes o incluso esté a favor de los antioxidantes. Como las plantas producen gran cantidad

de fracciones químicas que actúan como antioxidantes para controlar el estrés oxidativo causado por la radiación solar y el oxígeno, pueden servir de fuente para la obtención de nuevos compuestos antioxidantes.¹⁷ Si tenemos en cuenta que durante la vida se produce un equilibrio entre oxidantes y antioxidantes, y a medida que el individuo envejece dicho balance está a favor de los oxidantes, es de vital importancia un consumo de alimentos ricos en antioxidantes naturales para contrarrestarlos.⁴⁰

2.9.2.2. Sistema de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente – membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas: lípidos, proteínas, ADN, etc. funcionalmente vitales o más importantes. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen.⁴

2.9.2.3. Clasificación de los antioxidantes

Si bien existen diversas formas para clasificar a los antioxidantes, desde una perspectiva de su origen y presencia en el organismo, es posible distinguir entre aquellos antioxidantes que son normalmente biosintetizados por el organismo, y aquellos que ingresan a este a través de la dieta.⁴¹

Los antioxidantes, según su origen, se clasifican en endógenos (enzimáticos y no enzimáticos) y exógenos (vitaminas antioxidantes, carotenoides, polifenoles, compuestos que no caen en las tres categorías anteriores como algunos glucosinolatos, y ciertos compuestos órgano-azufrados).⁴¹

Tabla 3. Clasificación de antioxidantes

Exógenos	Endógenos	Cofactores
Vitamina E	Glutación	Cobre
Vitamina C	Coenzima Q	Zinc
Beta caroteno	Ácido tióctico	Manganeso
Flavonoides	Enzimas:	Hierro
Licopeno	Superóxido dismutasa (SOD)	selenio
	Catalasa	
	Glutación peroxidasa	

Fuente: Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. 1996.¹³

Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes según el sitio de acción

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafarasa		Albúminas
GSH		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Vitamina E
Vitamina C		

Fuente: Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. 1996.¹³

2.9.2.4. Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico)

Es un antioxidante como la vitamina E y análogo de esta. Se utiliza en aplicaciones biológicas o bioquímicas para reducir el estrés oxidativo o daño. La capacidad antioxidante equivalente al trolox (TEAC) es una medida de la fuerza antioxidante basado en Trolox. Debido a las dificultades para medir componentes antioxidantes individuales de una mezcla compleja (como los arándanos o los tomates), Trolox equivalencia se utiliza como referencia para la capacidad antioxidante de una mezcla de este tipo. Equivalencia de Trolox se mide con mayor frecuencia usando el ABTS ensayo de decoloración. El ensayo TEAC se utiliza para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, bebidas y suplementos. El Trolox es universalmente empleado como estándar en (las curvas de comparación de) diversos ensayos de actividad antioxidante (como ORAC, TEAC). En el caso del ensayo ORAC, la actividad antioxidante se expresa como micromoles de Equivalentes Trolox (ET) por unidad de peso o de volumen de la muestra analizada (generalmente, por 100 g de peso fresco o 100 mL).^{37,42}

2.10. Método para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*

El fundamento del método consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres.^{20,43}

Se determinó la actividad antioxidante como la disminución en la absorbancia de DPPH en diez minutos usando Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) como estándar. Los datos se tomaron cada 30 segundos para realizar la cinética.⁴⁴

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacología y Farmacognosia, de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de diciembre de 2017 a abril de 2018.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Nasturtium officinale R. Br. “berro” que crece en los alrededores del río Huatatas, del distrito de San Juan Bautista, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Quinientos gramos de hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. “berro”

3.2.3. Muestreo

El muestreo se realizó por conveniencia teniendo en cuenta el buen estado de las hojas.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Recolección de la muestra

Las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. “berro” fueron recolectadas en las orillas del río Huatatas en el Distrito de San Juan Bautista, Provincia Huamanga del Departamento de Ayacucho, luego las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Farmacología para su secado correspondiente a temperatura ambiente separando aquellas hojas que cambiaron de color o mostraron signos de alteración.

3.3.2. Desecación de la muestra

Las hojas se dejaron secar a temperatura ambiente, previa limpieza de los mismos, bajo sombra previamente acondicionada teniendo como base el papel

Kraft que se cambió constantemente y volteando las hojas para un secado uniforme y evitando el deterioro por la humedad.

3.3.3. Molienda

Las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. “berro” fueron trituradas empleando una licuadora habiendo, previamente, desmenuzado las hojas con las manos con la finalidad de reducir el tamaño.

3.3.4. Obtención del extracto hidroalcohólico

Se pesaron 500 gramos de muestra seca de *Nasturtium officinale* R. Br. “berro”, luego se maceró en un frasco de vidrio color ámbar por 7 días, para ello se utilizó etanol al 80%, hasta cubrir la muestra por 1 cm de diferencia.⁹ Durante el proceso se agitó el frasco durante 15 minutos dos veces al día con la finalidad de que el etanol se distribuya homogéneamente en la muestra. La muestra en maceración se conservó en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar la muestra macerada haciendo uso de embudos de vidrio y papel filtro y finalmente se sometió a baño maría a una temperatura de 45°C para evaporar hasta sequedad.⁹

3.3.5. Aislamiento de la fracción flavonoica

El extracto obtenido anteriormente fue desengrasado con éter de petróleo en una pera de decantación (con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos). Luego se hizo una extracción líquido-líquido con acetato de etilo utilizando un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo el cual fue evaporado a sequedad en baño maría. Finalmente se concentró a sequedad a temperatura ambiente.⁹ La fracción de acetato de etilo obtenida fue utilizada en la determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante.

3.3.6. Ensayos químicos

3.3.6.1. Screening fitoquímico

El extracto seco que se obtuvo se diluyó con agua destilada para realizar las reacciones de coloración y precipitación para identificar los metabolitos secundarios, siguiendo los procedimientos propuestos por Miranda y Cuellar.⁴⁵

Fenoles:

Ensayo de cloruro férrico: en un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto, se agregó gotas de solución de FeCl₃ al 5%, un color verde intenso o azul es positivo.

Catequinas:

Ensayo de catequinas: se tomó 1 gota del extracto, con la ayuda de un capilar y se aplicó sobre el papel de filtro. Sobre la mancha se aplicó una solución de

carbonato de sodio (Na_2CO_3). La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica ensayo positivo.

Aminoácidos libres o compuestos nitrogenados:

Ensayo de ninhidrina: en un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto, se agregó gotas de reactivo al 0,1%, llevar a baño maría y hervir por 3 minutos, si se observa un color azul violáceo es positivo.

Triterpenos y/o esteroides:

Ensayo de Lieberman-Burchart: en un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto y se redisuelve con 1 mL de cloroformo, luego se adiciono 1 mL de anhídrido acético y se mezcla. Por la pared del tubo se dejó resbalar 3 gotas de H_2SO_4 concentrado sin agitar, un color verde intenso o visible oscuro, azul o naranja es positivo.

Saponinas:

Ensayo de espuma: en un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto, se agregó 2 mL de agua destilada, luego se agita fuertemente, la producción de espuma por más de 2 minutos es positivo.

3.3.6.2. Identificación de flavonoides

a. Prueba cualitativa

Ensayo de Shinoda: en un tubo de ensayo se colocó 2 mL de extracto, se agregó unas cuantas grajeas de Mg metálico más gotas de HCl concentrado, un color carmelita o rojo es positivo.

b. Cromatografía en capa fina (CCF)²⁹

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: placa cromatográfica 20 x 20 conteniendo silicagel 254 (Merk)
- Fase móvil: butanol: ácido acético: agua (4:1:5)
- Volumen de inyección: 20 μL
- Revelador: cloruro férrico

La fracción de acetato de etilo se disolvió en 0,5 mL de metanol y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica previamente activada (fase estacionaria). El estándar utilizado fue la quercetina. Se colocó la placa en la cámara y se tuvo cuidado que el solvente butanol: ácido acético: agua (4:1:5) no sobrepasara a la muestra aplicada y se dejó que el líquido ascienda por capilaridad. Posteriormente se retiró la placa cromatográfica habiendo verificado que el solvente haya llegado hasta los 2 cm de la parte

superior de la placa, se dejó secar la placa al aire libre y se reveló con cloruro férrico al 1%.

3.3.7. Cuantificación de flavonoides totales

a. Fundamento

El contenido de flavonoides totales en la fracción flavónica se determinó por el método de Zhishen *et al.*⁴⁴ Se basa en la reacción de los grupos OH⁻ de los flavonoides y el aluminio (Al⁺³) formando un complejo que se mide en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 510 nm.

b. Procedimiento:

Se preparó una solución patrón de 1mg/mL de quercetina en metanol. Se diluyó 10 mL de solución patrón estándar con 50 mL de agua destilada en un matraz. Por lo tanto, la concentración de quercetina de la solución estándar de trabajo fue de 200 µg/mL. Se pipeteó alícuotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mL de la solución patrón de quercetina en la serie de tubos de prueba marcados con S₁, S₂, S₃, S₄, S₅ respectivamente. Seguidamente se toma 500 µL de extracto en una serie de tubos de ensayo, para realizar el análisis por triplicado. Para el blanco se usó un tubo de ensayo marcado con "B" con 1 mL de agua destilada. A los tubos de ensayo se les agregó agua destilada cantidad necesaria para 1 mL. A cada tubo de ensayo (incluido el blanco) se agregó 150 µL de nitrito sódico al 5% (NaNO₂), se agitó bien los tubos de ensayo y se dejó reposar a temperatura ambiente protegido de la luz durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo se agregó 150 µL de cloruro de aluminio al 10% (AlCl₃) a todos los tubos de ensayo, incluido el blanco, se agitó bien y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 6 minutos. Pasando los 6 minutos se agregó 2 mL de hidróxido de sodio al 4% a todos los tubos de ensayo. Seguidamente se adicionó 5 mL de agua destilada a todos los tubos de ensayo. Luego se agitó bien los tubos de ensayo y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 510 nm usando el espectrofotómetro. A partir de los extractos que se obtuvieron de las hojas de "berro", se tomaron 500 µL de muestra para utilizar el mismo procedimiento y condiciones descritas con anterioridad. La muestra fue analizada por triplicado. Las absorbancias obtenidas fueron plasmadas en un gráfico estándar trazando la concentración de quercetina en el eje X y la absorbancia respectiva en el eje Y.

c. Cálculos

Para determinar el valor del contenido de flavonoides totales, se procedió a realizar una regresión lineal con las absorbancias obtenidas, de tal manera que se consiga la siguiente ecuación: $y=mx+b$, para calcular el contenido de flavonoides totales se debe reemplazar el valor correspondiente en el eje "Y" y en el eje "X", y posteriormente se expresa como mg equivalente de quercetina/g de muestra.

3.3.8. Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*

Se determinó mediante el método de protección de la membrana de glóbulos rojos humanos (HRBC).^{10,43}

3.3.8.1. Suspensión de glóbulos rojos

a. Preparación

La sangre se recogió de un voluntario humano sano que no habían tomado ningún AINE durante 2 semanas antes del experimento y fue mezclada con un volumen igual de solución de Alsever[®] (2% de dextrosa, citrato de sodio al 0,8%, ácido cítrico al 0,05% y NaCl al 0,42%) el cual servirá como anticoagulante para conservar la sangre extraída, luego se centrifuga a 3000 rpm por 10 minutos, las células empaquetadas fueron lavadas con solución NaCl 0,9% por tres veces y luego se hizo una suspensión al 10% v/v.^{10,43}

b. Tratamiento de las muestras

Se prepararon varias concentraciones de los extractos (50 µg/mL, 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL y 1000 µg/mL) utilizando solución salina fisiológica.

Se utilizó como fármaco de referencia a la hidrocortisona la cual se preparó a una concentración de 100 µg/mL utilizando solución salina fisiológica. La mezcla de reacción se componía de 2 mL de solución hiposalina (0,25% w/v NaCl), 1 mL de tampón de fosfato 0,15M (pH=7,4), 1 mL de la solución de ensayo (muestra problema), 1 mL de estándar hidrocortisona y 0,5 mL de la suspensión de glóbulos rojos al 10% v/v.

Para el control se utilizó 2 mL de agua destilada en lugar de solución hiposalina (para producir 100% de hemólisis). Las mezclas fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos y luego centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos, el contenido de hemoglobina de la solución sobrenadante se estimó usando un espectrofotómetro UV a 560 nm.⁴³

c. Cálculo del porcentaje de protección de la membrana

El porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos fue calculado usando la fórmula: ⁴³

$$\text{Protección (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \right) \times 100 \right]$$

3.3.9. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

3.3.9.1. Ensayo del DPPH

La determinación de la capacidad antioxidante de los diferentes extractos vegetales se llevó a cabo de acuerdo con el método de Brand – Willians *et al.*⁴⁶ con ligeras modificaciones descrita por Bustamante.⁴⁷ Cada ensayo se realizó por triplicado.

a. Procedimiento

Se preparó en una fiola una solución patrón disolviendo 24 mg de DPPH en 100 mL de metanol, luego se almacenó en refrigeración para su posterior uso. La solución de trabajo se obtuvo al mezclar 10 mL de solución patrón y 45 mL de metanol hasta ajustar su absorbancia de $1,1 \pm 0.02$ leída a 515 nm. Seguidamente se añadió 300 μ L de extracto de *Nasturtium officinale R. Br.* “berro” y 2700 μ L de solución de trabajo en una serie de tubos de ensayo (por triplicado), los cuales reaccionaron durante 30 minutos en la oscuridad, las absorbancias fueron leídas a 515 nm. Previamente, se realizó una curva de calibración utilizando Trolox como patrón de cuantificación para lo cual se procedió a pesar 12,5 mg de Trolox (estándar) y se disolvió en 50 mL de metanol, luego se tomaron alícuotas de 0, 1, 2, 4, 6 y 8 mL y se aforó a 10 mL con metanol, seguidamente se tomaron 300 μ L de estándar preparado y 2700 μ L de solución de trabajo y se incubó por 30 minutos en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 515 nm. El resultado se expresó en mg equivalente de Trolox/g de muestra.

b. Cálculo del porcentaje de actividad antioxidante

El porcentaje de actividad antioxidante fue calculado usando la fórmula: ⁴⁶

$$\% \text{ AA} = 100 - \left[\frac{(A_m - A_b) \times 100}{A_c} \right]$$

Donde:

A_m: Absorbancia de las muestras

A_c: Absorbancia del control DPPH

A_b: Absorbancia del blanco de la muestra.

