

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los
compuestos fenólicos aislados de las hojas de
Rumex crispus L. "romaza". Ayacucho, 2012.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR LA:

Bach. DÍAZ VIVANCO, María Esther

AYACUCHO - PERÚ
2015

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D. N° 309 – FC de la S – UNSCH – 2015

Bach. María Esther DÍAZ VIVANCO

En la ciudad de Ayacucho, siendo las diez de la mañana del día Lunes veintiocho de diciembre del año dos mil quince, en el auditorio de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, reunidos los miembros del Jurado Calificador. Bajo la presidencia (e) del Mg. José Manuel Diez Macavilca con la Asistencia de los docentes: Q.F. Hugo Luna Molero, Mg. Maricela Lopez Sierralta (Secretaria Docente encargada) y Mg. Enrique Aguilar Felices (Asesor) quienes recepcionarán la Sustentación de Tesis: Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho 2012, presentado por la bachiller en Farmacia y Bioquímica; María Esther DÍAZ VIVANCO quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

El Presidente (e) luego de Verificar los documentos en Mesa, solicita a la secretaria (e) dé lectura al acto resolutivo de la Resolución Decanal N° 309 – FC de la S – UNSCH – 2015 de fecha 23 de diciembre del 2015, luego del cual cede la palabra a la sustentante para la exposición de su trabajo de investigación, posteriormente los miembros del Jurado Calificador, realizan a su turno las observaciones, aclaraciones y las preguntas que crean conveniente, para la evaluación correspondiente.

Luego el presidente (e) solicita a la sustentante y al público presente para que abandonen el auditorio dejando solos a los miembros del Jurado Calificador para que puedan deliberar y realizar la calificación correspondiente como sigue:

JURADO	TEXTO	EXPOSICIÓN	RESPUESTA	PROMEDIO
Mg. José DIEZ MACAVILCA	17	17	17	17
Q.F. Hugo LUNA MOLERO	18	17	17	17
Mg. Maricela LOPEZ SIERRALTA	17	17	17	17
Mg. Enrique AGUILAR FELICES	18	18	18	18
		PROMEDIO TOTAL		17

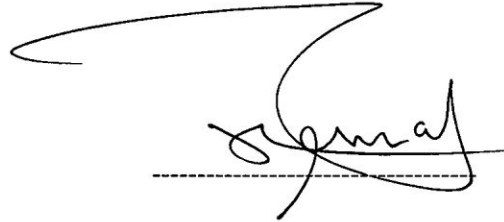
De la Evaluación realizada la sustentante, obtiene una calificación de DIECISIETE (17), de la cual dan fe los miembros del Jurado Calificador, estampando su firma al pie de la presente. Culmina el acto de la sustentación siendo las once y treinta de la mañana.



Mg. José DIEZ MACAVILCA

Presidente (e)

Miembro



Q.F. Hugo LUNA MOLERO

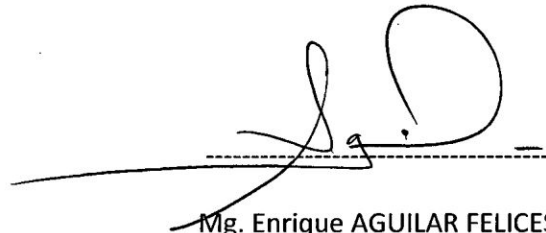
Miembro



Mg. Maricela LOPEZ SIERRALTA

Secretaria Docente (e)

Miembro



Mg. Enrique AGUILAR FELICES

Asesor

Miembro

A Dios, a mis padres y
hermanos.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma Mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de profesionales al servicio de la sociedad.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, en especial a los docentes de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica que hicieron posible mi formación profesional.

A mi asesor Mg. Q. F. Enrique Javier Aguilar Felices, por su colaboración desinteresada y valioso asesoramiento, que hizo posible el desarrollo y culminación de esta investigación.

Al Dr. Q.F. Johnny Aldo Tinco Jayo por la orientación que me dio para la culminación de mi tesis.

A todas las personas que apoyaron desinteresadamente la ejecución y culminación del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. <i>Rumex crispus</i> L. "romaza"	5
2.3. Compuestos fenólicos	6
2.4. Radicales libres (RL)	8
2.5. Daño celular producido por las Especies Reactivas de Oxígeno	9
2.6. Estrés oxidativo	10
2.7. Antioxidantes	10
2.8. Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos	11
2.9. La inflamación	11
2.10. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	12
2.11. Diclofenaco	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Ubicación	15
3.2. Población y muestra	15
3.3. Animales de experimentación	15
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	15
3.5. Determinación de la actividad antioxidante	15
3.6. Determinación de la actividad antiinflamatoria	15
3.7. Análisis de datos	20
IV. RESULTADOS	21
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	37
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
ANEXO	

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza"	5
Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza"	22
Tabla 3. Características de las reacciones químicas de la fracción de acetato de etilo que contienen a los compuestos fenólicos	23
Tabla 4. Características cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza"	24

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura química de un fenol	7
Figura 2	Estructura química del 2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides	7
Figura 3	Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos	11
Figura 4	Representación esquemática de la acción de los AINE, glucocorticoides (GC) e inductores de la expresión sobre la COX-1 y COX-2	13
Figura 5	Estructura molecular del diclofenaco	14
Figura 6	Reacción de la forma reducida del DPPH	18
Figura 7	Espectros de absorción UV-VIS de los compuestos fenólicos (Fracciones 1, 2 y 3) aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". Ayacucho, 2013	25
Figura 8	Espectros de absorción UV-VIS de los compuestos fenólicos (Fracciones 4 y 5) aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". Ayacucho, 2013	26
Figura 9	Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH <i>in vitro</i> por acción de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> "romaza" y los estándares. Ayacucho, 2013	27
Figura 10	Variación del volumen de inflamación en función del tiempo por efecto antiinflamatorio de los compuestos fenólicos. Ayacucho, 2013	28
Figura 11	Área bajo la curva (ABC) del volumen de inflamación a través del tiempo según tratamientos	29

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1	Certificado de clasificación botánica de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" 46
Anexo 2	Certificado del material biológico 47
Anexo 3	Flujograma de extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> "romaza" 48
Anexo 4	Recolección de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" 49
Anexo 5	Concentración de extracto etanólico de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" con el rotavapor 50
Anexo 6	Ensayo de catequinas y reacciones cualitativas del extracto etanólico de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". 51
Anexo 7	Equipo de extracción líquido-líquido 52
Anexo 8	Pruebas químicas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" 53
Anexo 9	Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados (I), quercetina (II) y ácido clorogénico revelados con luz UV. 54
Anexo 10	Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos revelados con cloruro férrico al 5% (I), hidróxido de potasio 5% (II) y DPPH (III) 55
Anexo 11	Cromatografía en capa fina a escala preparativa para aislar los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" 56
Anexo 12	Recuperación de las cinco bandas de la fracción de cetato de etilo. 57
Anexo 13	Cromatofolio que muestra las fluorescencias de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". 58
Anexo 14	Bandas recuperadas disueltas en metanol y filtradas (cinco bandas), para la lectura en el espectrofotómetro ultravioleta GENESYS 6. 59
Anexo 15	Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". 60
Anexo 16	Análisis de Varianza del porcentaje de captación del radical libre DPPH 61
Anexo 17	Evaluación de la actividad antiinflamatoria 62
Anexo 18	Variación del volumen de inflamación por efecto antiinflamatorio de los tratamientos en función del tiempo. 63
Anexo 19	Valores hallados de volúmenes de inflamación con el área bajo la curva (ABC) a través del programa SIMFIT. 64
Anexo 20	Porcentaje de inflamación en función del tiempo 65
Anexo 21	Análisis de varianza (ANOVA) de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos. 66

Anexo 22	Subconjuntos homogéneos por comparaciones múltiples de HSD de Tukey de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos.	67
Anexo 23	Comparaciones múltiples de Dunnett de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos.	68
Anexo 24	Comparaciones múltiples de Duncan de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos.	69
Anexo 25	Matriz de consistencia	70

RESUMEN

La inflamación es común en casi todas las enfermedades que implican daño celular donde los radicales libres están presentes. El objetivo fue determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", empleando la técnica *in vitro* del DPPH y el modelo *in vivo* de edema plantar inducido en ratas Holtzman. Se llevó a cabo en los laboratorios de la Escuela de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú. La muestra fue recolectada en el distrito de Chuschi, provincia de Cangallo, región Ayacucho. Se ensayó las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg usando como estándar diclofenaco. Los compuestos fenólicos aislados e identificados mediante pruebas químicas y espectrales fueron fenoles, flavonoides, catequinas y quinonas. La actividad antiinflamatoria expresada como área bajo la curva (ABC) fue de 7,97; 7,58; 6,88 y 6,78 ml/h correspondiente a los tratamientos con 50; 100; 200 mg/kg y diclofenaco. Respecto al porcentaje de actividad antioxidante *in vitro*, a las concentraciones de 10, 50 y 100 µg/ml de compuestos fenólicos se logró 68,6; 94,6 y 96,46% de actividad, respectivamente. Se concluye que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" tienen actividad antiinflamatoria *in vivo* y antioxidante *in vitro*, donde la dosis de 200 mg/kg muestra la mejor actividad antiinflamatoria estadísticamente similar al diclofenaco; y mayor porcentaje de actividad antioxidante a las concentraciones de 50 y 100 µg/ml similar a la quercetina y vitamina C. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. constituyen una fuente potencial para el tratamiento antiinflamatorio y antioxidante.

Palabras clave: Antioxidante, antiinflamatorio, *Rumex crispus* L., romaza.

I. INTRODUCCIÓN

El tema de los antioxidantes ha venido adquiriendo importancia singular en los últimos tiempos. Al existir una disminución de los niveles de antioxidantes o una inhibición de las enzimas antioxidantes se desencadena un estrés oxidativo, produciendo daño celular por la oxidación a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácido desoxirribonucleico. Estudios previos correlacionan el estrés oxidativo con la patogénesis de numerosas enfermedades como Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cáncer e infertilidad. Las sustancias antioxidantes desempeñan una función fundamental en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, por lo que es importante el consumo de sustancias antioxidantes no enzimáticas o la innovación de productos químicos enzimáticos que puedan lograr un efecto positivo en la salud del paciente.¹

De otro lado, la inflamación es común en casi todas las enfermedades que implican un daño microbiológico, químico o físico a tejidos vivos. En algunas de sus múltiples formas y manifestaciones, la inflamación se esconde tras la causa más importante de muerte en el mundo actual. Además, representa una característica permanente de muchas otras enfermedades que pueden no ser mortales, pero que, sin embargo, provocan grandes sufrimientos e incapacidad, que puede transcurrir hacia una situación crónica que suele dar lugar a enfermedades degenerativas como la artritis reumatoide, las cardiopatías reumáticas, acné, psoriasis, arteriosclerosis, enfermedades hepáticas, renales crónicas entre otras.²

A pesar de la potente acción antiinflamatoria que le es atribuida a los fármacos antiinflamatorios, estos compuestos presentan una alta incidencia de efectos adversos y algunos, incluso, no logran modular la inducción de ciertas citocinas proinflamatorias. Por esta razón una fuente importante de productos con interés farmacológico lo constituyen los productos naturales y en tal sentido, la búsqueda de principios activos con posible acción antiinflamatoria, ha estado

dentro de las prioridades de quienes investigan en este campo.³

Desde hace algunos años, tanto países altamente desarrollados como aquellos países subdesarrollados con escasos recursos económicos, han retomado y desarrollado el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos en lo que se ha llamado la Revolución Verde de la Medicina.⁴

Una gran variedad de especies vegetales de nuestro país presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, sin embargo, la mayoría no cuenta con información científica que avale estas propiedades. Por lo tanto, el presente proyecto de investigación se enfoca en el estudio de la especie vegetal *Rumex crispus* L. "romaza", utilizada en la medicina tradicional peruana; en patologías relacionadas con procesos inflamatorios.⁵

El contexto descrito, nos motivó a investigar dicha especie, enfocándonos en demostrar el objetivo general:

- Determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", haciendo uso de modelos *in vitro* e *in vivo* validados y de amplio uso en investigación.