Una vez determinado el porcentaje de cada una de las concentraciones, se procedió a realizar una regresión lineal con dichos valores, de tal manera se obtuvo la siguiente ecuación: $y=mx+b$; para calcular CI₅₀ se debe reemplazar el

valor correspondiente al 50% de inhibición del DPPH en el eje “Y” y en el eje “X” la concentración del antioxidante necesaria para inhibir en un 50% el DPPH.

Métodos instrumentales para la recolección de datos

Para la recolección de datos se empleó el espectrofotómetro UV el cual, a una longitud de onda de 560 nm, para la actividad antiinflamatoria, y 515 nm, para la actividad antioxidante, registró las absorbancias obtenidas del estándar y de las muestras tratadas, para luego calcular el porcentaje de estabilización de membrana y la capacidad de captación del radical libre DPPH y así determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides aislados.

3.4. Tipo y diseño de investigación

3.4.1. Tipo de investigación

Experimental ⁴⁸

3.4.2. Método de investigación

Hipotético-deductivo

Según Hernández *et al.*⁴⁸ El enfoque cuantitativo se fundamenta en el método hipotético-deductivo, considerando las siguientes premisas:

- Se llevan a cabo la observación y evaluación de fenómenos
- Delineamos teorías y de ellas derivamos hipótesis
- Las hipótesis se someten a prueba utilizando los diseños de investigación apropiados
- Si los resultados corroboran las hipótesis o son consistentes con éstas, se aporta evidencia en su favor. Si se refutan, se descartan en busca de mejores explicaciones e hipótesis.

3.4.3. Diseño de investigación

El diseño incluye dos grupos, uno recibió el tratamiento experimental y el otro no (grupo de control). Cuando concluyó la manipulación, a ambos grupos se les hizo una medición sobre la variable dependiente en estudio. Para el estudio de la actividad antiinflamatoria se utilizaron 5 concentraciones (50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL) para evaluar a qué concentración se obtiene mejor porcentaje de protección de membrana y para el estudio de la actividad antioxidante se usaron concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 µg/mL para evaluar a qué concentración se obtiene mejor porcentaje de actividad antioxidante.

Se realizaron cuatro repeticiones para el primer ensayo (actividad antiinflamatoria) y tres para el segundo ensayo (actividad antioxidante). Se usó como fármaco de referencia o estándar a la hidrocortisona 100 µg/mL y Trolox a 50, 100, 200, 300

y 400 µg/mL. A continuación, se realizaron las comparaciones entre las post pruebas lo cual nos indica si hubo o no efecto de la manipulación. Si ambas difieren significativamente ($O1 \neq O2$) esto nos indica que el tratamiento experimental tuvo un efecto a considerar. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa. Si no hay diferencias, ($O1=O2$) ello indica que no hubo un efecto significativo del tratamiento experimental. En este caso se acepta la hipótesis nula.⁴⁸

3.5. Análisis de datos

Los datos que se obtuvieron de la evaluación de los estudiados fueron procesados en una base de datos con el paquete estadístico SPSS 21. Se determinaron en forma de medias y desviación estándar, y se representaron mediante gráficos en forma de histogramas y barras de error. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) para determinar las diferencias significativas en los diferentes ensayos a un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

IV. RESULTADOS

Tabla 5. Metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro". Laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Wagner	+	Precipitado rojo-vino
	Draguendorff	+	Precipitado naranja
	Mayer	+	Precipitado blanco
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+	Precipitado anaranjado-rojizo
Catequinas	Carbonato de sodio + luz UV	++	Coloración verde carmelita a luz UV
Saponinas	Espuma	+	Formación de espuma
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración azul verdosa
Compuestos nitrogenados	Ninhidrina	+++	Coloración lila
Flavonoides	Shinoda	+++	Precipitado rojo ladrillo

LEYENDA:

- (+++) : Abundante/Intenso
- (++) : Moderado
- (+) : Escaso/Tenue

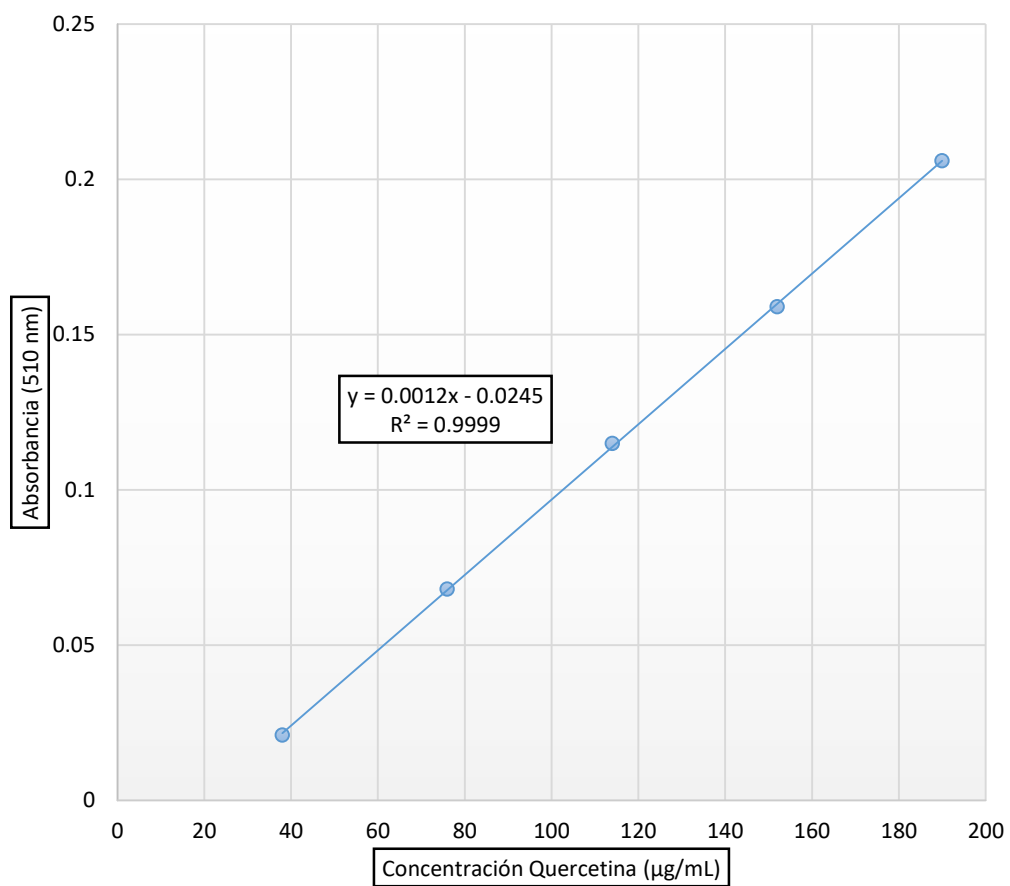
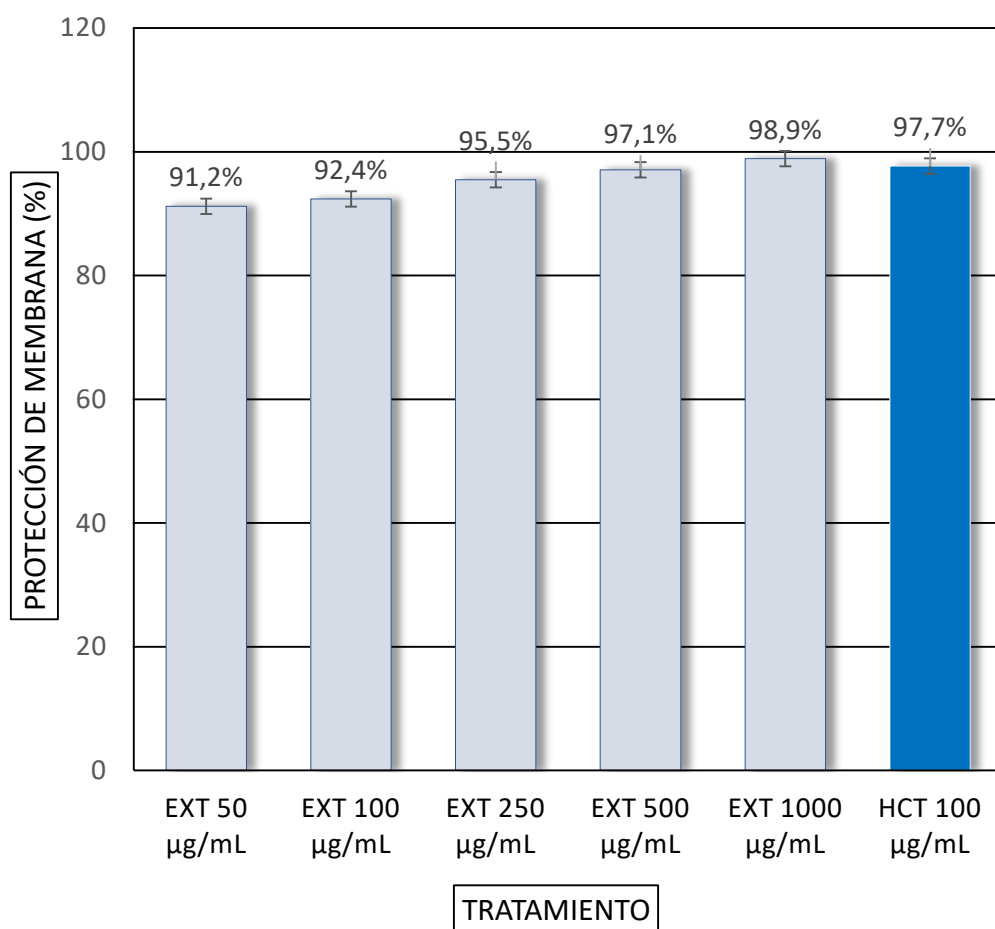


Figura 7. Curva de calibración obtenida para la Quercetina en el laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.

Tabla 6. Cuantificación de flavonoides en la fracción de acetato de etilo de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro". Laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.

Absorbancia promedio patrón quercetina (510 nm)	Absorbancia promedio de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro" (510 nm)	Flavonoides Totales (mg EQ/100 g de muestra)
0,114	0,126	126,7

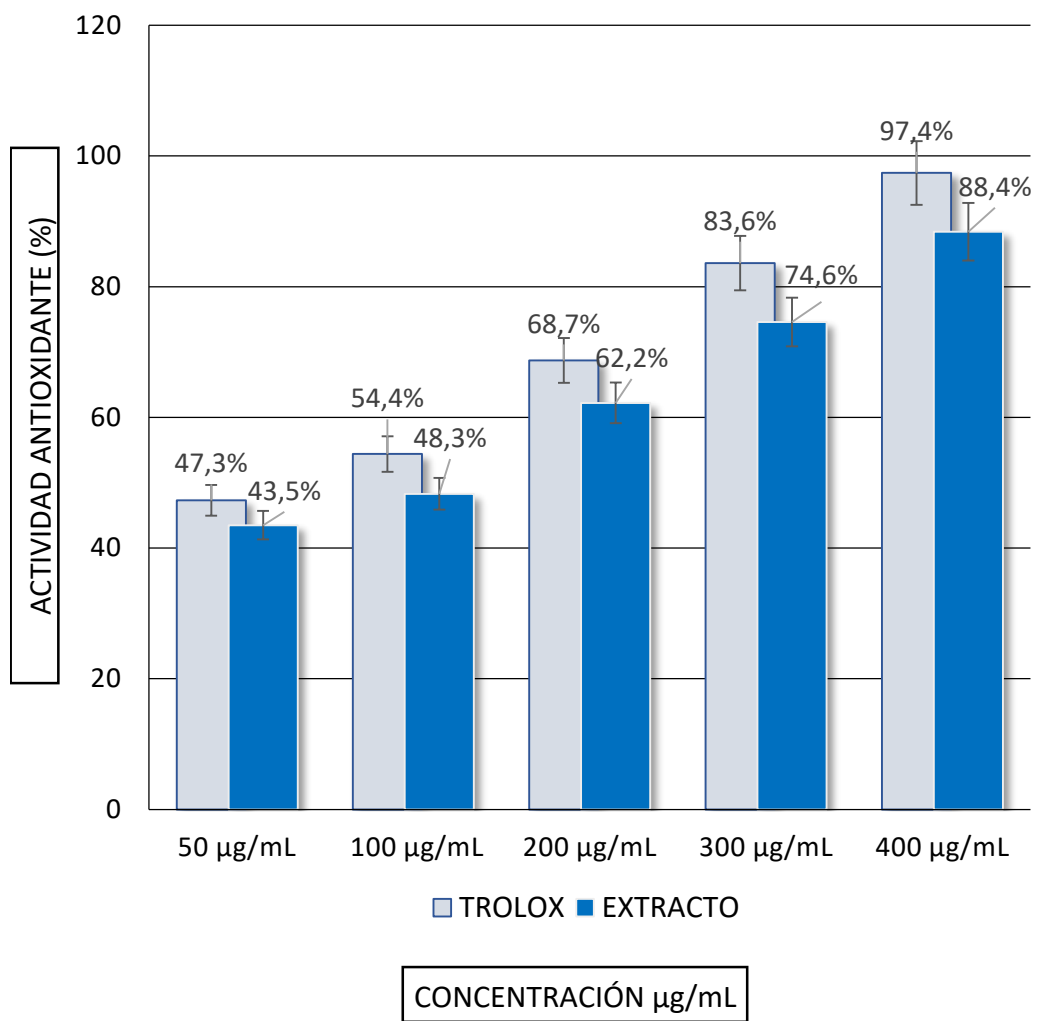


ANOVA: $p=,000$

EXT: Extracto

HCT: Hidrocortisona

Figura 8. Porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos de los flavonoides aislados del extracto de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" y el estándar hidrocortisona. Laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



ANOVA: $p=,000$

Figura 9. Porcentaje de actividad antioxidante de los flavonoides aislados del extracto de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" vs el estándar Trolox. Laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.

V. DISCUSIÓN

El uso de las plantas con fines medicinales es una práctica que se viene realizando desde hace mucho tiempo, en la actualidad se profundiza el conocimiento de estas especies vegetales que poseen propiedades medicinales, y se amplía su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen. Es así que el uso medicinal de las plantas nunca ha dejado de tener vigencia, muchas especies vegetales utilizadas por nuestros antepasados se siguen utilizando hoy en día en diversas patologías.⁴

Existen muchos trabajos sobre la evaluación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante que se han realizado tanto en extractos como en metabolitos secundarios aislados de fuentes naturales. Estos estudios se han realizado guiados a través de diferentes modelos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*.⁹ En el presente trabajo se brindó información acerca de la actividad antiinflamatoria y antioxidante mediante el modelo *in vitro* del porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos y la actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo respectivamente, de la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro".

Los compuestos bioactivos en plantas medicinales están presentes en bajas concentraciones. Por lo tanto, es muy importante aplicar métodos de extracción adecuados y eficaces para la recuperación de estos compuestos.⁹

Para obtener el aislado de la fracción flavonoica se hizo, en primera instancia, una extracción hidroalcohólica con etanol al 80% de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro", el cual fue macerado durante 7 días y filtrado posteriormente para obtener el extracto deseado⁹ y al que seguidamente, se le realizó la identificación de los metabolitos secundarios presentes en dicho extracto⁴⁵ tal como podemos observar en la tabla 5. Se pudo identificar alcaloides, lactonas, catequinas, compuestos nitrogenados, fenoles y/o taninos y flavonoides siguiendo el procedimiento indicado por Miranda y Cuellar⁴⁵. Estos metabolitos

también fueron reportados por Chiclla ⁴ quien realizó un estudio fitoquímico y farmacológico de *Roripa nasturtium aquaticum* (L) Hayec “berro”. El extracto obtenido anteriormente fue desengrasado con éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que pudieran interferir en la extracción, luego se hizo una extracción líquido-líquido con acetato de etilo utilizando un embudo de separación para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo y evaporarla a sequedad.⁹ La fracción de acetato de etilo es la fracción flavonoica usada en la determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro*.

Las reacciones de coloración pueden usarse para evidenciar la presencia de flavonoides, una de las más específicas es la reacción de Shinoda, de la que resultan coloraciones características según el tipo del núcleo del flavonoide.⁴⁵ En el anexo 8 se observa la reacción de Shinoda, en la cual se puede apreciar el cambio de coloración a rojo ladrillo, con ello confirmando la presencia de flavonoides en la fase de acetato de etilo que por la característica del color, podría tratarse posiblemente de flavonoides de tipo isoflavonas, flavonas y flavonoles.¹⁹

La extracción de la fracción flavonoica se realizó siguiendo sus propiedades de solubilidad. La solubilidad de los flavonoides depende de la forma en que se encuentren, del número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (metanol, etanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y cloroformo según reporta Ramírez.¹⁸

En el ensayo cromatográfico preliminar se confirmó la presencia de flavonoides al observarse manchas de color pardo tenue revelado con FeCl₃ al 1% para compuestos fenólicos²⁹ tal como podemos observar en el anexo 9.

En la figura 7 se observa la curva de calibración de la quercetina para la cuantificación de flavonoides, la ecuación de la recta que se obtuvo se utilizó para cuantificar los flavonoides totales presentes en las hojas de *Nasturtium officinale*. La cantidad de flavonoides cuantificados fue de 126,7 mg equivalente de quercetina en 100 g de muestra (mg EQ/100 g) tal como figura en la tabla 6.

Nasturtium officinale R. Br. tiene una larga historia de usos medicinales populares en todo el mundo como antiinflamatorio, hepatoprotector, antiescorbútico,

antioxidante, sedante para la tos, cicatrizante, antiulceroso.⁴ El extracto de la hoja contiene taninos, catequinas y flavonoides, principalmente derivados de la rutina que es el responsable de la actividad antioxidante y antiinflamatoria dependientes de la dosis.⁴

La fracción flavonoica aislada fue usada para realizar pruebas de protección de la membrana celular para evaluar la actividad antiinflamatoria *in vitro*, a concentraciones de 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL versus una estándar hidrocortisona 100 µg/mL, como resultado se observó que la fracción flavonoica de *Nasturtium officinale* R. Br. presentó buena actividad antiinflamatoria dependiente de la concentración.

En la figura 8 se observa el porcentaje de protección de membrana de la fracción flavonoica y su respectivo estándar. La fracción flavonoica aislada mostró porcentajes de 91,2%; 92,4%; 95,5%; 97,1% y 98,9% a concentraciones de 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL respectivamente. Como se puede apreciar, la estabilización máxima de la membrana fue de 98,9% a una concentración de 1000 µg/mL respecto a la protección ejercida por el estándar hidrocortisona 100 µg/mL que fue del 97,7%.

El análisis de varianza se realizó para analizar si los tratamientos difieren significativamente entre sí en cuanto a sus medias y varianzas.

Del análisis estadístico observado en el anexo 21, prueba de ANOVA, se demuestra que hay diferencia significativa ($p < 0,05$) en el porcentaje de protección de membrana ejercida por las diferentes concentraciones de fracción flavonoica (100, 250, 500, 1000 µg/mL) y el estándar hidrocortisona 100 µg/mL, por lo que fue necesario recurrir a la prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey, adjuntado en el anexo 22, que nos permitió determinar qué medias difirieron y qué medias eran subconjuntos homogéneos que no se diferencian entre sí. El porcentaje de protección ejercido a la concentración de 500 µg/mL de la fracción flavonoica (97,1%) es estadísticamente similar ($p < 0,05$) al porcentaje de protección ejercido por la hidrocortisona 100 µg/mL (97,7%), es decir, ambas concentraciones poseen actividad antiinflamatoria similar a un nivel de confianza del 95% según la prueba HSD Tukey.

Chippada *et al.*¹⁵ evaluaron la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto metanólico de *Centella asiática* por estabilización de la membrana de glóbulos rojos a diferentes concentraciones de extractos (50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 µg/mL) y tomando como estándar al diclofenaco 100 µg/mL, los resultados

mostraron que la estabilización máxima de la membrana fue de 94,97 % a una dosis de 2000 µg/mL y para el diclofenaco fue de 98,76%.

Asimismo, en los estudios realizados por Leelaprakash y Mohan Dass² al determinar el efecto antiinflamatorio *in vitro* del extracto metanólico de *Enicostemma axillare* por el mismo método, mostraron un porcentaje de inhibición de la lisis de la membrana ($p < 0,05$) máxima de 75% a 500 µg/mL y el estándar usado, aspirina 100 µg/mL, ejerció 68% de protección de la membrana.

Fernández *et al.*¹⁰, trabajaron con el extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* “ratania” a concentraciones de 10, 50, 100, 200 µg/mL de extracto versus hidrocortisona 400 µg/mL como estándar. Obtuvieron como resultado una mayor eficacia antiinflamatoria al utilizar ratania en concentración de 50 y 200µg/mL, obteniéndose una máxima protección de 35,9% a 200 µg/mL respecto al 12,4% del estándar.

En la investigación titulada actividad antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las semillas de cuatro variedades de *Chenopodium quinoa Willd* “quinua” realizada por Farfán⁵⁰ se observó que a las concentraciones de 1000 µg/mL de las cuatro variedades de quinua, se obtuvieron los mayores porcentajes de protección de la membrana de glóbulos rojos, de las cuales, la variedad que presentó mayor porcentaje de protección fue INIA Salcedo con un 98%, mientras su estándar, hidrocortisona 100 µg/mL, obtuvo un 94,2% de protección.

Como se observa en los antecedentes, la protección sobre la membrana celular que ejercen los extractos de *Centella asiática*, *Enicostemma axillare*, *Krameria lappacea* y flavonoides de *Nasturtium officinale R. Br.* “berro”, difieren uno del otro observándose que este último presenta mayor protección de membrana que el resto, por ejemplo; a la concentración de 1000 µg/mL de extracto de *Centella asiatica* el porcentaje de estabilización fue de 91,54% respecto a los 98,9% ejercida por de *Nasturtium officinale R. Br.* Estas pequeñas variaciones es debida a que Chipada *et al.*¹⁵, Leelaprakash y Mohan Dass² y Fernández *et al.*¹⁰, trabajaron con el extracto crudo de sus respectivas muestras con respecto a los flavonoides del berro que serían teóricamente puros y por tanto presentaría mayor protección sobre la membrana celular, en ese sentido es necesaria la purificación de cada compuesto bioactivo, tal y como en la investigación titulada actividad antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las semillas de cuatro variedades de *Chenopodium quinoa Willd* “quinua” realizada por Farfán⁴⁹

que a diferencia de los autores antes citados, realizó un proceso de extracción y purificación de fenoles por lo que los resultados que obtuvo presentan, relativamente, resultados similares a los obtenidos en esta investigación. De esta manera se puede usar la forma purificada del compuesto ya que puede mostrar una actividad incrementada. Pero más allá de la purificación también se tiene que tener en cuenta el porcentaje de rendimiento en flavonoides y las condiciones de trabajo del cual también dependerá su actividad biológica.

En los resultados se observa que el porcentaje de protección (eficacia antiinflamatoria) de la fracción flavonoica aislada es relativamente alto e incluso mayor al porcentaje de protección ejercida por el estándar, lo cual se explicaría por la extensa acción que poseen dichos metabolitos en el proceso inflamatorio. La protección de la membrana se fundamenta en la estabilización de la membrana de los glóbulos rojos por un efecto protector del corticoide (estándar) y flavonoides. Los fenoles y más específicamente los flavonoides, al igual que los esteroides antiinflamatorios, estabilizan la membrana de los lisosomas, partículas intracelulares que contienen proteasas y enzimas hidrolíticas, las que forman los mediadores químicos de la inflamación.¹⁰

La estabilización de los lisosomas es importante para limitar la respuesta inflamatoria evitando la liberación de constituyentes lisosómicos de neutrófilos activados, tales como enzimas bacterianas y proteasas, lo que provoca una mayor inflamación en los tejidos y un daño a la liberación extracelular. Las enzimas lisosómicas liberadas durante la inflamación producen diversos trastornos. Se dice que la actividad celular extra de estas enzimas está relacionada con la inflamación aguda o crónica.⁴⁹ Entonces los compuestos fenólicos al igual que los fármacos antiinflamatorios (esteroidales) actúan ya sea inhibiendo estas enzimas lisosómicas o estabilizando la membrana lisosomal.²⁷

Según estudios realizados acerca de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de flavonoides reportan una actividad inhibitoria en la producción de NO, expresión de iNOS y disminución de los niveles de TNF- α en macrófagos y recientemente se ha relacionado su capacidad para inhibir las metaloproteínas, así como en su capacidad para originar enlaces de hidrógeno que estabilizan las proteínas de la membrana basal, especialmente el colágeno, haciéndolas menos susceptibles a la degradación proteolítica.^{14,30,33} Además de inhibir enzimas como la ciclooxigenasa, quinasas, fosfolipasas.¹⁶

Otros mecanismos que explican la acción antiinflamatoria de los flavonoides se detallan a continuación: los ácidos fenólicos y flavonoides poseen capacidad para capturar radicales libres gracias a la presencia de grupos hidroxilo por lo tanto si puede secuestrar especies reactivas de oxígeno son beneficios en el tratamiento de trastornos inflamatorios debido a que se acepta comúnmente que, en una situación de estrés oxidativo, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales juegan un papel importante relacionado con los procesos inflamatorios, es decir en muchos trastornos inflamatorios hay producción de radicales O_2 , OH y especies no radicales libres (H_2O_2) que pueden dañar el tejido circundante por acción oxidante directa o indirecta.²⁷ La peroxidación de lípidos da como resultado la destrucción de la membrana y a continuación la respuesta inflamatoria mediante la producción de mediadores y factores quimiotácticos.^{28,39}

La fracción flavonoica aislada se usó también para evaluar la actividad antioxidante *in vitro*, para lo cual se usó una solución de DPPH pesando 24 mg y disolviendo en 100 mL de metanol (solución patrón), así como también, la fracción flavonoica a concentraciones 50, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/mL}$ versus un estándar Trolox a las mismas concentraciones de la fracción aislada según la metodología descrita por Brand-Willians *et al.*⁴⁶ y Bustamante.⁴⁷ Como resultado se observó que la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale R. Br.* presenta buena actividad antioxidante dependiente de la concentración según el método de la decoloración del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). La figura 9 representa la capacidad antioxidante de la fracción flavonoica expresada en porcentaje obtenida a las concentraciones de 50, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/mL}$ que fueron de 43,5%; 48,3%; 62,2%; 74,6% y 88,4% respectivamente; comparados frente al Trolox, el cual presentó una capacidad antioxidante de 47,3; 54,4%; 68,7%; 83,6% y 97,4% a las mismas concentraciones

Bustamante⁴⁷ menciona que si bien es cierto existen diferentes métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vivo* o *in vitro*, el método del DPPH *in vitro* permite tener una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*.

El análisis de varianza se realizó para analizar si los tratamientos difieren significativamente entre sí en cuanto a sus medias y varianzas.

Del análisis estadístico observado en el anexo 23, prueba de ANOVA, se demuestra que hay diferencia significativa ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante ejercida por las diferentes concentraciones de fracción flavonoica (50, 100, 200,

300, 400 µg/mL) y el estándar Trolox a las mismas concentraciones, por lo que fue necesario recurrir a la prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey, que nos permitió determinar qué medias difirieron y qué medias eran subconjuntos homogéneos que no se diferencian entre sí.

El porcentaje de capacidad antioxidante ejercido a la concentración de 100 µg/mL de fracción flavonoica (48,3%) es estadísticamente similar ($p < 0,05$) al porcentaje de capacidad antioxidante ejercido por el Trolox 50 µg/mL (47.3%), es decir, ambas concentraciones poseen actividad antiinflamatoria similar a un nivel de confianza del 95% según la prueba HSD Tukey adjuntado en el anexo 24.

Este método presenta una excelente estabilidad en ciertas condiciones por presentar un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que otros como el ABTS tienen que ser generados tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica.⁵⁰

De igual forma, se calculó la concentración del extracto que determinó una disminución del 50% de absorbancia de la solución de DPPH (CI_{50}), obteniéndose los siguientes resultados: para el Trolox fue de 69 µg/mL y para la fracción flavonoica 106,5 µg/mL. De acuerdo con los resultados de la identificación de flavonoides observado en el anexo 8, dichos metabolitos serían los responsables de la actividad antioxidante.