Al mismo tiempo, nos hemos propuesto objetivos específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza".
- Aislar los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza".
- Determinar la concentración de compuestos fenólicos con mayor actividad antioxidante.
- Determinar la dosis de compuestos fenólicos con mayor actividad antiinflamatoria.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Maksimovic *et al.*⁶, evaluaron el potencial antioxidante de reducción férrica (FRAP), su actividad sobre radicales libres de DPPH y la influencia sobre la peroxidación lipídica en liposomas (LP) del extracto metanólico de los frutos de *Rumex crispus* L. Se observó una considerable actividad en todos los sistemas de prueba, pero más baja que la actividad del ácido ascórbico, la rutina y la quercetina, que se utiliza como sustancias de control positivo. Los efectos *in vivo* se evaluaron en varios sistemas antioxidantes hepáticos (actividades de LPX, GSH-Px, Px, CAT y XOD, así como el contenido de GSH). El pretratamiento con el extracto de *R. crispus* L. inhibe el estrés oxidativo inducido y aumenta el contenido de GSH en forma dosis dependiente.

Suh *et al.*⁷, evaluaron el bloqueo del oxígeno singlete y la protección de los sistemas biológicos de diferentes extractos de semillas de *Rumex crispus* L. En este trabajo fueron evaluados el efecto de eliminación de radicales libres (DPPH) y el contenido de compuestos fenólicos totales en extractos de las raíces de *Rumex crispus* L. Las extracciones con butanol y acetato de etilo demostraron un efecto notable frente a DPPH y protegen a los sistemas biológicos de efectos perjudiciales *in vitro*. Ambos extractos fueron los que más contenido de fenoles totales tuvieron.

Jimoh *et al.*⁸, determinaron el contenido de polifenoles antioxidantes y la actividad antibacteriana de los extractos acetónico, metanólico y acuoso. Las concentraciones de las diferentes clases de compuestos fenólicos son mayores en los extractos de acetona y metanol en comparación con los extractos de agua, lo que también se correlaciona con el contenido fenólico total. Las actividades antioxidantes de los extractos de acetona y metanol fueron evaluadas por tres métodos *in vitro* establecidos, esto es, 2,2-azinobis-(3-etil benzothiazoline-6-sulfónico) (ABTS), el 1,1-difenil-2- picrilhidrazil (DPPH), y el

poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). Los extractos mostraron actividad significativa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La fuerte actividad antibacteriana se encontró en la extracto de acetona, cuya actividad fue pronunciada sobre 7 de 10 cepas bacterianas utilizadas, con un valor de CMI (concentración mínima inhibitoria) de 2,0 mg/mL. Sin embargo, ninguno de los extractos inhibió a *Staphylococcus epidermidis* o *Salmonella pooni*. Los datos obtenidos en este estudio sugieren que *Rumex ecklonianus* puede ser un buen candidato para alimentos funcionales, así como para productos farmacéuticos a base de plantas. Este es el primer informe sobre la actividad biológica de *Rumex ecklonianus*.

Süleyman *et al.*⁹, investigaron los efectos gastroprotectores y anti-ulcerogénicos del extracto acuoso de las raíces de *Rumex patientia* L. (150 y 500 mg/Kg) en ratas, frente al control Nimesulida (100 y 300 mg/Kg). El número de úlceras por estrés inducidas por la administración de 150 mg/Kg de extracto fue idéntico a los del grupo de control. Sin embargo, en el grupo tratado con 500 mg/Kg, el número de úlceras por estrés disminuyó 1,9 veces y el tamaño de las áreas de ulceración disminuyó 1,1 veces.

Yildirim *et al.*¹⁰, evaluaron la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de *Rumex crispus* L. En este trabajo se utilizaron los extractos etéreo, etanólico y acuoso de las hojas y semillas. Solamente los extractos acuosos y etanólico mostraron actividad antioxidante. No hubo correlación estadísticamente significativa entre la cantidad de compuestos fenólicos y poder reductor ni entre la cantidad de compuestos fenólicos y el porcentaje de actividad de barrido de DPPH. De otro lado, los extractos etéreos de las hojas y las semillas y el extracto etanólico de las hojas han demostrado actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, ninguno de los extractos acuosos mostró actividad antimicrobiana frente a los microorganismos estudiados.

Süleyman *et al.*¹¹, evaluaron la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de las raíces de *Rumex patientia* L. (Polygonaceae) en animales de experimentación. Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se hicieron pruebas sobre edema inducido por carragenina, histamina, dextrano, formaldehído y serotonina, granuloma por pellets de algodón, y pruebas de Kabak en ratas. Encontraron que el extracto posee actividad antiinflamatoria. Estudios de toxicidad aguda revelaron que el extracto hasta una dosis de 3

mg/Kg por vía oral no fue tóxico.

2.2. *Rumex crispus* L. "romaza"

2.2.1. Clasificación taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Rumex crispus* L. "romaza"

Categoría	Clasificación
DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	POLIGONALES
FAMILIA	POLYGONACEAE
GÉNERO	Rumex
ESPECIE	<i>Rumex crispus</i> L.
N.V.	"romaza", "lengua de vaca".

Fuente: Certificado emitido por el Herbarium Huamangensis- 2012 (Anexo 1)

2.2.2. Descripción botánica

El género *Rumex* consta de unas 200 especies, la mayoría crece en las regiones templadas y en el Perú se conocen siete.¹²

Rumex crispus L. es una hierba perenne, de hasta 1,0 metro de alto. Raíz de tipo axomorfo, gruesa y profunda. Tallos erectos, poco ramosos. Hojas inferiores largamente pecioladas, oblongo-lanceoladas con el margen encrespado. Hojas superiores lanceoladas, cortamente pecioladas. Flores bisexuales en general agrupadas en panojas densas, estrechas, alargadas, desprovistas de hojas en la parte superior. Flores agrupadas en fascículos o pequeños grupos. Perigonio calicino, formado por seis tépalos ligeramente verdes herbáceos en dos verticilos más o menos iguales. Androceo compuesto de seis estambres libres, de filamentos cortos. Gineceo de ovario súpero tricarpelar, con estilos cortos, terminados en estigmas penicilados. Fruto aquenio trígono con estructuras membranosas aladas, reticuladas, anchamente ovadas o semicirculares, que derivan de los tres tépalos internos. Se propagan usualmente por medio de semillas.¹³

Rumex crispus L., crece en forma natural en los valles interandinos, generalmente de 2100 a 3000 msnm. Su hábitat son los bebederos naturales, borde de las acequias y riberas de los riachuelos durante la época de lluvia. *Rumex crispus* compite con otras especies del mismo género como: *Rumex acetosa*, *Rumex acetocella*, *Rumex obtusifolius*, entre otros, como también con otras plantas por espacio, suelo, nutrientes, agua y otros alimentos. Se hallan distribuidos en los departamentos de Ancash, Cuzco, Junín, Ayacucho a nivel de

Perú; en tanto que a nivel de Sudamérica se hallan distribuidos en Bolivia, Chile, Brasil, Uruguay; y a nivel de Europa, en España y Gran Bretaña.¹⁴

2.2.3. Usos tradicionales

Las hojas verdes bien molidas se emplean en cataplasma en el tratamiento de muchas dermatosis; en la curación de llagas o heridas. El agua de la maceración de las hojas, se emplea como astringente en ciertas afecciones oculares; las hojas cocidas, hechas ensalada, se venden en el departamento de Arequipa con el nombre de "zarzaparrilla" y se emplean en cocimiento, como depurativo; el cocimiento de la raíz, en baños contra la sarna.^{15, 16} El cocimiento de las raíces se usa como tónico y antiséptico.¹²

2.2.4. Composición química

Fan y Zhang¹⁷, realizaron los estudios sobre los componentes químicos de *Rumex crispus* L., donde lograron aislar e identificar, entre otros compuestos, beta-citosterol; crisofanol; emodina; crisofanol-8-O-beta-D-glucopiranosido; emodina-8-O-beta-D-glucopiranosido; ácido gálico; catequinas; camferol; quercetina; camferol-3-O-alfa-L-ramnopiranosido, quercetina-3-O-alfa-L-ramnopiranosido.

Baskan *et al.*¹⁸, llevaron a cabo el análisis de las antraquinonas farmacéuticamente importantes de la raíz de *Rumex crispus* L., logrando aislar 1,5-dihidroxi-3-metilantraquinona; 1,3,5-trihidroxi-6-hidroximetilantraquinona y 1,5-dihidroxi-3-metoxi-7-metilantraquinona por cromatografía electrocinética micelar, que a su vez resultó ser un método sencillo, rápido y reproducible.

Gunaydin y *et al.*¹⁹, reportaron tres 1,5-dihidroxi-antraquinonas y una antrona de las raíces de *Rumex crispus* L.

Demirezer *et al.*²⁰, aislaron un nuevo glicósido de antraquinona, emodina-6-O-beta-D-glucopiranosido, así como también un sencillo flavan-3-ol y una 6-clorocatequina, de las raíces de *Rumex patientia* L. junto con siete compuestos fenólicos conocidos. Sus estructuras fueron determinadas sobre la base de métodos espectroscópicos, demostrándose sus efectos citotóxicos y propiedades antirradicalarias.

2.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos están en la naturaleza ampliamente distribuidos en el reino vegetal, todos ellos presentan anillo aromático común (Figura 1) que puede estar unido a grupos hidroxilos libres y combinados en forma de éster, éter, heterósidos, etc., la formación de este núcleo aromático se realiza por vegetales

y microorganismos. Mientras que su presencia en animales se debe a la ingesta del vegetal.²¹

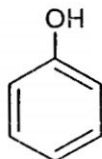


Figura 1. Estructura química de un fenol.²¹

2.3.1. Fenoles simples

Los fenoles simples como el catecol, guaiacol, floroglunisol, etc son poco frecuentes en la naturaleza, a excepción de los derivados quinónicos hidroxilados presentes en algunas familias (Rosáceas, Ericáceas, etc.) generalmente en forma de glucósido.²¹

2.3.2. Ácidos fenoles

Bajo este término se engloba a todos los compuestos orgánicos que tienen al menos una función carboxílica y un grupo hidroxilo fenólico; sin embargo en la práctica habitual esta denominación queda reservada para derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico.²¹

2.3.3. Flavonoides

Son compuestos fenólicos, responsables de la coloración de flores y frutos, por lo tanto "guías de néctar". Tienen como núcleo básico al 2-fenilbenzopirona. Farmacológicamente son antioxidantes (por quelación de metales), acción antiespasmódica, antiinflamatoria, anticoagulante indirecto de la sangre, acción diurética, antiedematoso, hipocolesterolemiante.²²

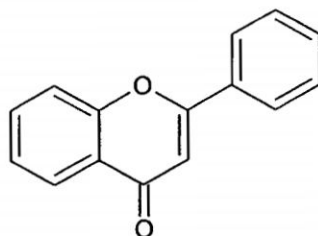


Figura 2. Estructura química del 2-fenilbenzopirona, núcleo básico de los flavonoides.²²

2.3.4. Taninos

El término "tanino" fue introducido por Seguin en 1796 para designar a ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con las proteínas de la piel, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Estas

sustancias tienen además otras propiedades comunes, como las de dar reacción con cloruro férrico, reducir el permanganato potásico y precipitar con gelatina. Las dos primeras señalan ya su carácter fenólico. Se distinguen desde la antigüedad, en los vegetales superiores, dos grupos de taninos diferentes por su origen biosintético: taninos hidrolizables y taninos condensados.²¹

2.3.5. Quinonas

Las quinonas naturales son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro. Se encuentran frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz y en algunos casos en las hojas, donde su color está enmascarado por otros pigmentos. Para un mejor estudio, las quinonas se subdividen en benzoquinonas, antraquinonas y quinonas isoprenoides. Ellas además pueden contener diversos grupos funcionales, anillos de furano o pirano, encontrarse como dímeros, ser parcialmente reducidas como los antranoles y antronas, etc.²³

2.4. Radicales libres (RL)

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado, por lo que son muy reactivos, y tienen alta inestabilidad ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que lo pierde se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena, ésta condición química los hace muy inestables; de vida efímera; extraordinariamente reactivo. Debido a que estas especies reactivas no poseen receptores específicos, tienen una capacidad de agresión indiscriminada sobre células y tejidos vivos.²⁴

Los principales RL que se originan son los derivados de la respiración aerobia y se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS), cuya principal fuente son las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, la membrana nuclear citoplasmática y del retículo endoplásmico, lo cual puede conducir a mutación y muerte celular.²⁴

2.4.1. Formación de los radicales libres

a) Fuentes endógenas: Los radicales libres son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Al elevarse

las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden acarrear importantes alteraciones funcionales.²⁵

b) Fuentes exógenas: los radicales libres se producen como respuesta a la contaminación ambiental, radiación ionizante, luz ultravioleta, ciertas drogas, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, reactivos, solventes industriales, componentes del tabaco, hiperoxia, algunas enfermedades como: diabetes, procesos inflamatorios, fenómenos de isquemia.²⁵

2.4.2. Especies reactivas del Oxígeno (ERO)

Las ERO son moléculas muy reactivas, tiene una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio que se forman. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido reducción.^{26, 27}