En estudios previos realizados por Rojas y Tomás⁵⁰ se observó una capacidad antioxidante dependiente de la dosis $75,85 \pm 2,06\%$ a 200 µg/mL del extracto metanólico de las hojas de *Passiflora edulis* Sims "maracuyá" ($p < 0,05$) determinándose una $CI_{50} = 124$ µg/mL. Así mismo Waqas *et al.*⁵¹ obtuvieron como resultado que las semillas *Vitis vinífera* tuvo una fuerte actividad de eliminación de DPPH ($p < 0,05$) mostrando 85,61% a 50 µg/mL de extracto etanólico.

Respecto a los flavonoides, se sabe que las flavonas y sobre todo los flavonoles se muestran como los más activos sobre los radicales libres.²⁷ La rutina, la quercetina y sus derivados que se encuentran en mayor cantidad en las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. podrían ser flavonoles, esto explica la buena actividad antioxidante de la fracción flavonoica.²⁸

Aguilar y Bonilla⁹ utilizando la fracción flavonoica de *Smallanthus sonchifolius* sin hidrolizar, determinaron que el CI_{50} necesario para neutralizar al DPPH fue de 24,7 µg/mL, mientras que, en el presente trabajo, utilizando la fracción de acetato de etilo, el CI_{50} fue de 106,5 µg/mL, mostrando que la actividad antioxidante de *Nasturtium officinale* R. Br. es menor respecto a la ejercida por *Smallanthus*

sonchifolius. Mientras que Ramirez¹⁸ al evaluar el extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “huamanpinta” obtuvo un CI_{50} de 218,35 $\mu\text{g/mL}$. El mismo autor señala un porcentaje de capacidad antioxidante máxima de 86,4% a 300 $\mu\text{g/mL}$, en nuestro caso fue de 74,6 % a la misma concentración tal como se observa en la figura 9.

Los buenos resultados obtenidos son gracias a que los flavonoides tienen capacidad para capturar radicales libres gracias a la presencia de grupos hidroxilo en su estructura. Esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C_2 y el C_3 en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4-oxo en los anillos A y C.³⁷

En la actualidad se sabe que existe relación entre la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides como ya se explicó en párrafos anteriores. Por lo tanto, los agentes que ejercen actividad antiinflamatoria pueden ser beneficiosos para tratar trastornos oxidativos en el organismo.

El hecho que de los extractos crudos y metabolitos aislados presenten actividad protectora de la membrana celular y capacidad para neutralizar radicales libres, da un aporte a la medicina en cuanto al tratamiento de enfermedades inflamatorias y oxidativas ya que en la actualidad se conocen varias enfermedades que tienen una base en la respuesta inflamatoria y el daño celular ejercido por sustancias oxidantes como la artritis reumatoidea y el cáncer, respectivamente, solo por mencionar algunos ejemplos.³ Por ende, lo que alguna vez se consideró una respuesta local a la lesión en la actualidad se está convirtiendo en un problema atractivo respecto de los mediadores inflamatorios y los radicales libres, así como en un mercado multimillonario para los fármacos antiinflamatorios y antioxidantes producidos por la industria farmacéutica; en ese sentido, la gestión de las enfermedades relacionadas con la inflamación y la oxidación es un problema real en la comunidad rural; la población en estas áreas utiliza muchos fármacos alternativos, tales como sustancias producidas a partir de plantas medicinales.^{3,5} Asimismo, no se puede descartar el elemento de la toxicidad que estos fármacos conllevan ya que su uso prolongado puede causar graves perjuicios por lo que es indispensable contar con nuevas alternativas terapéuticas con efecto antiinflamatorio y antioxidante, con menor toxicidad y costo¹, por ende, fomentar el consumo de berro podría mejorar la salud de estos pacientes.

Los experimentos mostraron un efecto protector dosis dependiente sobre la membrana celular y la captación de radicales libres, en consecuencia, según los resultados obtenidos, se ha demostrado que, en las condiciones experimentales, *Nasturtium officinale R. Br.* presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro.

VI. CONCLUSIONES

1. La fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" presenta propiedades antiinflamatorias según el modelo de estabilización de la membrana de glóbulos rojos (HRBC), también presenta propiedades antioxidantes según el modelo de la actividad secuestradora del radical 1, 1 difenil -2-picrilhidrazilo (DPPH).
2. Se identificaron metabolitos secundarios como alcaloides, lactonas, cumarinas, catequinas, saponinas, compuestos nitrogenados, taninos y flavonoides en el extracto etanólico de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro".
3. La cantidad de flavonoides totales presentes en la fracción flavonoica de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" es de 126,7 mg EQ/100 g de muestra.
4. La concentración de la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" que ejerció mayor porcentaje de protección de membrana fue el de 1000 µg/mL con un porcentaje de 98,9%.
5. La concentración de la fracción flavonoica aislada de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" que ejerció mayor porcentaje de actividad antioxidante fue el de 400 µg/mL con un 88,4%; además, presentó una IC₅₀ de 106,5 µg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Caracterizar mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) los flavonoides presentes en las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro".
2. Ampliar el estudio de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" ya que tiene múltiples propiedades farmacológicas y usos en nuestra población.
3. Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vivo* de los flavonoides aislados de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" y comparar con los resultados obtenidos en la presente investigación.
4. Realizar estudios que propongan su conservación, propagación y uso racional, ya que esta especie es considerada como un recurso natural muy promisorio en el Perú.
5. Realizar estudios de investigación haciendo uso del extracto para determinar la eficacia antiinflamatoria y antioxidante aplicándola en alguna forma farmacéutica tópica.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Porth C.M. Fisiopatología: Salud-Enfermedad: Un Enfoque Conceptual. 7ª. Ed. Buenos aires: Editorial médica panamericana; 2006.
2. Leelaprakash G, Mohan Dass S. *In vitro* Anti-Inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*. Int. J. Drug Dev. & Res. Bangalore- India: July-Sept; 2011; 3 (3): 189-196.
3. Robbins Y Cotran. Patología Estructural y Funcional. 8ª edición. Barcelona: Editorial S.A. Elsevier España; 2010.
4. Chiclla N. Estudio fitoquímico y farmacológico de *Roripa nasturtium aquaticum* “berro” [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2003.
5. Forés R. Atlas de las plantas medicinales y curativas; la salud a través de las plantas. Madrid: Editorial Culturam; 2013.
6. Hurtado C. Hortalizas nativas alimenticias y medicinales. Resumen del segundo curso internacional de plantas medicinales y fitoterapia. Perú: FITO; 2012.
7. Bhat S.V, Nagasampagi B.A, Sivakumar M. Chemistry of natural products. New Delhi: Narosa Publishing House; 2007.
8. Kaufman PB, Cseke LJ, Warber CS, James AS, Briemann HL. Natural Products from Plants. London: CRC Press; 2010.
9. Aguilar E, Bonilla P. Actividad antioxidante e inmunológico de flavonoides aislados de las hojas de *Smallantus sonchifolius* (yacón). Instituto de investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Ayacucho-Perú: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2009.
10. Fernández A, Arroyo J, Bonilla P, Tomás G, Medina Fátima. Efecto antiinflamatorio in vitro y seguridad en ratas del extracto acuoso atomizado de la raíz de *Krameria lappacea* “ratania”. Ciencia e investigación, Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007.
11. Hassing A, Liang WX, Schwabl H, Stampfli K. Flavonoids and tannins: plantbased antioxidants with vitamin character. E.E.U.U: Med Hypotheses; 2010.p.479-81.
12. Buhler D, Miranda C. Actividad antioxidante de los flavonoides. Instituto Linus Pauling. E.E.U.U: Universidad Estatal de Oregon; 2011.
13. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Instituto Superior de Medicina Militar “Dr. Luis Díaz Soto”. Revista Cubana Med Milit; 2002;31(2):126-33
14. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. Cell Biol Toxicol. E.E.U.U; 2013; 16:91-8.
15. Chippada S.C, Volluri S.S, Bammidi S.R, Vangalapati M. in vitro anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Centella asiatica* by HRBC membrane stabilization. Rasayan J. Chem. Inglaterra: 2011; 4(2): 457-460.
16. Bafna AR, Mishra SH, Actividad antioxidante *in vitro* del extracto de metanol de los rizomas de *Curculigo orchioides* Gaertn. India: The M.S. University of Baroda; 2005.
17. Félix V. Estudio fitoquímico y determinación de las flavanonas y alcaloides de naturaleza indólica en hojas de *Perezia multiflora* (H. Et B) Less. Escorsonera. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
18. Ramírez E. Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora del extracto clorofórmico de las hojas de *Chuquiraga lessing* “Huamanpinta” [Tesis para

- optar el grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
19. Casanova, G. Actividad antioxidante y antiulcerosa del extracto acuoso liofilizado de *Calceolaria cuneiformes* R.p. *Sub sp. Cuneiformes* "ayapata zapatum". [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
 20. Huamaní C. Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de tres variedades de *Allium sativum* L. "ajo". [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico]. Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2009.
 21. Hoogesteger C. Uso de plantas medicinales. México: Editorial Árbol; 2007. p.11-14.
 22. Lifchitz. A. Plantas medicinales guía práctica de botánica universal. Buenos aires: editorial Kier.; 2006. p. 12 - 14.
 23. Mahabir P. Plantas medicinales Iberoamericanas.1ra ed. Bogotá Colombia; 2005. p. 438 -439.
 24. Botanical-online [homepage en internet]. Los berros. México; 2017 [actualizada 16 de junio de 2017; accesado 16 de junio de 2017]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/berros.htm>
 25. Forés R. Atlas de las plantas medicinales y curativas; la salud a través de las plantas. Madrid: Editorial Culturam; 2013.
 26. Plantas para curar [homepage en internet]. Berros: contraindicaciones y principios activos; 2017 [actualizada 17 de junio de 2017; accesado 17 de junio de 2017]. Disponible en <http://www.plantasparacurar.com/contraindicaciones-y-toxicidad-del-berro8080/>
 27. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition; E.E.U.U; 2012, 18: 75-81.
 28. Drago ME. Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas; 2007, 38(4): 42-47.
 29. Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2da edición. Lima: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 2004.
 30. Robbins S, Cotran R. Inflamación aguda y crónica en patología estructural y funcional. 7ma edición. Madrid: Editorial Saunders; 2007. p. 47-46.
 31. Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. Farmacología Básica y Clínica. 12ª edición. México: Editorial MC Gran Hill; 2010.
 32. Kumar V, Fausto N, Aster J, Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 6ta edición. México: Editorial Saunders-Elsevier; 2000. p. 53-120.
 33. Tinco J.A. Farmacología básica y avanzada. 1ra edición. Huamanga-Perú: Editorial Dermofarm; 2014.
 34. Brunton LJ, Parker K. Goodman & Gilman Las bases farmacológicas de la terapéutica. México: McGraw-Hill Interamericana Editores. S.A de C.V; 2012.p.34
 35. Florez J. Farmacología Humana. 5ta edición. Barcelona: Elsevier Masson; 2008.
 36. Cross C, Halliwell B, Borish E, Pryor W, Ames B, Saul R, et.al. Oxigen radicals and human disease. Ann Inter Med; Philadelphia; 2009, 107: 526-54.
 37. Montero M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes. Rev. Anales de la Facultad de Medicina. Costa Rica: Vol.57 N°4: 278-281; 1996.
 38. Fernandini L, Vera M. Ácido ascórbico en el desarrollo de sarcoma 180 de ratón. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.

39. Ku A. Enfermedades producidas por radicales libres. México: Rev. Panamericana Salud Pública. Vol 1 N°5. 1997.
40. Chavez R, Plaza A, Lock O. Antioxidantes de origen vegetal. Revista de Química. Vol. X. N°1. junio de 1996. Publicada por la sección de Química del Departamento de Ciencias de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
41. Pellegrini N, Pannala A, Yang M, Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med.E.E.U.U; 1999, 26, 1231-1237.
42. Suárez S. Antioxidantes en recursos fitoterapéuticos. En Primer curso nacional. Centro de investigación de Bioquímica y Nutrición. Lima: UNMSM: Facultad de Medicina Humana; 2006.
43. Arroyo J., Cisneros C. Modelos experimentales de investigación farmacológica. 1ra edición. Lima: Editorial ASDIMOR S.A.C.; 2012.
44. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Foodchem. [Revista en internet]; London; 2009. [Accesado julio 2017]; 64: 555-559. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814698001022>
45. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana - Cuba: Editorial Instituto de Farmacia y Alimentos – Universidad de la Habana; 2000; 23-33.
46. Brand-Williams W, Cuvelier M, & Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*,28(1),25-30.
47. Bustamante K. Determinación de compuestos antioxidantes en subproductos de cacao “testa” [Tesis para título]. Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja; 2014.
48. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 5ta edición. México: Editorial McGraw-Hill; 1991.
49. Farfán F. Actividad antiinflamatoria *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las semillas de cuatro variedades de *Chenopodium quinoa Willd* “quinua”. [Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] Ayacucho: Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga; 2017.
50. Rojas J, Tomás G. Tamizaje Fitoquímico y Actividad Antioxidante *in vitro* de *Passiflora edulis* Sims “maracuyá”. Revista Peruana de Química e Ingeniería Química. Lima; 2010; 13(1): 23-29.
51. Waqas M, Saqib N, Rashid S, Shah P, Akhtar N, Murtaza G. Screening of various botanical extracts for antioxidant activity using DPPH free radical method. Afr J Tradit Complement Altern Med. England; 2013; 10(6): 452-455.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación botánica de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro". Ayacucho 2018.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE
"SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA"

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Farmacia y Bioquímica, Sr. **Jorge Didier, AYVAR AGUILAR**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de CRONQUIST, A (1 988), y es como sigue