Entre las ROS se encuentran:

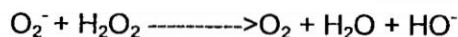
Anión superóxido (O₂⁻), se forma partir de la captación de un electrón por una molécula de oxígeno.²⁶



Peróxido de hidrógeno (H₂O₂), se forma cuando el radical libre superóxido capta dos protones.²⁶



Radical hidroxilo (OH[·]), es la ROS más potente, puede dañar a casi todas las moléculas que se encuentran en las células vivas, inicia una cadena de reacciones, aparece cuando el peróxido de hidrógeno se une al superóxido.²⁶



Oxígeno singlete (¹O₂), especie química ubicua que puede ser formado por absorción directa de radiación, por fotólisis (destrucción por acción de la luz) del ozono en aire contaminado, por irradiación de O₂⁻ o secundariamente a la excitación del óxido de nitrógeno, luego de la energía radiante.²⁷

2.5. Daño celular producido por las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

a) Lípidos: Se produce un mayor daño, ya que afecta la estructura de ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad celular, produciendo edema y muerte celular. Este daño puede desencadenarse por el oxígeno, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo que es el más dañino, una vez que se inicia este proceso toma forma de cascada, con producción de radicales libres que son los responsables de los efectos citotóxicos.²⁶

b) Proteínas: Hay oxidación de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina, metionina, estos son susceptibles al daño del radical hidroxilo y como resultado final puede producir lisis celular.²⁶

c) Ácido desoxirribonucleico (ADN): Los radicales OH y O₂⁻ causan cambios conformacionales, alteración de bases, ruptura de una de las dobles cadenas y pérdida de nucleótidos, presentando una mutación antes de la replicación. Estos radicales pueden atacar tanto purinas como pirimidinas.²⁸

2.6. Estrés oxidativo

La exposición de la materia viva a diversas fuentes producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno.²⁹

El estrés oxidativo es un estado de la célula, en la cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción (balance entre prooxidantes y antioxidantes) intracelular que reúne lesiones de muchos tipos de procesos de enfermedad. Esta alteración se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), conduciendo a daño celular.²⁴

2.7. Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales oxidables. Bajo condiciones fisiológicas, el organismo puede prevenir el daño producido por las especies oxidantes, a través de mecanismos de protección que incluye elevar los niveles intracelulares de defensas antioxidantes.³⁰

2.7.1. Antioxidantes endógenos

Son los sistemas antioxidantes que se producen dentro del organismo para combatir la acción de los radicales libres. Se clasifican en enzimáticos (superoxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa) y no enzimáticos (glutatión, melatonina, estógenos, ácido úrico, albúmina)^{26, 28}

2.7.2. Antioxidantes exógenos

Útiles cuando el sistema endógeno se satura, capturan los radicales libres evitando la reacción en cadena, este proceso se obtiene mediante la dieta. Dentro de estos antioxidantes encontramos a la vitamina C, vitamina E, carotenoides y compuestos fenólicos.²⁵

2.8. Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, está relacionado con su estructura química, debido a la presencia de grupos hidroxilo y a su estructura aromática. Los compuestos fenólicos, actúan como donadores de hidrógeno o electrones, al ceder un electrón al radical libre, la molécula se queda con un electrón desapareado, que se estabiliza gracias a la deslocalización de los dobles enlaces, actúan como agentes reductores que evitan la reacción oxidante atrapando a las ROS antes que causen daño. Actúan también como prooxidantes, quelando metales de manera que mantienen o incrementan su actividad catalítica o bien reduciendo metales.²⁴

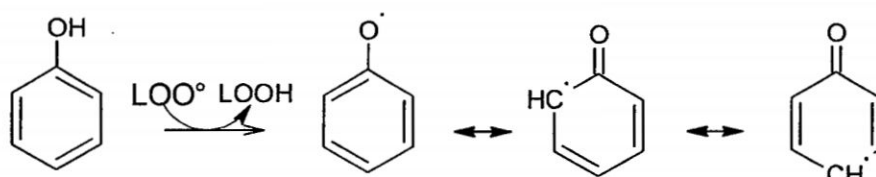


Figura 3. Mecanismo antioxidante de los compuestos fenólicos.²⁴

2.9. La inflamación

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular (por ejemplo; los microorganismos patógenos y las toxinas) y de las consecuencias de la misma (por ejemplo; las células y restos tisulares necróticos). Si no existiera el proceso de inflamación; las infecciones se propagarían de forma incontrolada, las heridas no se curarían nunca y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente.²

2.9.1. Signos clínicos de la inflamación

Fue Celsius, un escritor romano del siglo I después de Cristo, el primero que descubrió los cuatro signos cardinales de la inflamación: rubor (enrojecimiento), tumor, calor, y dolor. Posteriormente Virchow añadió el quinto signo clínico: pérdida de la función.

El dolor, es producido por muchos estímulos, que se clasifican en mecanismos térmicos y químicos, los cuales son captados por terminaciones libres. El tumor, es debido a la exudación en el foco inflamatorio y acúmulo de elementos uniformes, proceso que tiene como base un aumento de la permeabilidad capilar. El rubor y calor, es debido a la hiperemia (aumento de la vascularización). Y la alteración funcional, se da como consecuencia de la tumefacción y del dolor.²

2.9.2. Pasos del proceso inflamatorio

Inicia con la dilatación de los capilares, arteriolas locales, esto produce un exceso de flujo sanguíneo local, además la vasodilatación es provocada por numerosos mediadores químicos producidos por la célula del tejido circundante entre ellos: la histamina, ciertas prostaglandinas (PGE_2 , PGI_2 , PGE_1) y el factor activador de plaquetas. Otro fenómeno que ocurre es el aumento de la permeabilidad de las paredes de las vénulas poscapilares locales, lo que favorece al paso de un volumen de líquido a los espacios intersticiales. Al intersticio ingresan grandes cantidades de agua, fibrinógeno, inmunoglobulinas. El paso de proteínas aumenta la presión oncótica y la salida de agua lo que clínicamente provoca el edema que se localiza en el área de la lesión y el aumento de la permeabilidad vascular se favorece por acción principalmente de la histamina y las prostaglandinas PGE_2 y PGI_1 .³¹

2.9.3. Tipos de inflamación

- **Inflamación aguda.**- Es de duración corta, se inicia muy rápidamente, se caracteriza por el exudado de fluido plasmático y se produce la acumulación de neutrófilos, hay vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar.³¹
- **Inflamación crónica.**- Sucede cuando el estímulo inflamatorio es persistente lo que puede ocasionar destrucción del tejido o pérdida de la función del órgano afectado. El infiltrado de las células inmunes típico de la inflamación crónica está compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.³²

2.10. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos de esta categoría incluyen muy diversos compuestos que casi nunca tienen relación química alguna (aunque casi todos son ácidos orgánicos), pero que comparten algunas actividades terapéuticas y efectos colaterales. El compuesto prototípico sería el ácido acetilsalicílico (aspirina) y en algunos señalamientos se les conoce como "fármacos similares a aspirina", pero el nombre más usado es el de antiinflamatorios no esteroideos (NSAID).³³

2.10.1. Mecanismo general de acción

Los principales efectos terapéuticos y muchas de las reacciones adversas de los AINE pueden explicarse por su efecto inhibitorio de la actividad de las ciclooxigenasas, enzimas que convierten el ácido araquidónico que se encuentra en las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables, los cuales se transforman en prostaglandinas (PG) y tromboxanos. Algunos de estos

eicosanoides participan, en grado diverso, en los mecanismos patógenos de la inflamación, el dolor y la fiebre, por lo que la inhibición de su síntesis por los AINE sería responsable de su actividad terapéutica, aunque, dada su participación en determinados procesos fisiológicos, dicha inhibición sería también responsable de diversas reacciones adversas características de estos fármacos. Es preciso destacar que los eicosanoides son sólo una parte de los mediadores celulares involucrados en la modulación de una determinada función o proceso patológico y que los AINE no inhiben el conjunto de la cascada biosintética que tiene su origen en el ácido araquidónico (p. ej., no afectan la actividad enzimática de las lipoxigenasas que originan leucotrienos y HPETE, ni otras vías no enzimáticas que dan lugar a los isoprostanos). Se comprende así la limitación que poseen estos fármacos en el control de procesos caracterizados por la intervención de numerosos mediadores.

El descubrimiento de la existencia de, al menos, dos isoformas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), con localizaciones y funciones diferentes, ha abierto nuevas perspectivas terapéuticas mediante el diseño de AINE que afecten selectivamente una u otra isoforma. COX-1 tiene características de enzima constitutiva, y su actividad tiene que ver con la participación de las PG y tromboxanos en el control de funciones fisiológicas. En cambio, la COX-2 tiene características de enzima inducible, en determinadas células, bajo circunstancias patológicas (p. ej., en macrófagos, monocitos, células endoteliales y sinoviales en el curso de un proceso inflamatorio) por el concurso de diversas citocinas y mediadores de la inflamación.³⁴

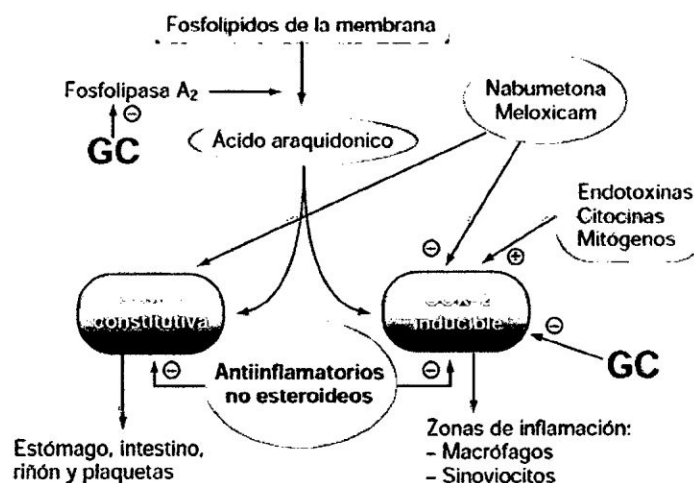


Figura 4. Representación esquemática de la acción de los AINE, glucocorticoides (GC) e inductores de la expresión sobre la COX-1 y COX-2.³⁴

2.11. Diclofenaco

2.11.1. Descripción

El diclofenaco posee actividades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Es un inhibidor de la ciclooxigenasa y su potencia es sustancialmente mayor que la de la indometacina, el naproxeno y otros medicamentos. Además disminuye las concentraciones intracelulares de ácido araquidónico libre, en leucocitos, tal vez al modificar la liberación o captación de dicho ácido graso.³³

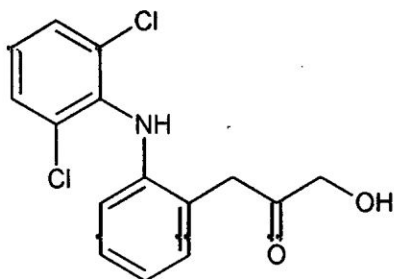


Figura 5. Estructura molecular del diclofenaco.³³

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacognosia y Farmacología de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Región Ayacucho, Perú.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" que crecen en el distrito de Chuschi, provincia de Cangallo, Región Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Un Kg de hojas secas de *Rumex crispus* L. "romaza"

3.2.3. Tipo de muestreo: Por conveniencia, no probabilístico.

3.3. Animales de experimentación

25 ratas albinas de la cepa Holtzman de pesos entre 180 a 200 g, en buen estado de salud, adquiridos del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Lima. (Anexo 2)

3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos

3.4.1. Recolección de la muestra

El procedimiento para la recolección, selección y secado de las muestras se realizó de acuerdo a los procedimientos establecidos por Villar del Fresno.²¹ Se seleccionó las hojas intactas (Anexo 4); se lavó con abundante agua y se secó a la sombra, en una habitación ventilada, sobre papel periódico, aproximadamente por una semana, después se trituró con un molino.