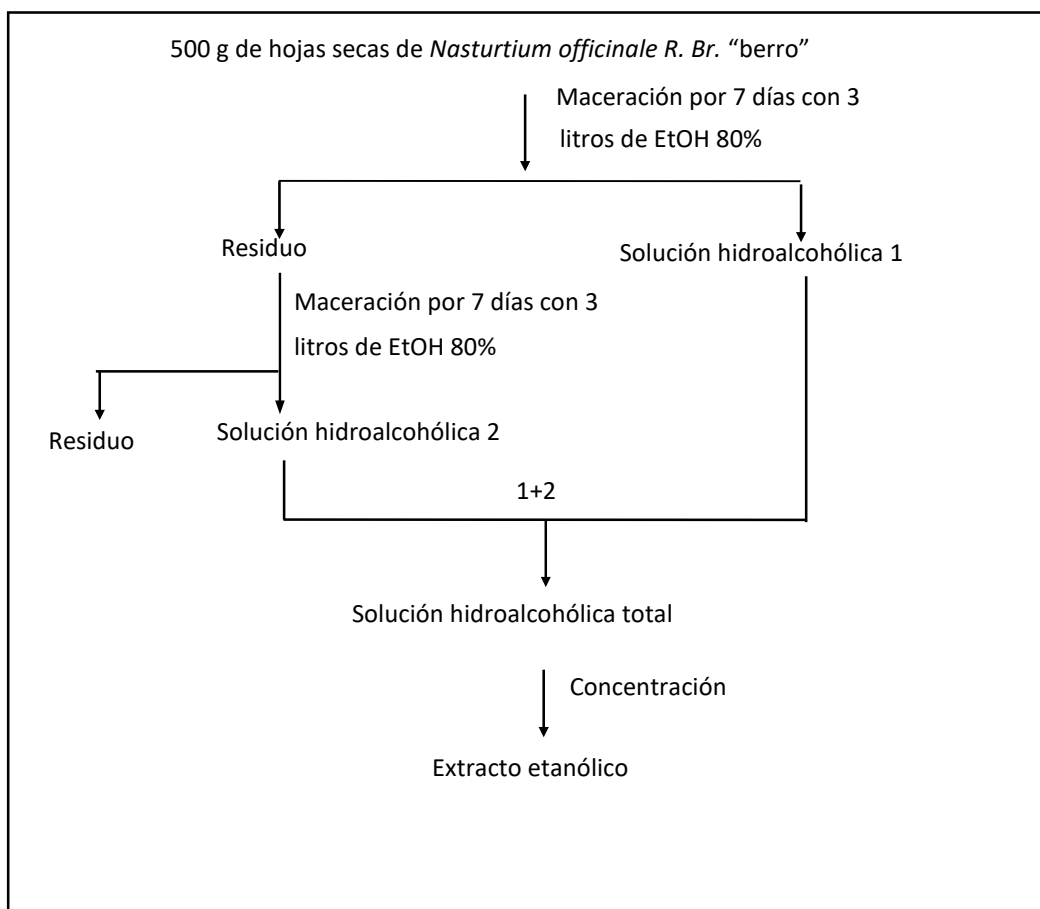
DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	DILLENIIDAE
ORDEN	:	CAPPALES
FAMILIA	:	BRASSICACEAE
GENERO	:	<u>Nasturtium</u>
ESPECIE	:	<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.
N.V.	:	"berro".

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

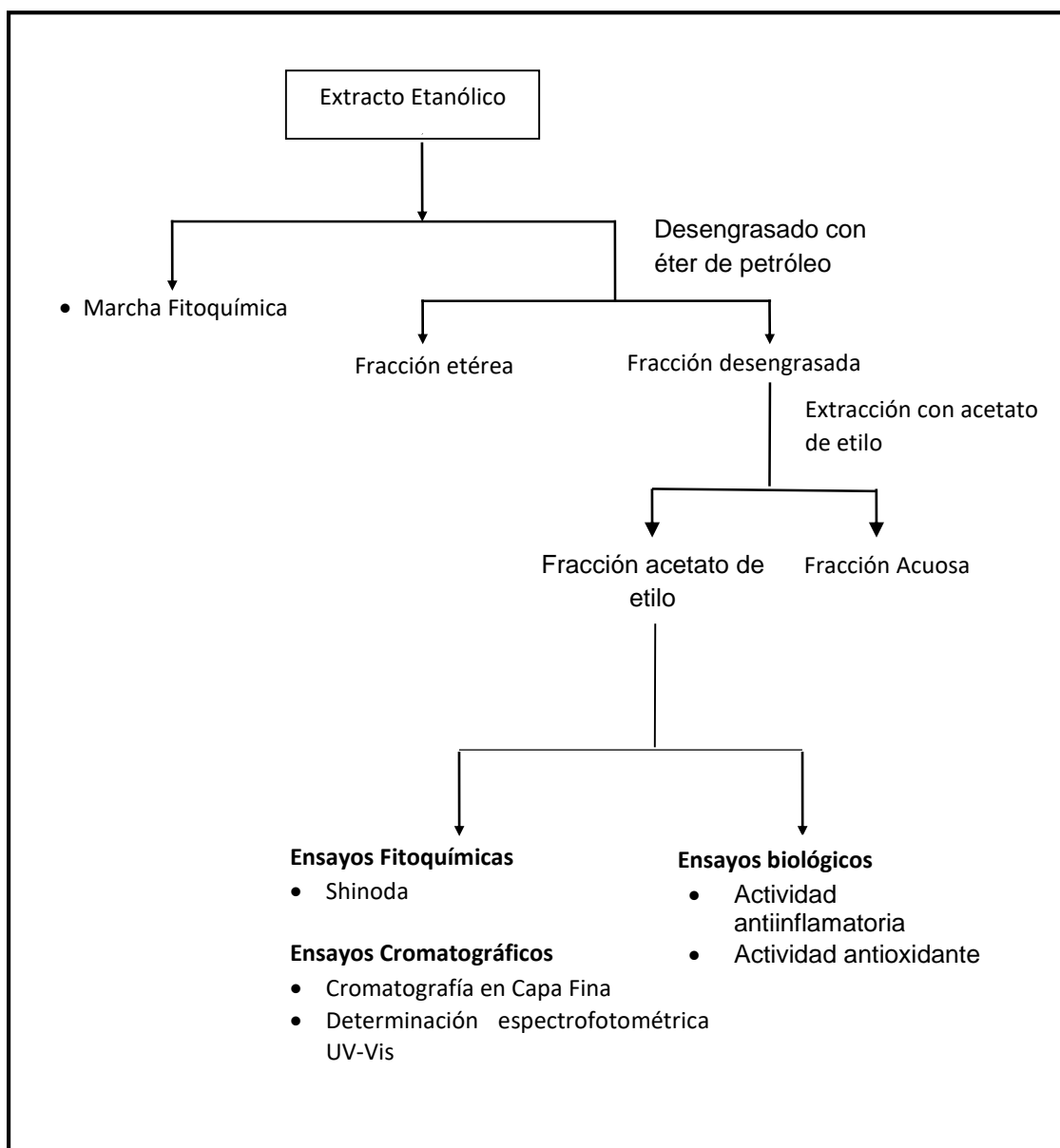
Ayacucho, 24 de Mayo del 2 017.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS
Egla Luzuriaga Ruiz
JEFE

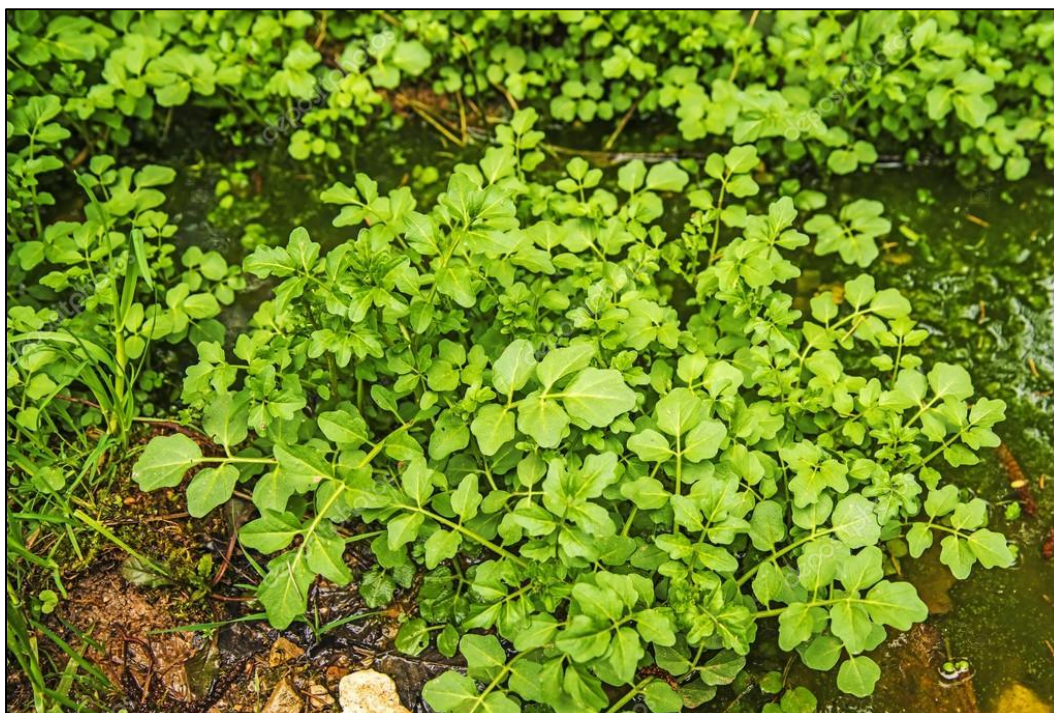
Anexo 2. Esquema para la obtención del extracto hidroalcohólico de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro". Ayacucho 2018.



Anexo 3. Esquema del fraccionamiento del extracto etanólico de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro". Ayacucho 2018



Anexo 4. Recolección y secado de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" Ayacucho 2018.



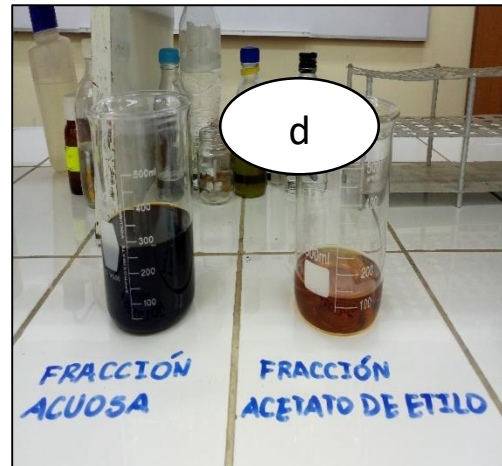
Anexo 5. Proceso de obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



Anexo 6. Ensayo de identificación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" en el laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.

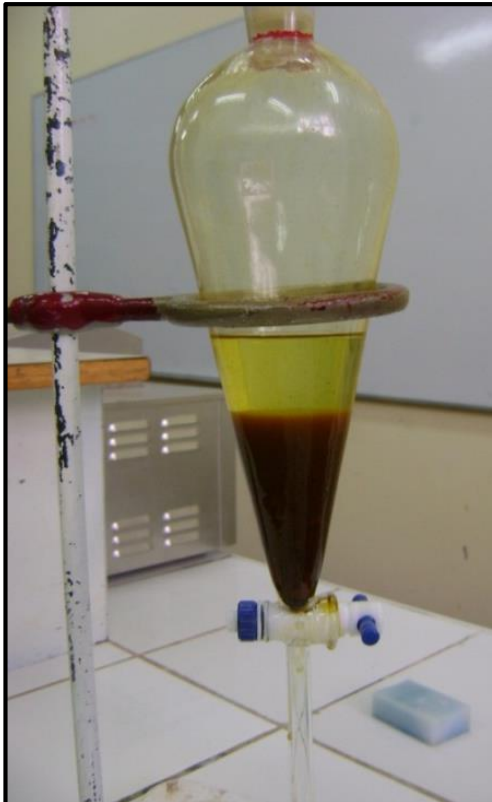


Anexo 7. Proceso de extracción de la fracción flavonoica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.

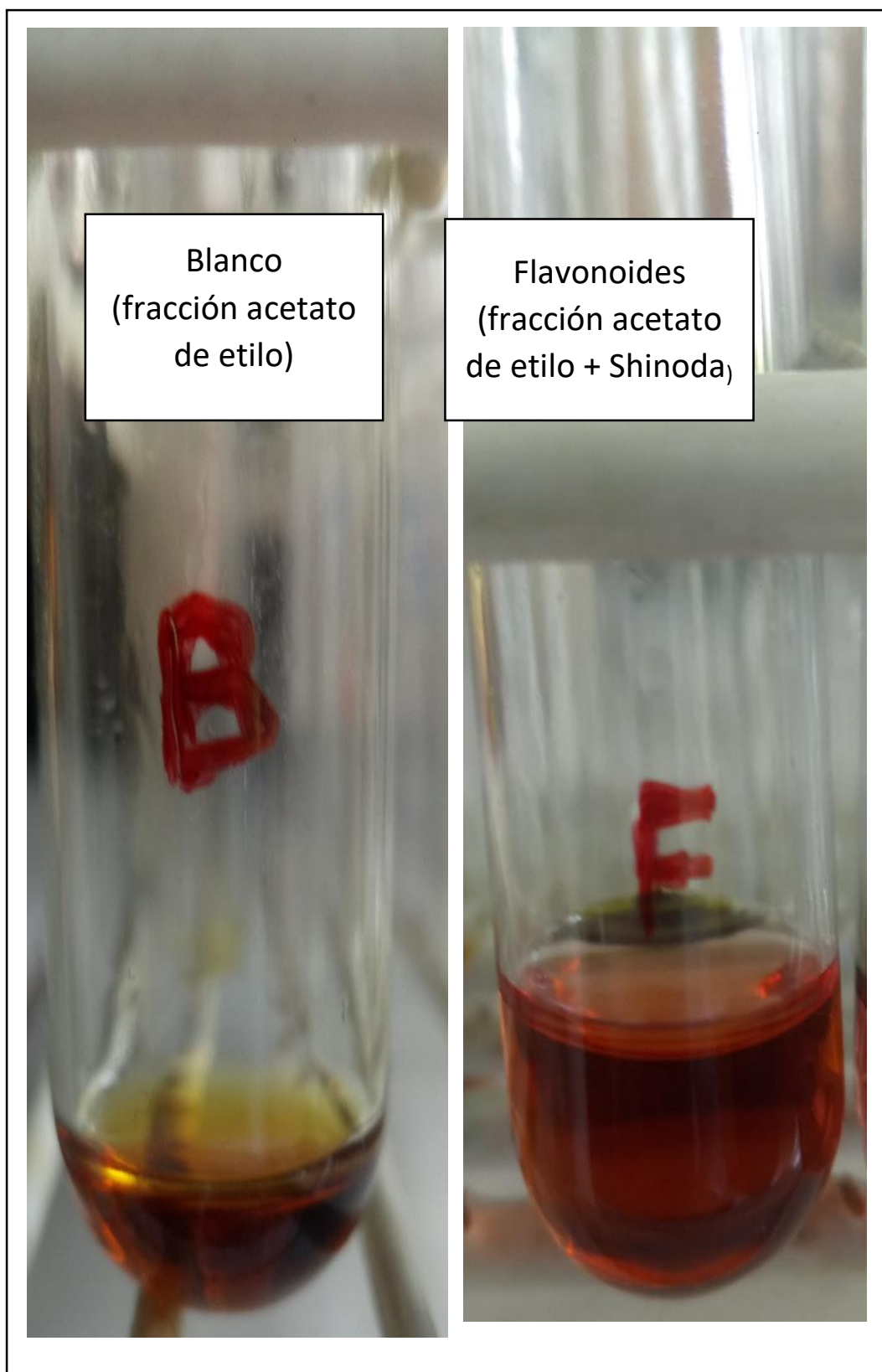


b

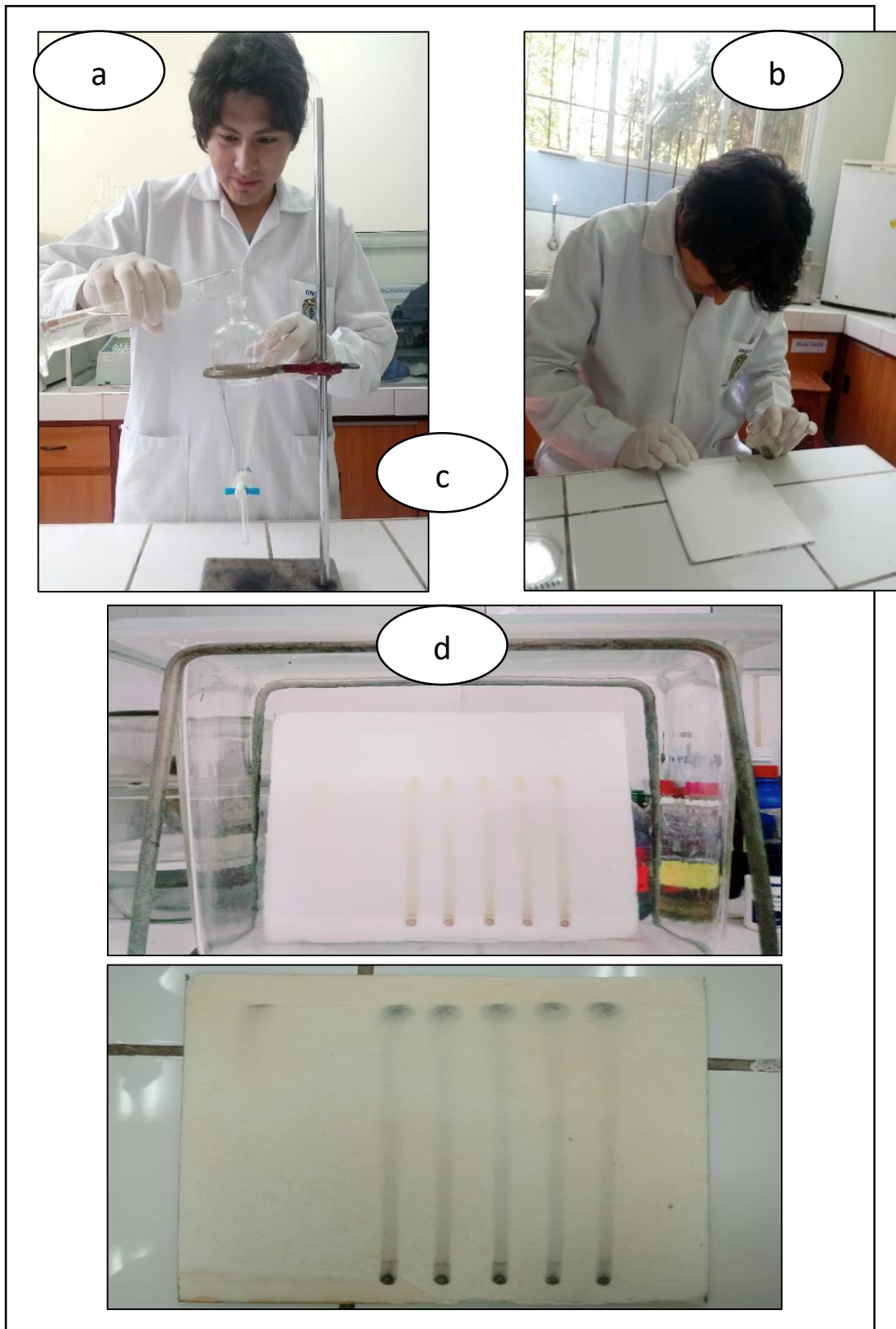
c



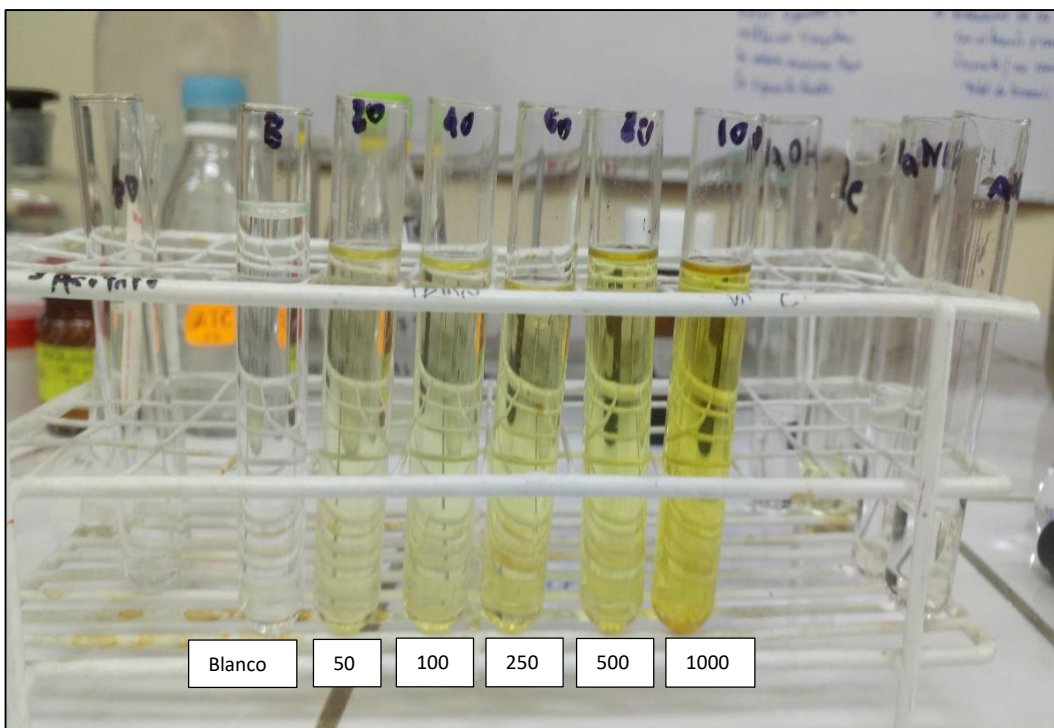
Anexo 8. Identificación fitoquímica de flavonoides mediante el ensayo de Shinoda en la fracción de acetato de etilo obtenido de las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" en el laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho 2018.



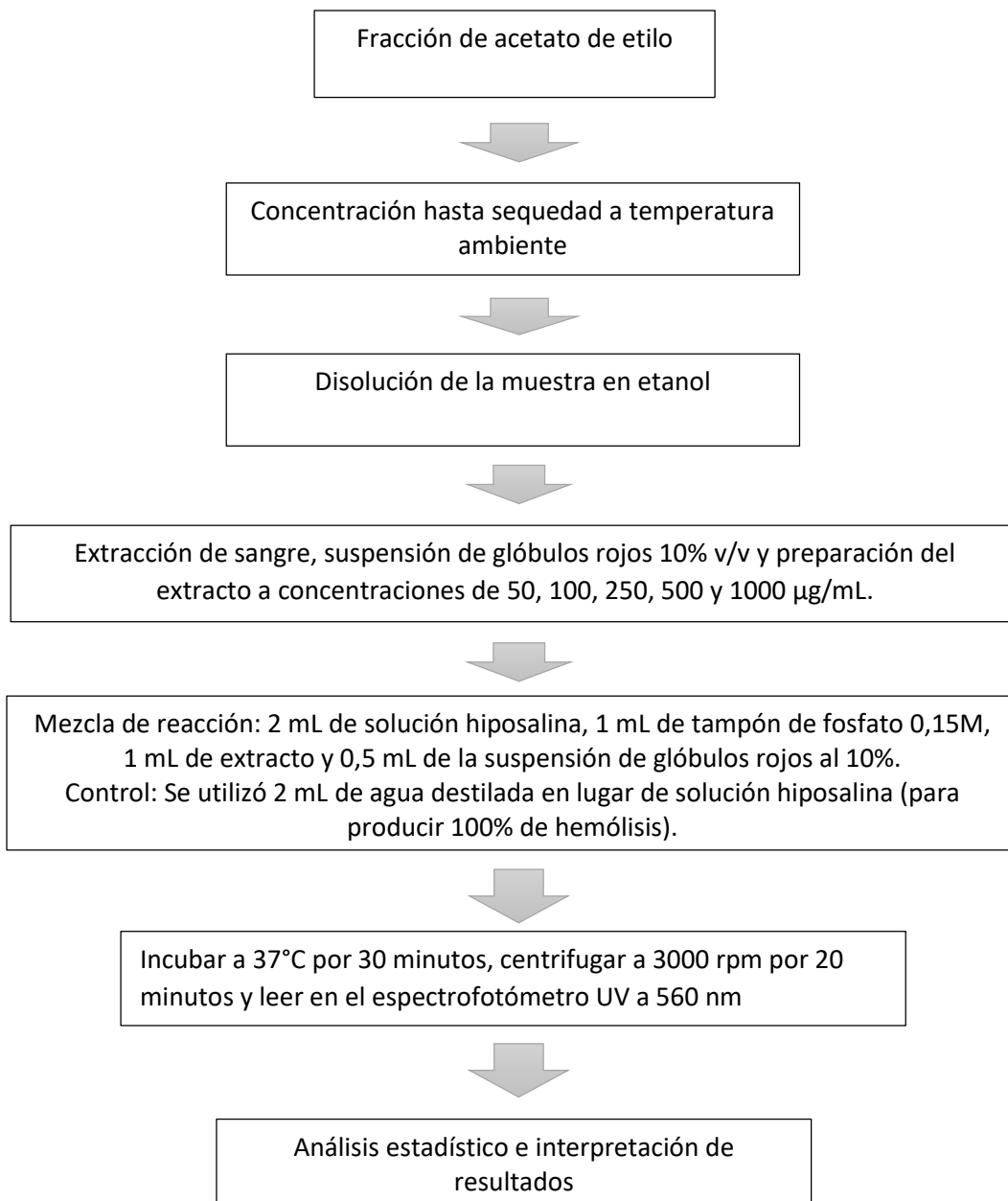
Anexo 9. Proceso de sembrado y desarrollo de cromatografía en capa fina para la identificación de fenoles en las hojas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



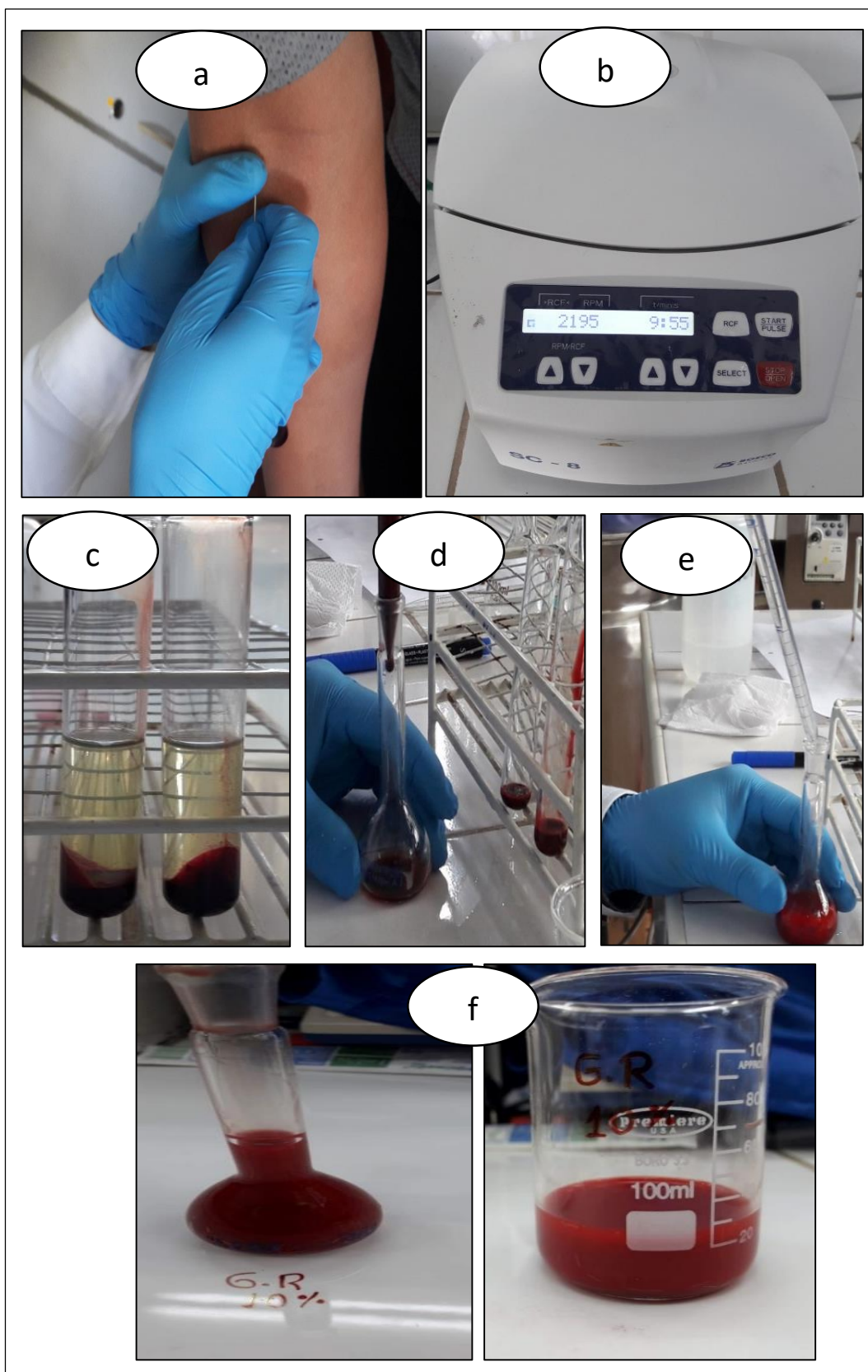
Anexo 10. Dilución del estándar Quercetina para la elaboración de la curva de calibración en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