3.4.2. Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L "romaza"

Un Kg de muestra seca y molida se maceró en frascos de color ámbar por un periodo de una semana en 9 litros de alcohol de 96° cuyo volumen cubrió la

muestra. Durante el proceso se agitó mecánicamente el frasco, para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se procedió a filtrar, concentrar en un rotavapor y luego en una estufa a 40°C, hasta obtener un extracto de consistencia blanda. (Anexo 5)

3.4.3. Ensayo fitoquímico cualitativo

La identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios se realizó mediante ensayos de coloración y precipitación, siguiendo los procedimientos de Miranda y Cuellar.³⁵ (Anexo 6)

3.4.4. Extracción de compuestos fenólicos

El extracto etanólico seco se reconstituyó con agua destilada y se trató con 300 ml de éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que puedan interferir con la extracción de los compuestos fenólicos. La extracción líquido-líquido se realizó con 300 ml de acetato de etilo en un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo donde se encuentra los compuestos fenólicos.³⁶

3.4.5. Identificación de compuestos fenólicos

Pruebas cualitativas

- Reactivo de cloruro férrico: Se añadió unas gotas de cloruro férrico sobre la fracción de acetato de etilo.³⁵
- Shinoda.³⁵
- Bornträger.³⁵ (Anexo 7)

Cromatografía en capa fina (CCF)

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: Butanol: Ácido acético: Agua (4:1:5)
- Volumen de inyección: 20 µl
- Revelador: Luz ultravioleta, cloruro férrico, hidróxido de potasio y DPPH

La fracción de acetato de etilo se disolvió en 1 ml de metanol y mediante un capilar de vidrio se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica previamente activada (fase estacionaria), se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente butanol: ácido acético: agua (4:1:5)²³ no sobrepase a la muestra aplicada y dejando que el líquido ascienda por capilaridad. Posteriormente se procedió sacar a la placa cromatográfica,

teniendo en cuenta que el solvente haya llegado hasta los 2 cm de la parte superior de la placa, se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se observó en la lámpara UV CAMAG (Anexo 8), finalmente se reveló con cloruro férrico al 5%, hidróxido de potasio al 5% y DPPH; y se observó la presencia de manchas (Anexo 9)

3.4.6 Aislamiento de los compuestos fenólicos

Se realizó por cromatografía en capa fina a escala preparativa, para el cual se siguió el:

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 5 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)

La siembra de la fracción de acetato de etilo se realizó en bandas con el propósito de aislar los compuestos fenólicos, los cuales se evidenciaron en la luz ultravioleta. Estas bandas fueron recuperadas, disueltas en metanol y filtradas; obteniéndose 5 bandas.

Pruebas espectrales

Las bandas obtenidas fueron leídas en el espectrofotómetro ultravioleta GENESYS 6, en el rango de 200 a 400 nm, registrándose los máximos picos de absorción para su posterior identificación.

3.5. Determinación de la Actividad Antioxidante

Método: Actividad Secuestradora del Radical DPPH

Fundamento: El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa. Se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre en toda la molécula, de manera que las moléculas no dimerisen, como en el caso de la mayoría de otros radicales libres. La deslocalización también da lugar a un color violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción en solución de etanol a aproximadamente 520 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de este color violeta.³⁷

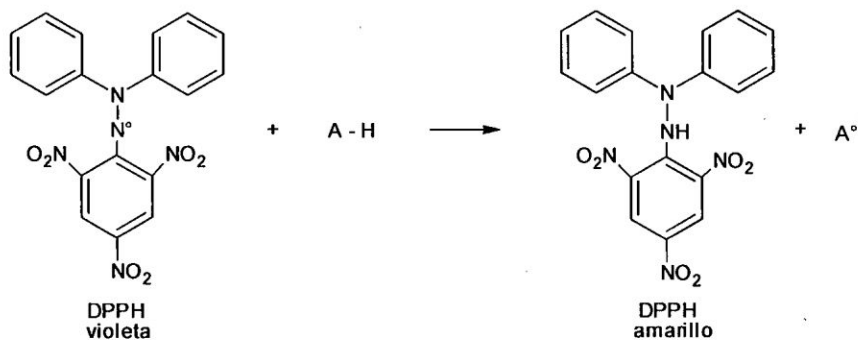


Figura 6. Reacción de la forma reducida del DPPH.³⁷

Procedimiento:

Para el ensayo se utilizó lo siguiente:

- Una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l.
- Una solución metanólica del extracto a una concentración de 300 µg/ml (solución A).
- Una solución blanco de metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- Un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) más 1,5 ml de metanol.
- Un patrón de referencia con 1,5 ml de DPPH más 0,75 ml de agua destilada.
- La muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml.
- Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 para obtener una solución final de 50 µg/ml (solución B) y luego en una proporción de 1:9, para obtener una concentración final de 10 µg/ml (solución C).
- Con la solución B y C se procedió igual que el anterior.
- Para la comparación, el estándar Vitamina C y Quercetina, se preparó siguiendo el mismo procedimiento que conlleva a lograr concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.

Para los cálculos del porcentaje de actividad antioxidante se empleó la siguiente fórmula:

$$AA\% = \frac{Ac - (Am - Ab)}{Ac} \times 100$$

Dónde:

AA%: Porcentaje de actividad antioxidante.

Ac: Absorbancia del DPPH.

Am: Absorbancia de la muestra.

Ab: Absorbancia del blanco.

3.6. Determinación de la actividad antiinflamatoria

Método del edema plantar inducida por carragenina

Fundamento: Consiste en la administración subcutánea de una pseudosolución de carragenina, extraída de las algas marinas *Chondrus crispus* a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatorio agudo mediado por la liberación de diversos autacoides generando edema, eritema, dolor.³⁸

Procedimiento:

- Preparación de la muestra: Se diluyó 2 g de los compuestos fenólicos en 100 ml de carboximetilcelulosa al 0,1%, obteniéndose una concentración del 2%.
- Preparación de carragenina: La suspensión de carragenina al 1% (Laboratorios SIGMA), fue preparado por disolución de 1 g de carragenina en 100 ml de carboximetilcelulosa al 0.1%.
- Preparación de estándar: Se diluyó tres tabletas de diclofenaco (150 mg) en 50 ml de carboximetilcelulosa al 0.1%.
- Las 25 ratas fueron divididos en 5 grupos: primer grupo (blanco), segundo grupo (estándar), tercer grupo, cuarto grupo y quinto grupo (compuestos fenólicos), los cuales estuvieron en ayunas previo al experimento.
- Cada rata fue marcada con plumón marcador.
- La administración de la muestra problema y el estándar fue por vía oral a través de una sonda adaptada por un medidor de volumen.
- A todos los grupos se le administró 0,1 ml de carragenina, después de 30 minutos de administrar la muestra y el estándar en el tejido subplantar de la pata posterior derecha de la rata.
- La medición del volumen de la pata se realizó utilizando un pletismómetro desde el tiempo cero y cada 60 minutos hasta 5 horas.

Técnicas de medición:

- Preparar el pletismómetro manual.
- Enrazar con agua a la altura de la marca de la jeringa.

- Sumergir la pata inflamada en la jeringa hasta coincidir con la marca de la pata y la jeringa superior.
- Retirar el animal y medir el volumen desplazado en la jeringa inferior.

El cálculo del porcentaje de inflamación se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inflamación} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Dónde:

V_T = Volumen de la pata inflamada en un tiempo "x"

V_0 = Volumen de la pata normal.

Diseño experimental

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 5 ratas, y tratados vía oral de la siguiente manera:

- Grupo I: Control o Blanco, al cual se le administró carboximetilcelulosa al 0,1% y 30 minutos después se inyectó carragenina (0,1 ml) al 1%.
- Grupo II: Estándar, al cual se le administró diclofenaco 20 mg/kg y 30 minutos después se inyectó 0,1 ml de carragenina al 1%.
- Grupo III, IV, V: Se administró 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg de los compuestos fenólicos en carboximetilcelulosa al 0,1% y 30 minutos después se les inyectó 0,1 ml de carragenina al 1%.

3.7 Análisis de datos

Los resultados de la actividad antioxidante se representaron en forma de gráficos en función de las medias. Las diferencias entre las medias fueron contrastadas mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos de la actividad antiinflamatoria se representaron mediante gráficos y cuadros, para ello se halló el área bajo la curva (ABC) del volumen en función al tiempo, utilizando el programa SIMFIT. Con los valores del ABC (Volumen/tiempo), se halló la media de cada uno de los tratamientos y se representó en forma de gráficos de barras de error. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante el ANOVA. Además se hicieron las pruebas de Tukey, Dunnet y Duncan.

IV. RESULTADOS

Tabla 2. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.

Metabolito secundario	Ensayo	Resultado	Observación
Catequinas	Catequina	+++	Coloración verde carmelita a la luz UV
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	++	Fase amilica de color naranja
Quinonas	Borntrager	+++	Fase amoniacal de color rojo
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado rojo
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	++	Coloración verde oscura
Saponinas	Espuma	+++	Formación de espuma
Alcaloides	Dragendorff	+	Hay opalescencia
	Wagner	+	
	Mayer	+	

(+): Escaso (++) : Regular (+++) : Abundante

Tabla 3. Características de las reacciones químicas de la fracción de acetato de etilo que contiene los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.

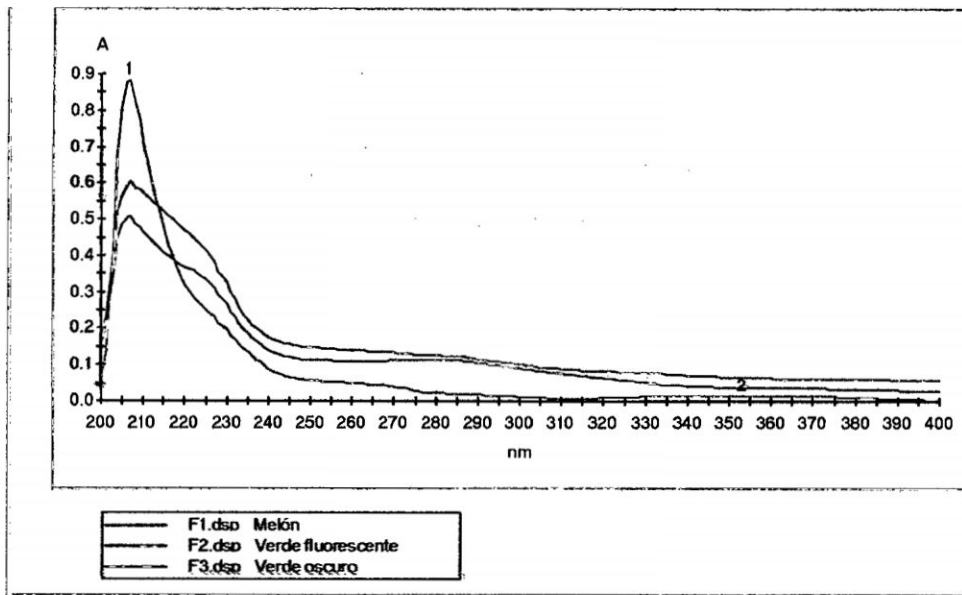
Ensayo	Resultado	Características
Cloruro férrico 5%	+++	Verde oscuro
Shinoda	++	Naranja
Bornträger	+++	Rojo

(+): Escaso, (++) : regular, (+++) : abundante

Tabla 4. Características cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" y de los estándares de referencia. Ayacucho – 2013.

Fracción	Revelador			
	Fluorescencia	FeCl ₃	K(OH)	DPPH
Acetato de etilo	melón	marrón	anaranjado	amarillo
	verde fluorescente	verde	amarillo	amarillo
	verde oscuro	marrón	amarillo	amarillo
	naranja	amarillo	rojo	amarillo
	marrón	verde	amarillo	amarillo
Quercetina	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Ácido clorogénico	celestes	amarillo	amarillo	amarillo

*: estándares de referencia



F1.dsp Melón

 Maxima Threshold: 0.01 A
1 207 nm; 0.508 A

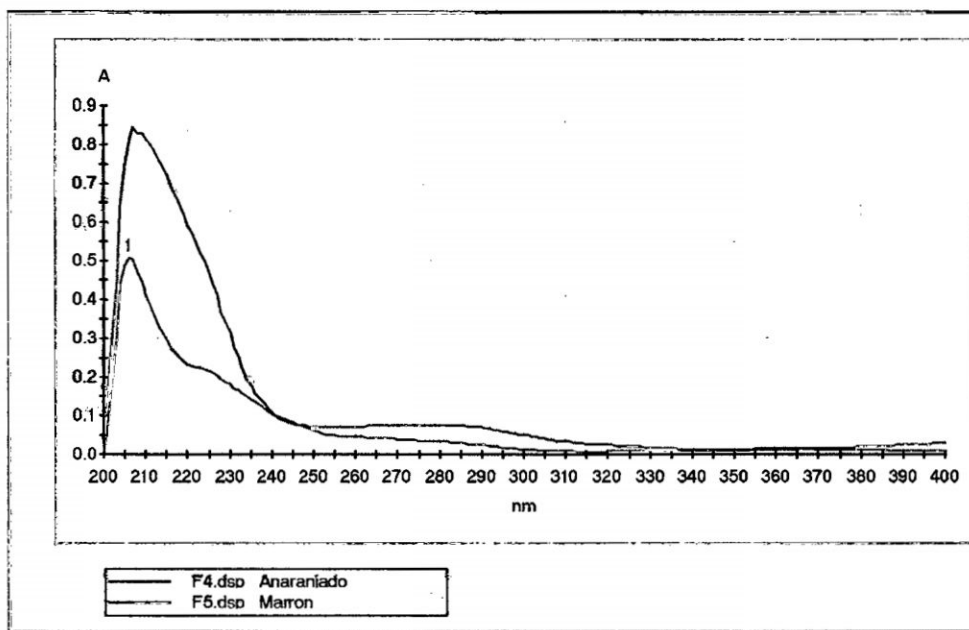
F2.dsp Verde fluorescente

 Maxima Threshold: 0.01 A
1 207 nm; 0.604 A

F3.dsp Verde oscuro

 Maxima Threshold: 0.01 A
1 207 nm; 0.884 A 2 353 nm; 0.015 A

Figura 7. Espectros de absorción UV-VIS de los compuestos fenólicos (Fracciones 1, 2 y 3) aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho - 2013.