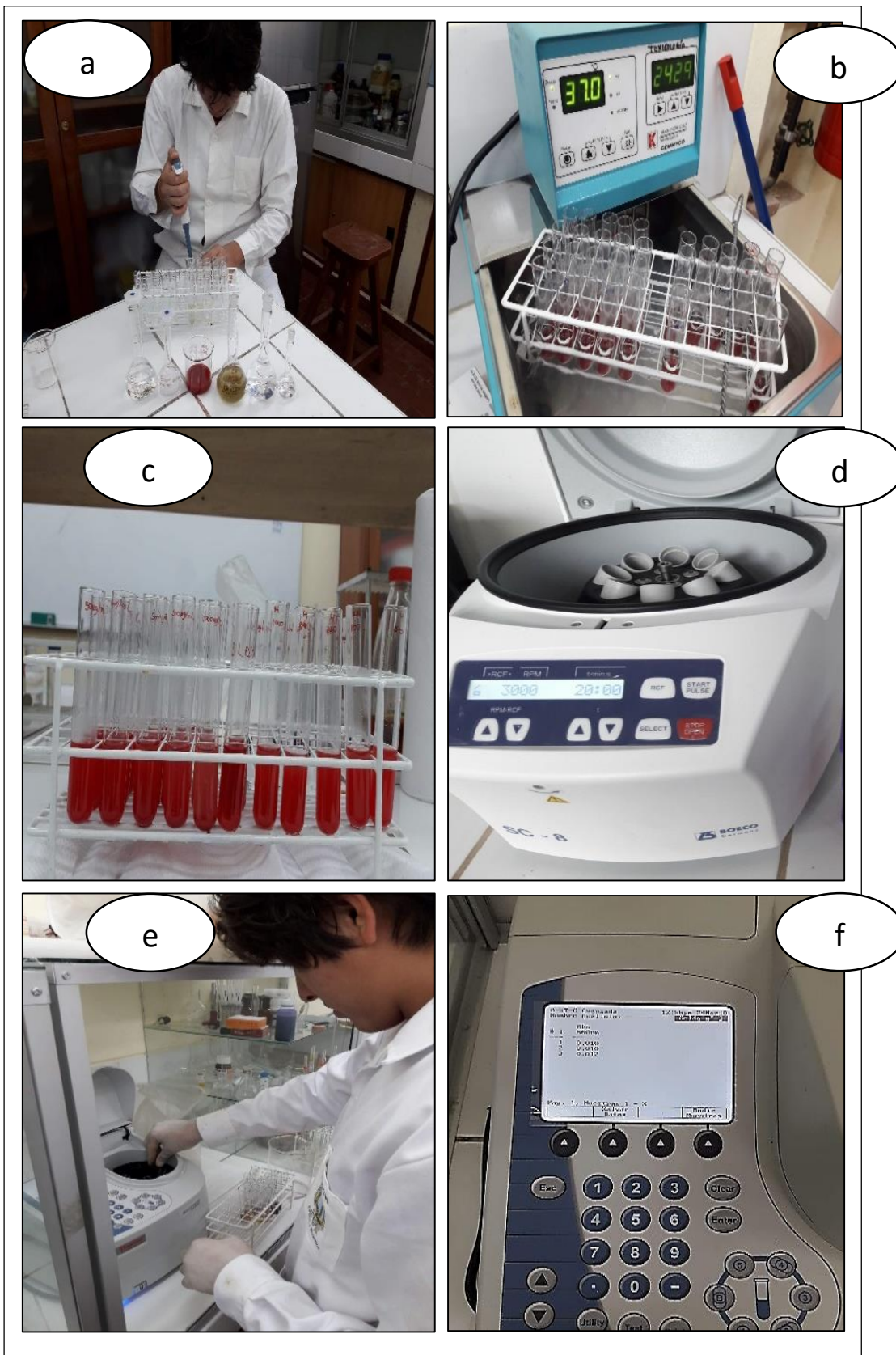
Anexo 11. Flujograma del procedimiento para la determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



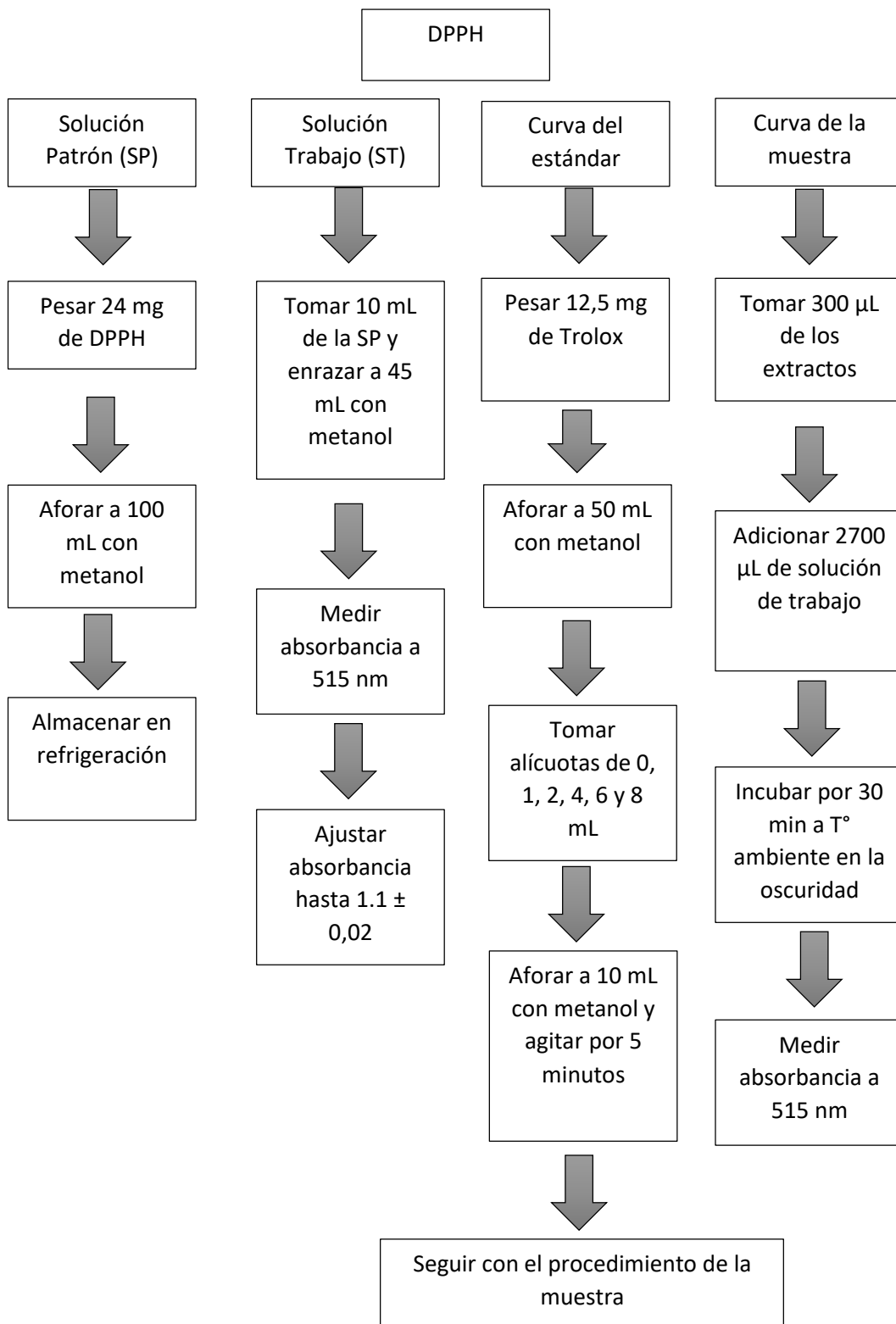
Anexo 12. Preparación de la suspensión de glóbulos rojos al 10% v/v en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



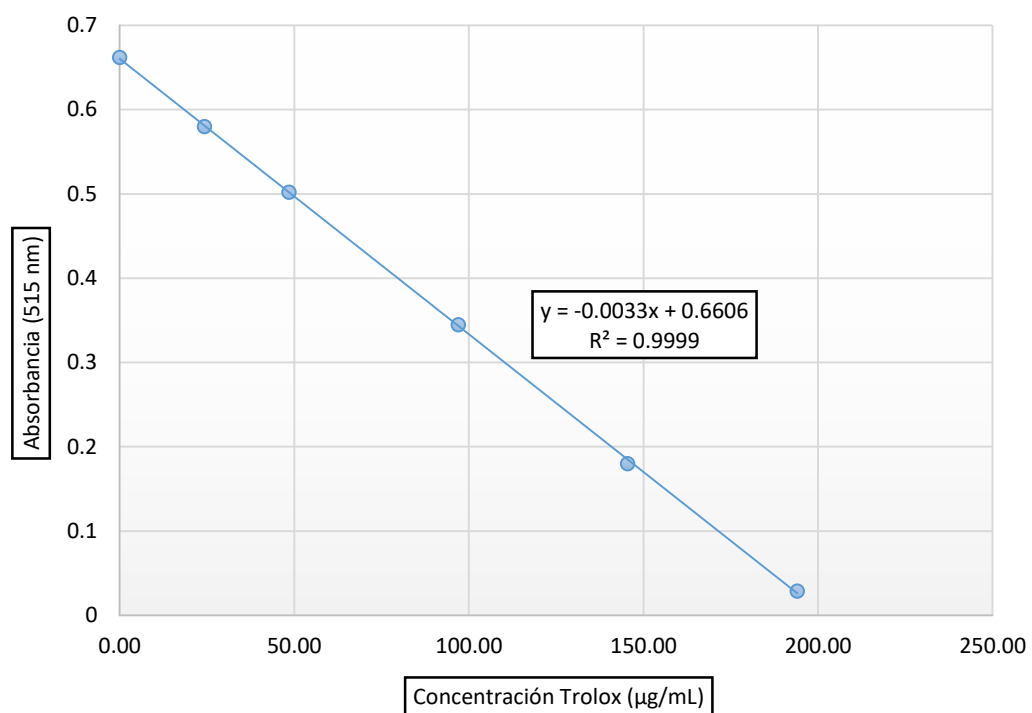
Anexo 13. Preparación y lectura de absorbancias de la mezcla de reacción (muestra, control y estándar) en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



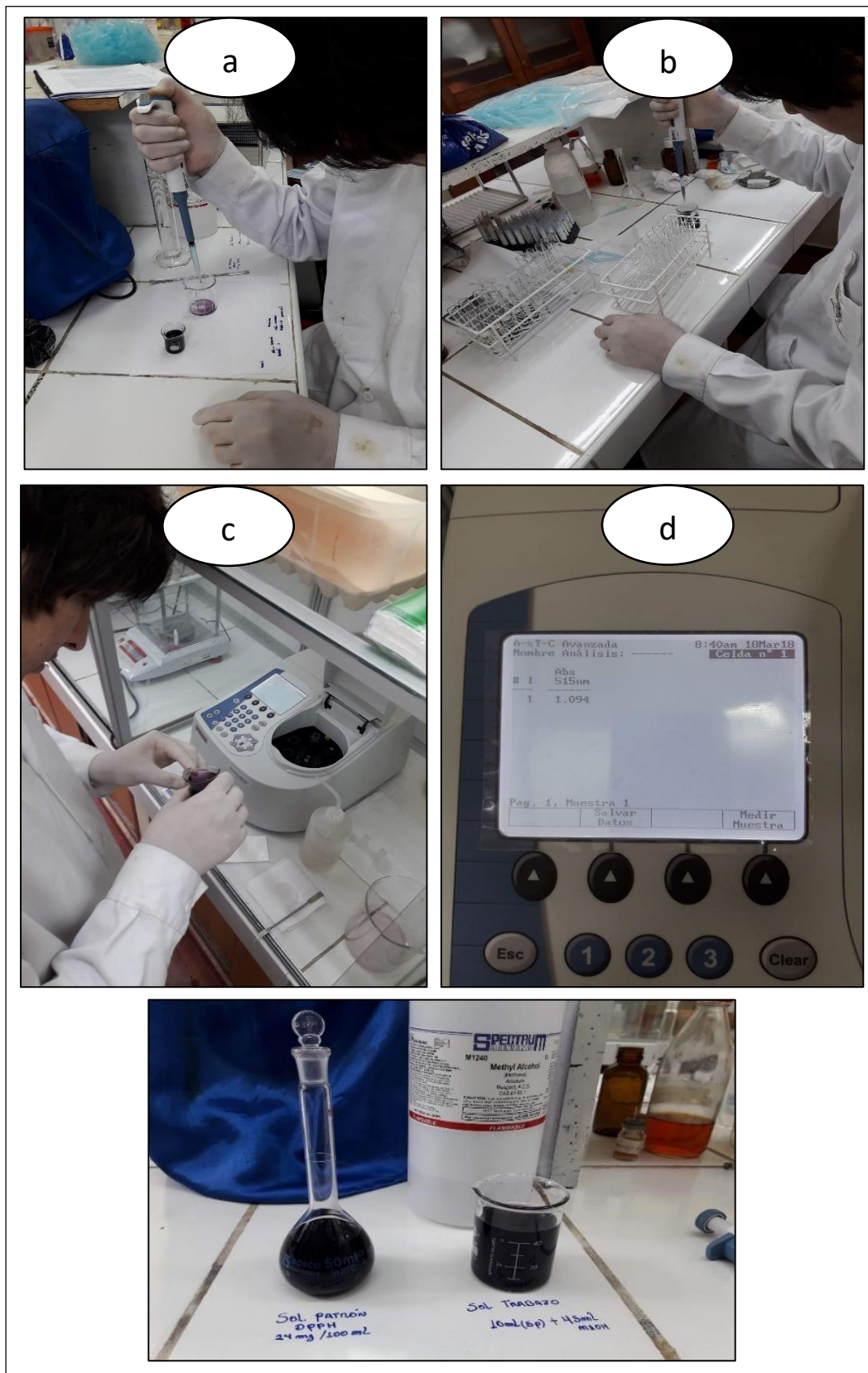
Anexo 14. Protocolo para la determinación de la capacidad antioxidante por el ensayo DPPH del extracto de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. “berro” en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