F4.dsp Anaranjado

Maxima Threshold: 0.01 A
1 207 nm; 0.844 A

F5.dsp Marron

Maxima Threshold: 0.01 A
1 206 nm; 0.509 A

Figura 8. Espectros de absorción UV-VIS de los compuestos fenólicos (Fracciones 4 y 5) aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho - 2013.

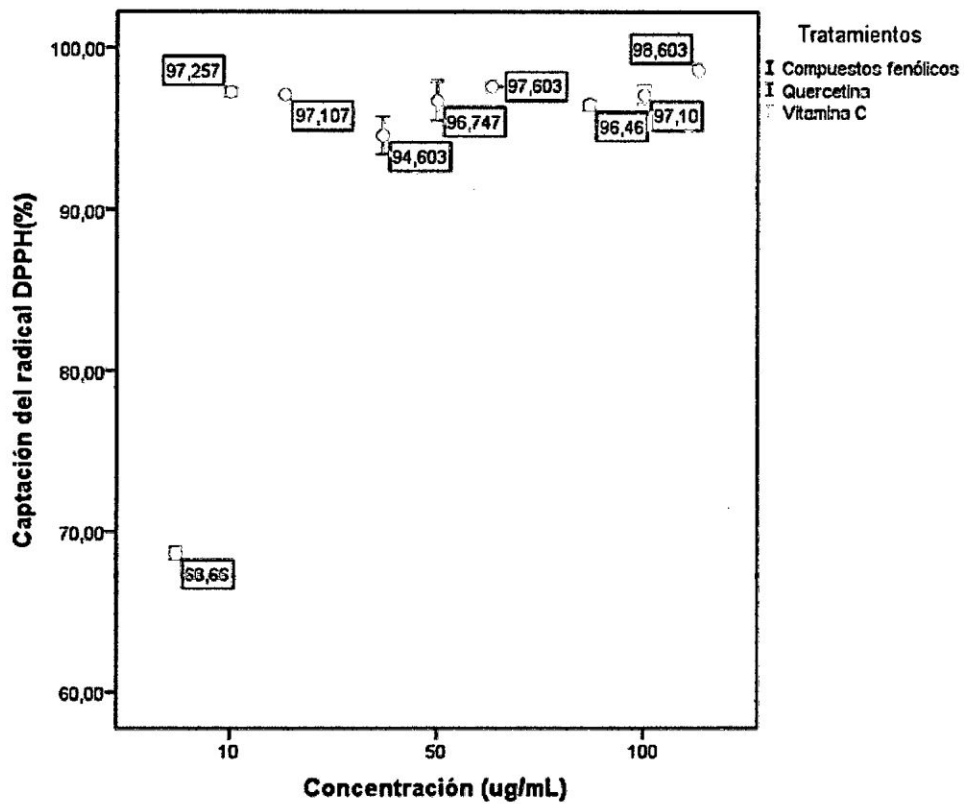


Figura 9. Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH *in vitro* por acción de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* "romaza" y los estándares. Ayacucho - 2013.

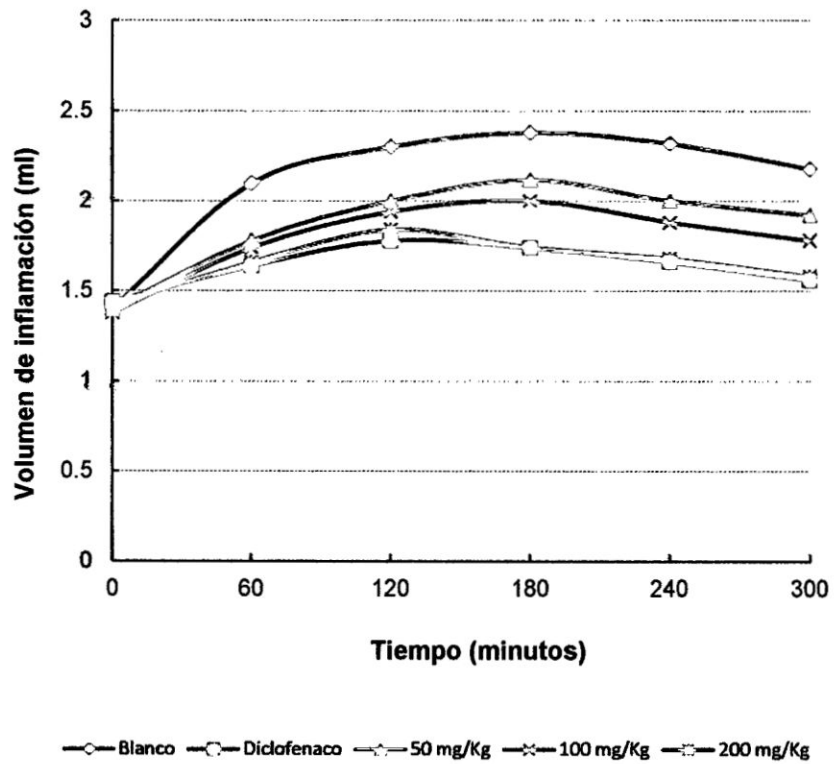


Figura 10. Variación del volumen de inflamación en función del tiempo por efecto antiinflamatorio de los compuestos fenólicos. Ayacucho - 2013.

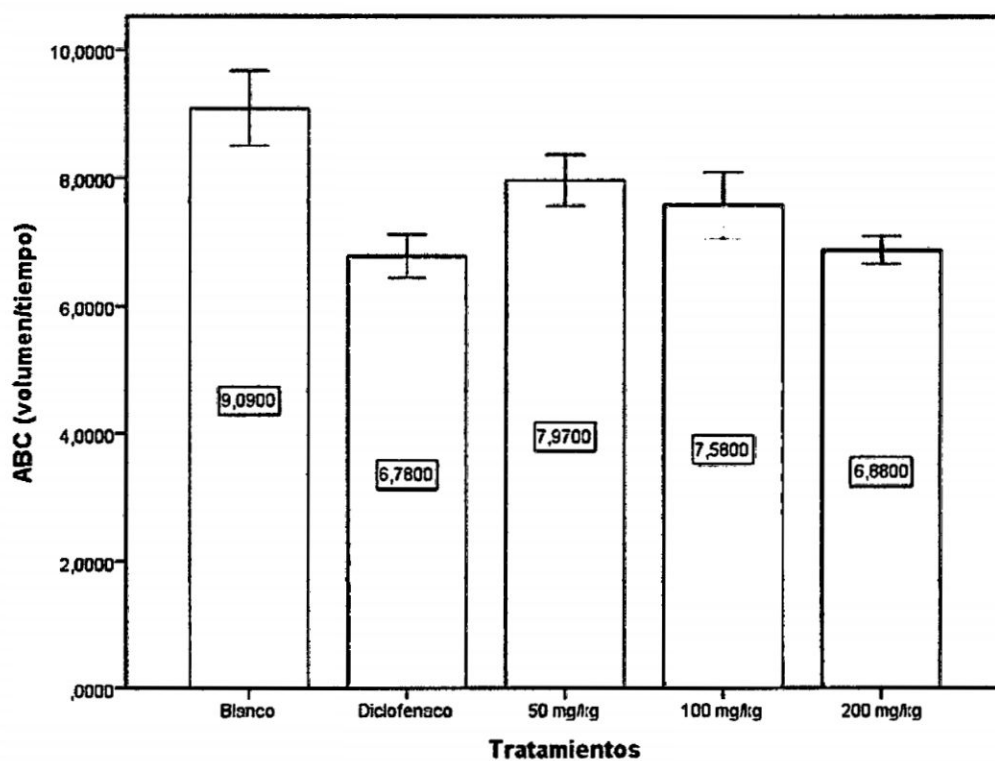


Figura 11. Área bajo la curva (ABC) del volumen de inflamación a través del tiempo según tratamientos de los compuestos fenólicos aislados. Ayacucho – 2013.

V. DISCUSIÓN

La identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", se desarrolló según la técnica de Miranda y Cuellar³⁵, permitiéndonos observar la presencia del grupo de compuestos fenólicos en general, valorándose su presencia como abundante (Tabla 2 y Anexo 6).

En las características de las reacciones químicas de la fracción de acetato de etilo que contiene los compuestos fenólicos (Tabla 3 y Anexo 8) fueron diferenciadas por las pruebas de cloruro férrico al 5%, Shinoda y Bornträger. En la prueba química con FeCl_3 al 5% se produjo un color verde oscuro, identificándose presencia de compuestos fenólicos en abundante concentración. En la prueba con Shinoda la fase amílica se colorea de naranja, lo cual indica la presencia de flavonoides en regular cantidad. En la prueba con Bornträger la fase superior se colorea de rojo, lo que indica la presencia de quinonas en abundante concentración, especialmente de las antraquinonas libres.²³

En la Tabla 4 y Anexo 9, se observa la presencia de fluorescencia de color melón, verde fluorescente, verde oscuro, naranja y marrón a la luz del espectro ultravioleta, indica que se trata de compuestos fenólicos. Cuando se revela a la misma placa con cloruro férrico al 5%, hidróxido de potasio al 5% y DPPH (Anexo 10), se observan manchas de color marrón, verde, amarillo y rojo respectivamente a la luz visible. En caso de la parte revelada con cloruro férrico se observan manchas de color marrón, verde y amarillo; dichas manchas indican la presencia de fenoles. En la parte revelada con hidróxido de potasio al 5% se observan manchas de color rojo, amarillo; dicho color de manchas indican la presencia de antronas y antraquinonas.²³

Las Figuras 7 y 8, muestran los cromatogramas de los espectros UV obtenidos para cada una de las bandas aisladas de los cromatofolios (Anexo 11). Dichos cromatogramas muestran las 5 bandas (F1, F2, F3, F4 y F5). Las fracciones F1 y

F2, de acuerdo con las lecturas realizadas, muestran picos máximos de absorción en el rango de 206 a 207 nm. Si bien la extracción líquido – líquido con acetato de etilo es una técnica empleada para la extracción de compuestos fenólicos en general, los compuestos aislados en este estudio corresponderían a dicho grupo de compuestos por dar positivo a la reacción de FeCl₃ 5% (Anexo 8), pero no corresponderían a flavonoides por los resultados espectrales hallados puesto que se sabe que los espectros de absorción UV-VIS de los flavonoides típicamente consisten de dos máximos de absorción en los rangos 240-285 nm y 350-550 nm.²³ La fracción 3 (F3) muestra picos máximos de absorción en el rango de 207 y 353 nm, este segundo pico entonces correspondería a un compuesto fenólico del tipo flavonoide, ya que se mencionó que el rango de los flavonoides va desde 350-550nm. Y según los valores que se mencionan en el libro de Lock de Ugaz, la F3 correspondería a los flavonoles ya que su rango va desde 350 a 385 nm. En las fracciones F4 y F5 también se observan picos máximos de absorción a 207 y 206 nm respectivamente.²³

En primera instancia se ha desarrollado el ensayo de la actividad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", en vista de que es muy ampliamente conocido que los radicales libres juegan un papel muy importante en los procesos inflamatorios. En este sentido, la actividad antioxidante se determinó midiendo la reducción del radical libre DPPH.