Anexo 15. Curva de calibración obtenida para el estándar Trolox en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



Anexo 16. Preparación de la solución patrón y solución de trabajo para la determinación de la actividad antioxidante en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



Anexo 17. Dilución del radical libre DPPH para la elaboración de la curva de calibración del Trolox en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



Anexo 18. Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH de la fracción de acetato de etilo en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



Anexo 19. Absorbancias y porcentajes de protección de la membrana de glóbulos rojos de la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA		
Concentración	Absorbancia	Protección de membrana de GR (%)
Fracción flavonoica		
50 µg/mL	0,050	90,5
50 µg/mL	0,052	90,1
50 µg/mL	0,045	91,4
50 µg/mL	0,037	92,9
100 µg/mL	0,035	93,3
100 µg/mL	0,040	92,4
100 µg/mL	0,048	90,8
100 µg/mL	0,038	92,8
250 µg/mL	0,018	96,6
250 µg/mL	0,028	94,7
250 µg/mL	0,027	94,9
250 µg/mL	0,022	95,8
500 µg/mL	0,020	96,2
500 µg/mL	0,011	97,9
500 µg/mL	0,017	96,8
500 µg/mL	0,013	97,5
1000 µg/mL	0,004	99,2
1000 µg/mL	0,010	98,1
1000 µg/mL	0,003	98,9
1000 µg/mL	0,002	99,6
Hidrocortisona		
100 µg/mL	0,010	98,1
100 µg/mL	0,015	97,1
100 µg/mL	0,012	97,7
100 µg/mL	0,011	97,9
Control	0,524	

Anexo 20. Absorbancias y porcentajes de la actividad antioxidante de la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro". 2018.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE		
Concentración	Absorbancia	Capacidad antioxidante (%)
Fracción flavonoica		
50 µg/mL	0,618	43,8
50 µg/mL	0,625	43,2
50 µg/mL	0,622	43,5
100 µg/mL	0,555	47,5
100 µg/mL	0,558	49,3
100 µg/mL	0,556	48,2
200 µg/mL	0,410	62,7
200 µg/mL	0,423	61,5
200 µg/mL	0,415	62,3
300 µg/mL	0,275	75,0
300 µg/mL	0,285	74,1
300 µg/mL	0,278	74,7
400 µg/mL	0,128	88,4
400 µg/mL	0,145	86,8
400 µg/mL	0,132	88,0
Trolox		
50 µg/mL	0,578	47,5
50 µg/mL	0,583	47,0
50 µg/mL	0,579	47,4
100 µg/mL	0,498	54,7
100 µg/mL	0,507	53,9
100 µg/mL	0,501	54,5
200 µg/mL	0,338	69,3
200 µg/mL	0,346	68,5
200 µg/mL	0,350	68,2
300 µg/mL	0,172	84,4
300 µg/mL	0,186	83,1
400 µg/mL	0,023	97,9
400 µg/mL	0,035	96,8
Control	1,094	

Anexo 21. Análisis de varianza del porcentaje de protección de membrana de los glóbulos rojos para la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro". Ayacucho 2018.

ANOVA

% Protección de glóbulos rojos	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	188,664	5	37,733	340,873	,000
Dentro de grupos	1,993	18	,111		
Total	190,656	23			

Anexo 22. Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey del porcentaje de protección de membrana de los glóbulos rojos para la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" y el estándar hidrocortisona. Ayacucho 2018.

COMPARACIONES MÚLTIPLES

% PROTECCIÓN DE MEMBRANA DE GLÓBULOS ROJOS

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
EXTRACTO 50 µg/mL	4	91,2250				
EXTRACTO 100 µg/mL	4		92,3750			
EXTRACTO 250 µg/mL	4			95,4500		
EXTRACTO 500 µg/mL	4				97,1000	
Hidrocortisona 100 µg/mL	4				97,7000	
EXTRACTO 1000 µg/mL	4					98,9250
Sig.		1,000	1,000	1,000	,161	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.

Anexo 23. Análisis de varianza de la capacidad antioxidante (%) para la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro". Ayacucho 2018.

ANOVA

Capacidad antioxidante (%)	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9484,616	9	1053,846	3008,124	,000
Dentro de grupos	7,007	20	,350		
Total	9491,623	29			

Anexo 24. Prueba de comparaciones múltiples HSD Tukey de la capacidad antioxidante (%) para la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" y el estándar Trolox. Ayacucho 2018.

COMPARACIONES MÚLTIPLES

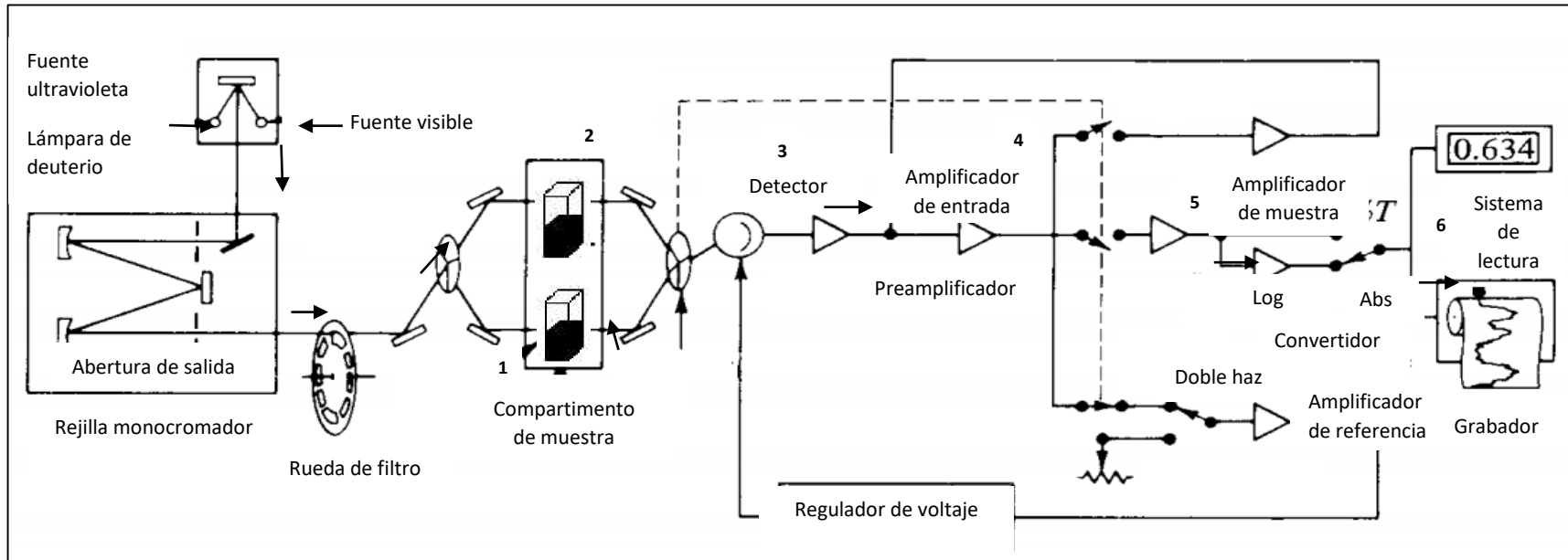
CAPACIDAD ANTOXIDANTE (%)

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
EXTRACTO 50 µg/mL	3	43,500								
TROLOX 50 ug/mL	3		47,300							
EXTRACTO 100 µg/mL	3		48,333							
TROLOX 100 ug/mL	3			54,367						
EXTRACTO 200 µg/mL	3				62,167					
TROLOX 200 ug/mL	3					68,667				
EXTRACTO 300 µg/mL	3						74,600			
TROLOX 300 ug/mL	3							83,667		
EXTRACTO 400 µg/mL	3								87,733	
TROLOX 400 µg/mL	3									97,367
Sig.		1,000	,524	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

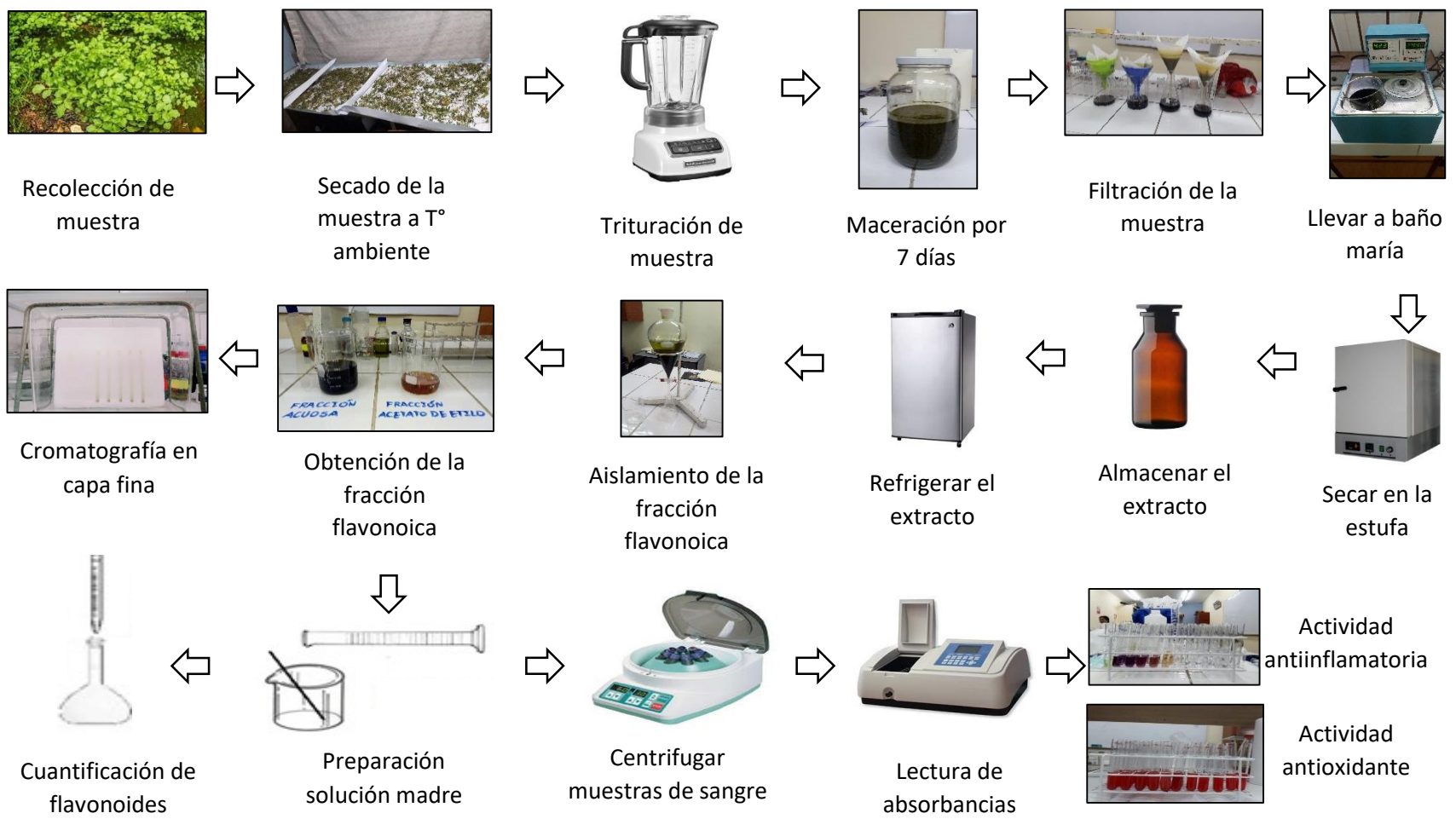
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3.000.

Anexo 25. Diagrama de flujo del espectrofotómetro ultravioleta (UV)



- 1 Muestra
- 2 Blanco de referencia
- 3 Detector de radiación
- 4 Amplificador de entrada
- 5 Amplificador de muestra
- 6 Sistema de lectura

Anexo 26. Flujograma de equipos para la determinación de la actividad antiinflamatoria y antioxidante *in vitro* de la fracción flavonoica aislada de las hojas secas de *Nasturtium officinale* R. Br. "berro" en el laboratorio de Farmacología. Ayacucho 2018.



Anexo 27. Matriz de consistencia. Ayacucho 2018.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLE	DISEÑO METODOLÓGICO
Actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i> de la fracción flavonoica aislada de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro". Ayacucho 2018.	¿Tendrá actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i> la fracción flavonoica aislada de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro"?	<p>Objetivo general Determinar la actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i> de la fracción flavonoica aislada de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro".</p> <p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Identificar los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro". • Cuantificar los flavonoides totales presentes en la fracción flavonoica de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro". • Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i> de la fracción flavonoica aislada de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro" a diferentes concentraciones 	<p>Hi: La fracción flavonoica aislada de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro" presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i>.</p> <p>Ho: La fracción flavonoica aislada de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro" no presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante <i>in vitro</i>.</p>	<p><i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro". Descripción botánica Hábitat y distribución Usos tradicionales Composición química Flavonoides. Clasificación Efectos farmacológicos Inflamación Inflamación aguda Inflamación crónica Mediadores de la inflamación Fármacos antiinflamatorios Antiinflamatorios no esteroideos Antiinflamatorios esteroideos Radicales libres y antioxidantes Método para evaluar la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>.</p>	<p>Variable independiente Fracción flavonoica aislada de las hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro". Indicador Extracto de 50, 100, 250, 500y 1000 µg/ml. Extracto de 100, 200, 300 y 400 µg/ml Variable dependiente: Actividad antiinflamatoria y antioxidante Indicador Porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos. Porcentaje de captación de radicales libres.</p>	<p>Tipo de investigación: Experimental. Población: hojas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro" que crece en los aldeaños del río Huatatas, del Distrito de San Juan Bautista, provincia de Huamanga. Muestra: 500 gramos de las hojas secas de <i>Nasturtium officinale</i> R. Br. "berro". Estándar: Hidrocortisona 100 µg/ml Trolox 100, 200, 300 y 400 µg/ml Métodos: Estabilización de la membrana de glóbulos rojos humanos Actividad secuestradora del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Análisis de datos: ANOVA Y HSD Tukey</p>