En la Figura 9, podemos apreciar gráficamente el porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH *in vitro* por acción de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. Es evidente el alto porcentaje de actividad antioxidante de dichos compuestos de manera concentración dependiente, incluso comparables con las sustancias de referencia quercetina y ácido ascórbico, cuya naturaleza química y perfil antioxidante son conocidos ampliamente. La actividad captadora de los compuestos de prueba y los estándares se expresó en términos de la concentración necesaria para disminuir la absorción inicial de DPPH en 50% (IC₅₀), siendo que a las concentraciones de 50 y 100 µg/ml de compuestos fenólicos se logró 94,6 y 96,46% de actividad, respectivamente, muy similar a las mismas concentraciones de quercetina con 96,7 y 97,10 %, respectivamente, incluso frente al ácido ascórbico con 97,6 y 98,6%. Los compuestos fenólicos a una concentración de 10 µg/ml, a su vez, mostraron un porcentaje de actividad

antioxidante relativamente importante con 68,6%. Esta prueba preliminar de la actividad antioxidante *in vitro* realizada nos orienta en cierta medida para ensayos experimentales *in vivo* posteriores.

La bibliografía recoge diversas referencias sobre la actividad de sustancias fenólicas, principalmente flavonoides, dentro de las que destaca la actividad antiinflamatoria. Los compuestos bioactivos derivados de plantas pueden ejercer sus efectos ya sea por el incremento de enzimas antioxidantes, disminución de peróxidos lipídicos y/o modulación de vías que conlleven al daño celular, entre otros. En base a evidencias que respaldan lo anterior, se busca alternativas a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), debido a que éstos presentan efectos secundarios dañinos para el tejido.³⁹ Se entiende por tanto que el interés en el desarrollo de nuevas drogas antiinflamatorias a partir de este tipo de compuestos radica en su alto margen de seguridad y en la ausencia de efectos ulcerogénicos. Además, los AINEs presentan propiedades antiinflamatorias y analgésicas asociadas, mientras que los flavonoides poseen sólo actividad antiinflamatoria por inhibición de la peroxidación del ácido araquidónico. Inhiben la catecol O-metiltransferasa (COMT) y por consiguiente la duración de la acción de las catecolaminas (contracción de los vasos, elevación de la resistencia vascular) se encuentra prolongada; estimulan la prolinahidroxilasa, favorecen la solidez del colágeno y tienen actividad antielastasa.⁴⁰

La acción captadora de radicales libres generados en los procesos inflamatorios, se considera uno de los tantos mecanismos de acción mediante los cuales una sustancia puede ejercer un efecto antiinflamatorio.⁴¹ La inflamación es considerada una resultante de la interacción de células y otros factores presentes en los tejidos en respuesta a una injuria externa, produciéndose especies reactivas del oxígeno (EROs) en respuesta a los agentes potencialmente dañinos, donde normalmente estas EROs son efectivamente detoxificadas por la presencia de sustancias antioxidantes, de una manera simple, el estrés oxidativo resulta de un desbalance entre la producción de EROs y la capacidad intrínseca de su captura. Entre los posibles mecanismos subyacentes de éste desbalance está el inadecuado metabolismo del ácido araquidónico (AA), el cual vía la enzima ciclooxigenasa (COX) genera mediadores pro-inflamatorios sindicados para la mayoría de eritemas causado durante la inflamación aguda.³⁹

Nuestro estudio confirma lo hallado en un estudio de la actividad antioxidante donde se empleó el extracto etéreo, acuoso y etanólico de hojas y semillas de *Rumex crispus* L. En este estudio la actividad en mención fue concentración dependiente (50-150 microgramos) sobre el DPPH, donde el extracto acuoso de las hojas y semillas mostró la actividad antioxidante más alta. De todos los extractos, la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales se encontró en el extracto etanólico de las semillas, mientras que la cantidad más baja se encontró en el extracto etéreo de las semillas. La mayor actividad se observó con el extracto etanólico de las semillas. A 400 µg de extracto acuoso y etanólico de las semillas la actividad de antioxidante fue de 85 y 90%, respectivamente.¹⁰

Se ensayaron extractos butanólicos y de acetato de etilo mostrando un efecto notable frente al DPPH, en comparación con el ácido ascórbico.⁷

En segunda instancia, se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza".

El edema de la pata trasera inducida por carragenina es un modelo experimental estándar de inflamación aguda, donde la carragenina es el agente flogístico elegido para ensayar agentes antiinflamatorios, además de ser antigénico. El modelo exhibe un alto grado de reproducibilidad.³⁹

Diversos trabajos previos describen ampliamente la actividad antiinflamatoria de compuestos fenólicos. Nuestros resultados obtenidos ratifican dichos antecedentes ya que se observó que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. son activos en el edema plantar inducido por carragenina al inhibir la inflamación, incluso, de manera significativa.

En la Figura 10, se muestra la variación del volumen del efecto antiinflamatorio de los tratamientos expresado como volumen de agua desplazado en función del tiempo. Se puede ver cómo el proceso inflamatorio progresa fisiopatológicamente normal en el grupo de animales sin tratamiento (grupo blanco), hasta un volumen máximo a las tres horas de administrada la carragenina. En este momento, la formación del edema es principalmente debido a la liberación de metabolitos del ácido araquidónico por el efecto de la COX.

En contraste, el fármaco de referencia, diclofenaco, cuyo mecanismo de acción y eficacia antiinflamatoria son conocidos, ejerce una acción inhibitoria importante del edema plantar inducido. A su vez, los tratamientos con los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. muestran también una acción antiinflamatoria importante dado que las curvas se ubican por debajo de

la curva descrita por el grupo blanco donde, además, se puede apreciar que la dosis de 200 mg/kg se encuentra prácticamente superpuesta con la curva descrita por el estándar diclofenaco. Es evidente que los compuestos de naturaleza fenólica aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. ejercen efecto antiinflamatorio por inhibición de la liberación de agentes proinflamatorios, responsables de la formación de edema.

Calculando el área bajo la curva (ABC volumen/tiempo) de cada curva descrita por los tratamientos y luego observándolas en forma gráfica (Figura 11), se aprecia, en concordancia con la Figura 10, que el grupo blanco posee mayor área (9,0900 ml/t), lo cual es lógico debido a que este grupo sólo recibió vehículo como tratamiento y el proceso inflamatorio progresa fisiopatológicamente normal con desplazamiento de volúmenes mayores de agua. En contraste, el ABC del estándar (6,7800 ml/h) es el menor dado que actúa eficazmente inhibiendo la inflamación con desplazamiento minoritario de agua en el pletismómetro. Los valores de las ABC de los tratamientos con compuestos fenólicos a 50 mg/kg (7,9700 ml/h), 100 mg/kg (7,5800 ml/h) y 200 mg/kg (6,8800 ml/h), se encuentran comprendidos entre las ABC del grupo blanco y del estándar lo cual indica más claramente que *Rumex crispus* L. posee compuestos fenólicos con actividad antiinflamatoria.

El análisis de varianza (ANOVA) de todas las ABC calculadas nos indica que existe diferencia estadística significativa entre ellas ($p < 0,05$), es decir, que al menos una ABC de un grupo experimental se diferencia de las demás (Anexo 21). En efecto, luego de realizar la prueba de comparaciones múltiples de HSD de Tukey (Anexo 22), se puede ver grupos homogéneos donde el ABC del grupo blanco se diferencia de las demás y que el ABC del tratamiento a una dosis de 200 mg/kg es estadísticamente similar al ABC del estándar diclofenaco ($p = 0,9$). Del mismo modo, el ABC del tratamiento con una dosis de 50 mg/kg es estadísticamente similar al ABC del tratamiento a una dosis de 100 mg/kg. La prueba de Dunnett (Anexo 23) empleada para comparar todos los tratamientos frente al estándar diclofenaco confirma la similitud estadística entre el ABC del tratamiento a una dosis de 200 mg/kg y el ABC del estándar diclofenaco ($p = 0,9$). Si prescindimos del grupo estándar, la prueba de Duncan (Anexo 24), al comparar las ABC de sólo los tratamientos con los compuestos fenólicos aislados de *Rumex crispus* L., pone en evidencia que el ABC de la dosis de 200 mg/kg es estadísticamente diferente de las otras, donde además podemos

apreciar que las ABC de la dosis de 50 mg/kg es estadísticamente similar al ABC del tratamiento a la dosis de 100 mg/kg.

VI. CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" tienen actividad antioxidante *in vitro* y antiinflamatoria *in vivo*.
- 2.-El extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" presenta metabolitos secundarios como son: catequinas, fenoles y taninos, flavonoides, quinonas, lactonas, triterpenos, saponinas y alcaloides.
3. Se aisló los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", los mismos que espectralmente corresponden a fenoles, flavonoides, catequinas o quinonas.
4. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" a las concentraciones de 50 y 100 µg/ml muestran mayor porcentaje de actividad antioxidante que es similar a la quercetina y vitamina C.
5. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" a una dosis de 200 mg/kg muestran la mejor actividad antiinflamatoria estadísticamente similar al diclofenaco.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con los estudios espectroscópicos para elucidar las estructuras moleculares de los compuestos fenólicos de *Rumex crispus* L.
2. Continuar con los estudios de la actividad antioxidante *in vivo* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza".
3. Realizar estudios de toxicidad aguda y crónica de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza".
4. Realizar extracciones con diferentes solventes para la búsqueda de moléculas captadoras de radicales libres que podrían ser potenciales agentes antioxidantes por lo que deben continuar siendo exploradas.

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. López A, Fernando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. REVISTA ANACEM. [revista en internet] 2012. [acceso diciembre 2012]; 6(1):48-58. Disponible en: <http://www.revistaanacem.cl/wp-content/uploads/2015/10/AR1.-Antioxidantes-un-paradigma-en-el-tratamiento-de-enfermedades.pdf>
2. Siñani G. Determinación de la actividad antiinflamatoria e interacción de extractos de la planta kiswara (*Buddleja coriácea* Rémy) con dexametasona, mediante los ensayos de edema plantar y auricular en modelo murino. [Tesis de grado para obtener el Título de Licenciatura en Bioquímica]. La Paz-Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; 2009.
3. Garrido G. Contribución al estudio del mecanismo de acción antiinflamatoria del extracto natural de *Mangífera indica* L. (Vimang®). [Tesis de grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas]. Ciudad de La Habana – Cuba: Centro de Química Farmacéutica. Laboratorio de Farmacología; 2005.
4. García L, Rojo M, García V, Hernández M. Plantas con Propiedades Antiinflamatorias. Centro de Investigaciones Biomédicas Victoria de Girón. Rev. Cubana Invest Biomed. [revista on line] 2002. [acceso noviembre 2012]; 21(3):214–6. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002002000300012
5. Palacios J. Plantas medicinales nativas del Perú. Lima-Perú: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYTEC; 1997.
6. Maksimovic Z, Kovacevic N, Lakusic B, Cebovic T. Antioxidant activity of yellow dock (*Rumex crispus* L., Polygonaceae) fruit extract. Res Phytother. [revista on line] 2011. [acceso noviembre 2012]; 25 (1):101-5. Disponible en: [http://www.researchgate.net/profile/Zoran_Maksimovic/publication/267030226_Antioxidant_activity_of_yellow_dock_\(Rumex_crispus_L._Polygonaceae\)_fruit_extract/links/547f0d990cf2de80e7cc733b.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Zoran_Maksimovic/publication/267030226_Antioxidant_activity_of_yellow_dock_(Rumex_crispus_L._Polygonaceae)_fruit_extract/links/547f0d990cf2de80e7cc733b.pdf)
7. Suh H, Lee K, Kim S, Shin M, Park S. Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. J Photochem Photobiol B.[revista on line] 2011. [acceso noviembre 2012];102(2):102-7. Disponible en: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/determination-of-singlet-oxygen-quenching-and-protection-of-biological-L8keflvD2o>
8. Jimoh F, Adedapo A, Aliero A, Afolayan A. Polyphenolic Contents and Biological Activities of *Rumex ecklonianus*. Pharmaceutical Biology; [revista on line] 2008. [acceso noviembre 2012]; 46(5):333–340. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13880200801887765?journalCode=ipbh20>
9. Süleyman H, Demirezer LO, Kuruüzüm Uz-A, Akçay F. Gastroprotective and antiulcerogenic effects of *Rumex patientia* L. extract. Pharmazie. [revista on line] 2002. [acceso noviembre 2012]; 57(3): 204-205. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/med/11933853>
10. Yildirim A, Mavi A, Kara A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. J Agric Food Chem. [revista on line] 200. [acceso noviembre 2012]; 49 (8):4083-9. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0103572>

11. Süleyman H, Demirezer LO, Kuruüzüm A, Banoglu ZN, Göçer F, Ozbakir G, Gepdiremen A. Antiinflammatory effect of the aqueous extract from *Rumex patientia* L. roots. J Ethnopharmacol. [revista on line] 1999. [acceso octubre 2012]; 65(2):141-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198001755>
12. Mostacero J, Mejía F. Taxonomía de fanerógamas peruanas. Trujillo-Perú: Editorial Libertad EIRL; 1993
13. Cornejo V. Las plantas y sus utilidades. Ayacucho - Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 1983.
14. Cerrate E. Flora y vegetación del Valle de Chiquián – Ancash. Lima – Perú: UNMSM. Programa Académico de Ciencias Biológicas; 1974.
15. Soukup J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana. Lima – Perú: Editorial Salesiano; 1970.
16. Torres O. Etnomedicina en la sierra central peruana. Instituto Nacional de Cultura Departamental de Junín. Huancayo-Perú; 1985.
17. Fan J, Zhang Z. Studies on the chemical constituents of *Rumex crispus*. Zhong Yao Cai. [revista on line] 2009. [acceso octubre 2012]; 32(12):1836-40. Disponible en: <http://europemc.org/abstract/med/20432897>
18. Baskan S, Daut-Ozdemir A, Günaydin K, Erim FB. Analysis of anthraquinones in *Rumex crispus* by micellar electrokinetic chromatography. Talanta. [revista on line] 2007. [acceso noviembre 2012]; 71(2):747-50. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914006003456>
19. Günaydin K, Topcu G, Ion RM. 1,5-dihydroxyanthraquinones and an anthrone from roots of *Rumex crispus*. Nat Prod Lett. Abstract. [revista on line] 2002. [acceso noviembre 2012];16(1):65-70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11942685>
20. Demirezer LO, Kuruüzüm Uz-A, Bergere I, Schiewe HJ, Zeeck A. The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. Phytochemistry. [revista en internet] Diciembre 2001. [acceso noviembre 2012]; 58(8):1213-7. Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/11618894_The_structure_of_antioxidant_and_cytotoxic_agents_from_natural_source_Anthraquinones_and_tannins_from_roots_of_Rumex_patientia
21. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Madrid – España: Editorial Síntesis S.A; 1999.
22. Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Zaragoza - España: Edit. Acribia S.A; 1991.
23. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. 2ª ed. Lima – Perú: Fondo Editorial de la P.U.C.P; 1994.
24. Bellido G. Actividad antioxidante de las fracciones aisladas de las hojas y flores de *Mutisia acuminata* R&P “chinchilcoma”. [tesis para obtener el título de Químico Farmacéutica]. Ayacucho: UNSCH; 2013.
25. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomédica y estrés oxidativo. Rev. Med. Milit. “DR. Luís Díaz Soto” Cuba [revista en internet]. 2001. [acceso diciembre 2014]; Vol. 30 (1): 36-44. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol30_1_01/mil07100.pdf
26. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cubana Med. Milit. [revista en internet]. 2002. [acceso julio 2013];

- 30(1):15-20. Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf
27. Halliwell, B. y Gutteridge J. Free Radicals in Biology and Medicine. Tercera edición. Editorial Oxford: Oxford University Press; 1999.
 28. Velásquez M; Prieto B; Contreras R. El envejecimiento y los radicales libres. Revista Ciencias de la UNAM. [revista en internet]. Julio – setiembre 2004. [acceso abril 2014]; 75(1): 36- 43. Disponible en: <http://www.alumno.unam.mx/algo-leer/envejecimiento.pdf>
 29. Carhuapoma M. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán”. [tesis para optar el grado académico de magister]. Lima: UNMSM; 2006.
 30. Avendaño L. Introducción a la Química Farmacéutica. 2ª edición. España: Ed. Mc Graw-Hill/Interamericana; 2001
 31. Hall V, Murillo N, Rocha M, Rodríguez E. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Centro nacional de información de medicamentos del Instituto de Investigación Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica; 2001.
 32. Dawson S. Lo esencial en Farmacología. inflamación, analgesia e inmunidad. 9ª ed. Madrid-España: Elsevier; 2003
 33. Goodman y Gilman. Las Bases farmacológicas de la Terapéutica. 10ª ed. Buenos Aires: Edit. Medicina Panamericana; 2003.
 34. Flórez J. Farmacología Humana. 3ª ed. Barcelona: Editorial Masson; 1997.
 35. 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.
 36. Aguilar E. Estudio de los Flavonoides aislados de las hojas de *Smilax sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunológica. [Tesis de Maestría]. Lima: UNMSM; 2007.
 37. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenyl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sangklanakarín J. sci. technol. [revista en internet] 2003. [acceso agosto 2013]; 26(2): 211-219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.pdf>
 38. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo. Métodos Farmacológicos para la Validación de Plantas Medicinales. Barcelona - España; 2001.
 39. Zaa C, Valdivia M, Marcelo Á. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea*. *Revista Peruana de Biología*. [revista en internet] 2012. [acceso setiembre 2015]; 19(3):329-334. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/1049>
 40. Martino V. Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. [revista en internet] 2000. [acceso setiembre 2015]; 19(4):303-308. Disponible en: http://www.latamjpharm.org/trabajos/19/4/LAJOP_19_4_3_1_34V5L4749_H.pdf
 41. Franco L, Castro JP, Ocampo YC, Pájaro IB, Díaz F. Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. [revista en internet] 2013. [acceso setiembre 2015]; 18(1):34-46. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol18_1_13/pla06113.htm

ANEXO

Anexo 1

Certificado de identificación taxonómica de *Rumex crispus* L. "romaza".
Ayacucho – 2012.



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, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. **María Esther, DÍAZ VIVANCO**, 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. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	:	POLIGONALES
FAMILIA	:	POLYGONACEAE
GENERO	:	Rumex
ESPECIE	:	<i>Rumex crispus</i> L.
N.V.	:	"romaza", "lengua de vaca"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 29 de Noviembre del 2012

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Dña. Laura Rocasolán Medina

Anexo 2

Certificado del material biológico. Ayacucho – 2012.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Vicerrectorado de Investigación

CERTIFICADO

San Martín de Porres, 13 de Diciembre del 2012

Mediante la Presente se certifica que las 25 ratas albinas de la cepa Holtzman, de sexo hembra, edad adulta y pesos entre 180 a 200 gramos adquiridas por la Srta. **María Esther Díaz Vivanco**, están en perfecto estado sanitario y fisiológico, para ser utilizados en cualquier protocolo Biomédico.

Atentamente



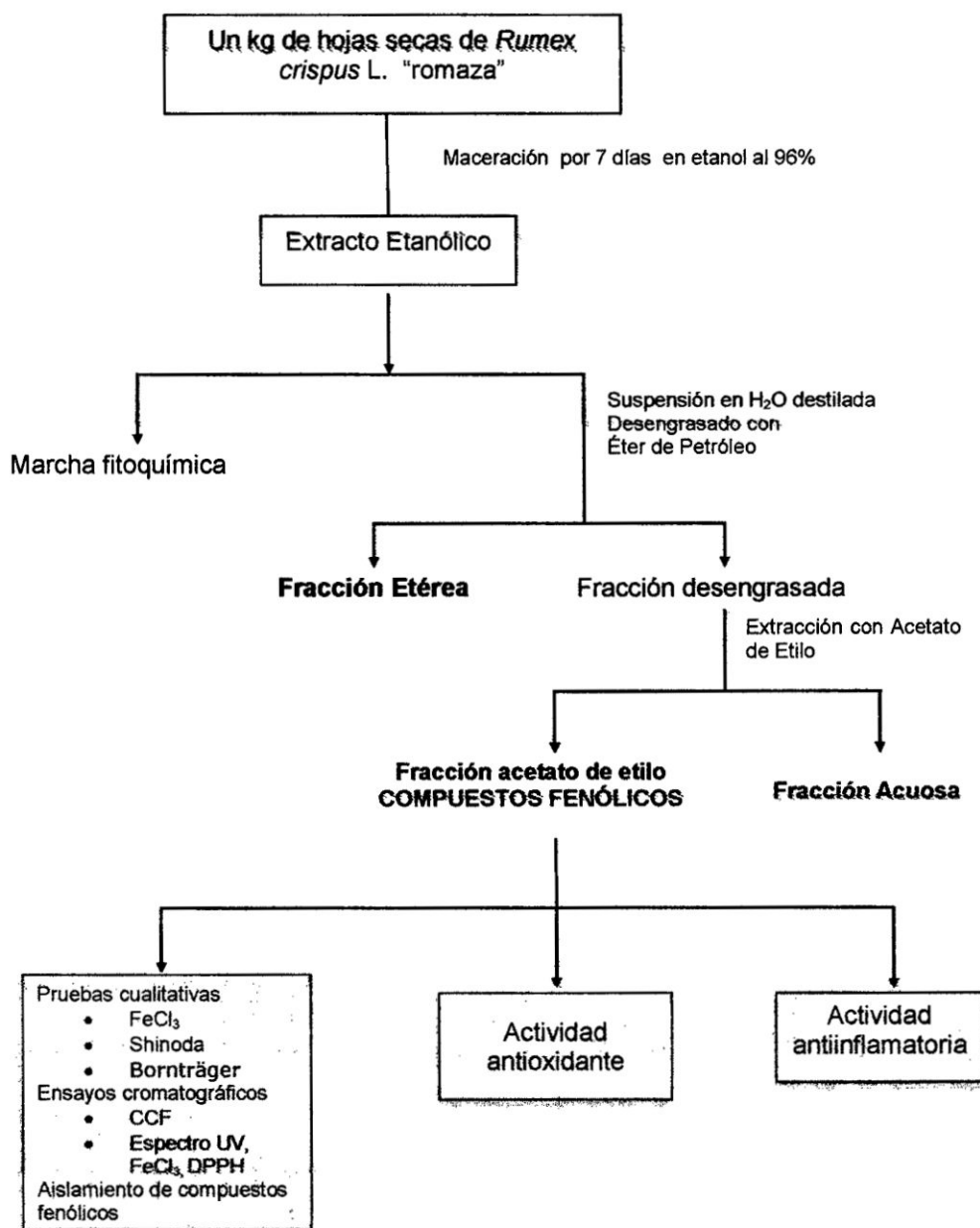
Z. Fernando Benavides M.

Jefe de Bioterio-LID

Vicerrectorado de Investigación-UPCH

Anexo 3

Flujograma de extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* "romaza". Ayacucho – 2013.



Anexo 4

Recolección de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.



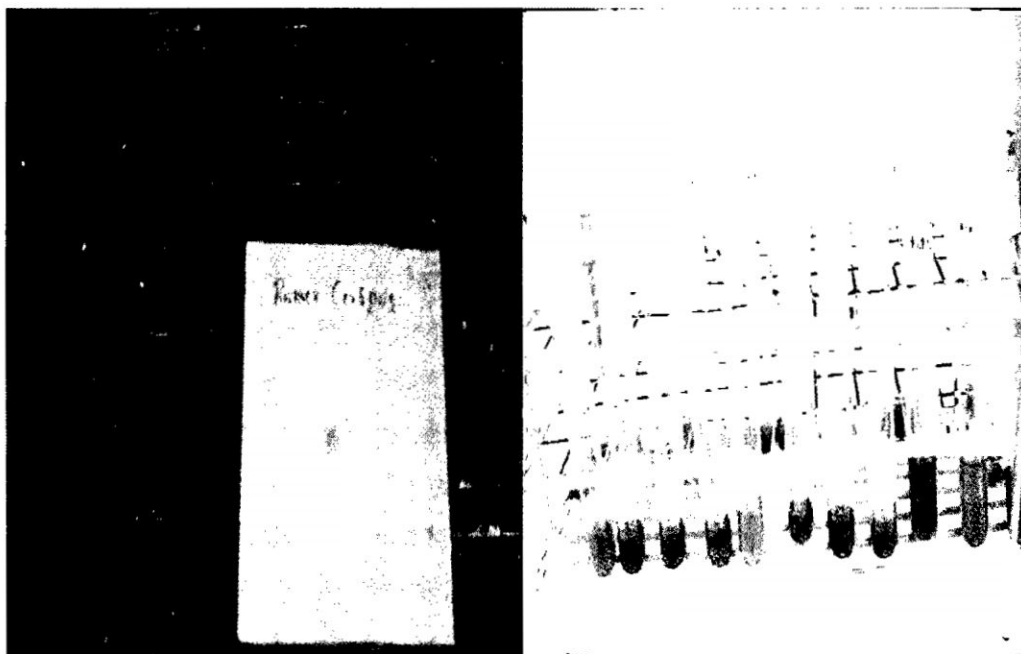
Anexo 5

La concentración de extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L.
"romaza" con el rotavapor. Ayacucho – 2013.



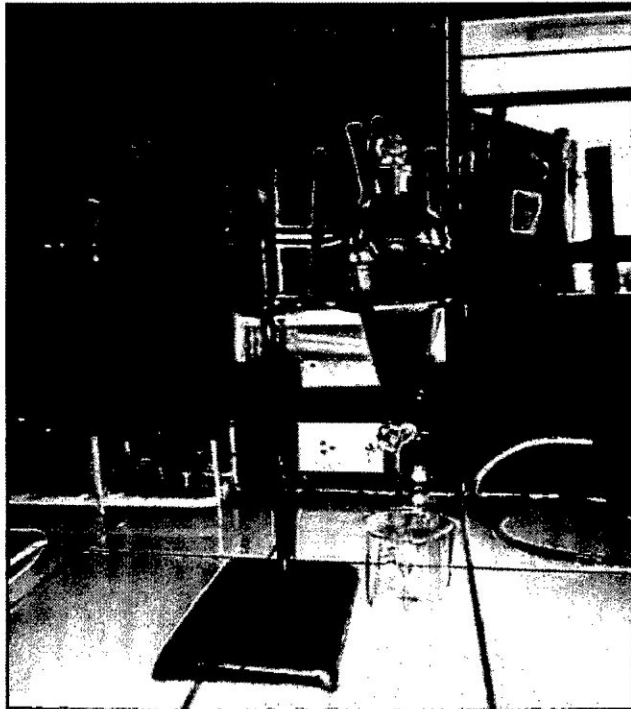
Anexo 6

Ensayo de catequinas y reacciones cualitativas del extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.



Anexo 7

Extracción líquido-líquido en el embudo de separación. Ayacucho – 2013.



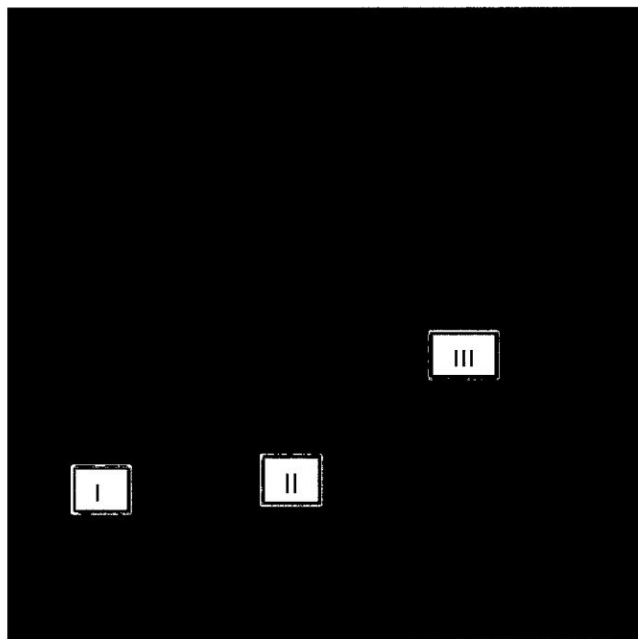
Anexo 8

Pruebas químicas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.



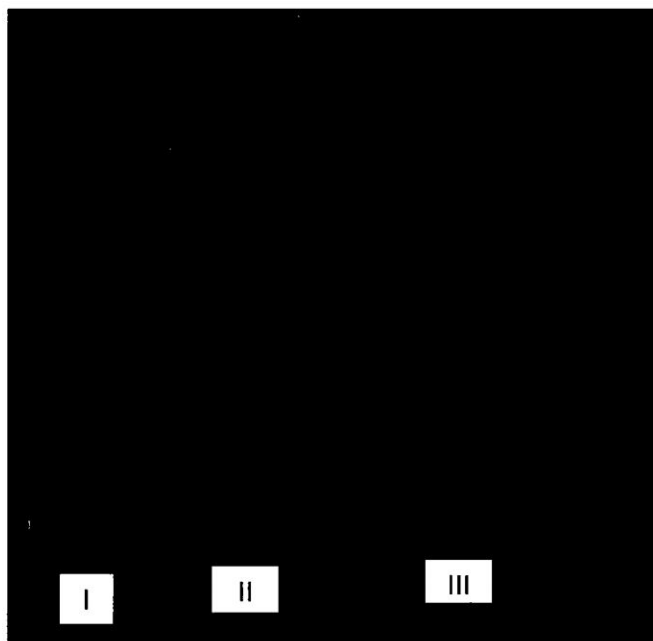
Anexo 9

Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados (I), quercetina (II) y ácido clorogénico revelados con luz UV. Ayacucho – 2013.



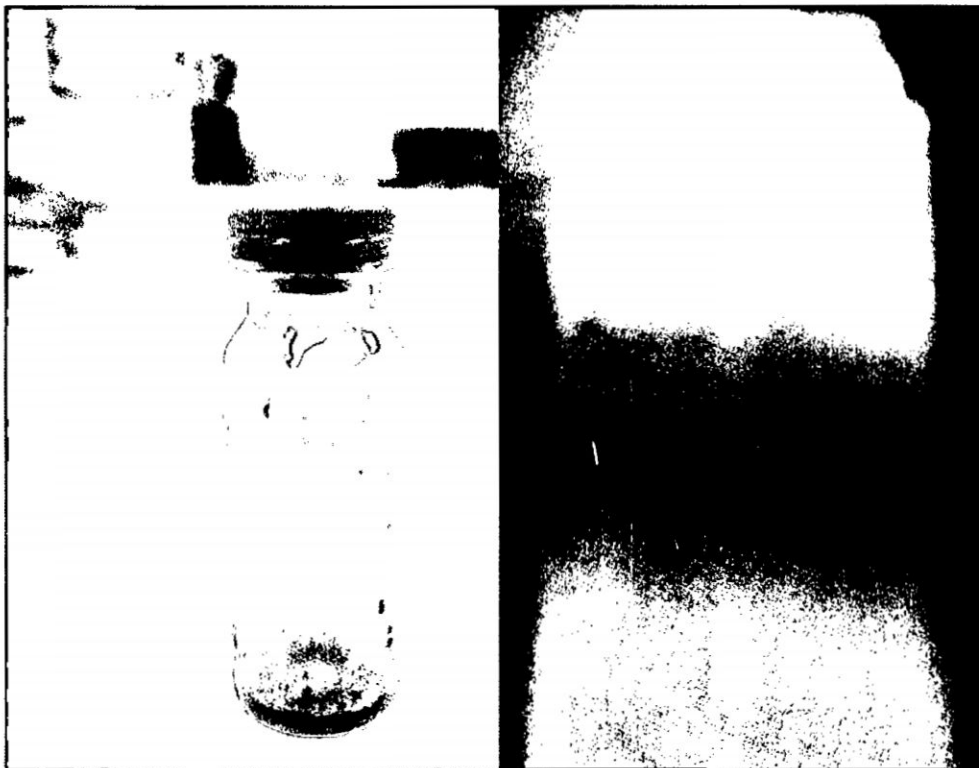
Anexo 10

Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos revelados con cloruro férrico al 5% (I), hidróxido de potasio 5% (II) y DPPH (III). Ayacucho – 2013.



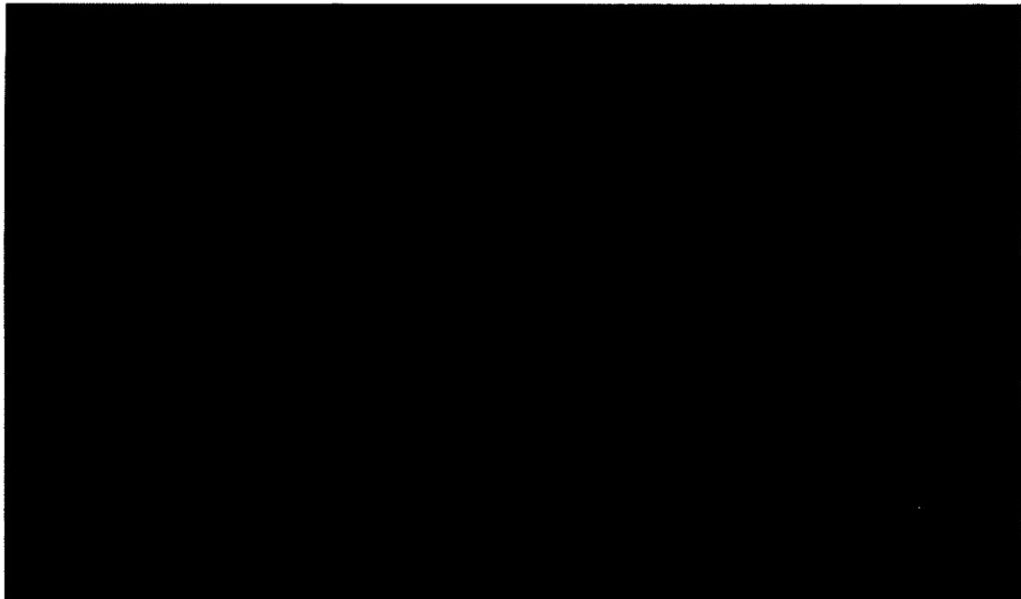
Anexo 11

CCF a escala preparativa para aislar los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L., evidenciados en la luz ultravioleta (cinco bandas). Ayacucho – 2013.



Anexo 12

Recuperación de las cinco bandas de la fracción de cetato de etilo. Ayacucho – 2013.



Anexo 13

Cromatofolio que muestra las fluorescencias de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.



Anexo 15

Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.

Repetición	Tratamiento								
	Quercetina			Vitamina C			Compuestos fenólicos		
	100µg/ml	50µg/ml	10µg/ml	100µg/ml	50µg/ml	10µg/ml	100µg/ml	50µg/ml	10µg/ml
1	97,15	96,36	97,37	98,79	97,67	96,96	96,56	95,14	68,83
2	96,86	96,58	97,17	98,58	97,70	96,96	96,35	94,34	68,62
3	97,29	97,30	97,23	98,44	97,44	97,40	96,47	94,33	68,53
media	97,10	96,75	97,26	98,60	97,60	97,11	96,46	94,60	68,66

Anexo 16

Variable dependiente: Captación del radical DPPH (%) – ANOVA. Ayacucho – 2013.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1104,721 ^a	3	368,240	8,022	,001
Intersección	67831,126	1	67831,126	1477,646	,000
Concentración (µg/ml)	398,762	1	398,762	8,687	,007
Tratamientos	705,959	2	352,979	7,689	,003
Error	1055,812	23	45,905		
Total	239684,646	27			
Total corregida	2160,533	26			

a. R cuadrado = ,511 (R cuadrado corregida = ,448)

Anexo 17

Evaluación de la actividad antiinflamatoria. Ayacucho – 2013.



Anexo 18

Volumen de inflamación de los tratamientos en función del tiempo. Ayacucho - 2013.

Grupo	Tiempo (minutos)					
	0	60	120	180	240	300
Blanco	1,40	2,10	2,30	2,38	2,32	2,18
Estándar	1,44	1,64	1,78	1,74	1,66	1,56
C.F 50mg/kg	1,40	1,78	2,00	2,12	2,00	1,92
C.F 100mg/kg	1,38	1,74	1,94	2,00	1,88	1,78
C.F 200mg/kg	1,42	1,66	1,84	1,74	1,68	1,58

C.F: Compuestos fenólicos

Anexo 19

Valores hallados de volúmenes de inflamación con el área bajo la curva (ABC) a través del programa SIMFIT. Ayacucho – 2013.

Grupos	Tiempo (minutos)				
	60	120	180	240	300
Blanco	8,50	9,25	8,75	9,25	9,70
Estándar	7,10	6,60	6,60	7,05	6,55
C.F 50mg/Kg	8,30	7,80	8,05	8,20	7,50
C.F 100mg/Kg	7,80	7,15	8,10	7,15	7,70
C.F 200mg/Kg	6,95	7,10	6,70	6,70	6,95

C.F: compuestos fenólicos

Anexo 20

Porcentaje de inflamación en función del tiempo. Ayacucho – 2013.

Grupo	Tiempo (minutos)				
	60	120	180	240	300
Blanco	50,10	64,42	70,04	65,86	55,74
Estándar	14,00	23,71	20,25	15,43	8,38
C.F 50mg/Kg	27,36	43,03	51,95	43,84	38,11
C.F 100mg/Kg	26,10	40,84	44,83	36,23	28,96
C.F 200mg/Kg	17,05	29,71	22,67	18,48	11,33

C.F. Compuestos fenólicos

Anexo 21

Análisis de varianza (ANOVA) de las áreas bajo la curva (ABC) descrita por los tratamientos. Ayacucho – 2013.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17,651	4	4,413	36,409	0,000
Intra-grupos	2,424	20	,121		
Total	20,075	24			

p<0,05

Anexo 22

Subconjuntos homogéneos por comparaciones múltiples de HSD de Tukey de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos. Ayacucho – 2013.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Diclofenaco	5	6,780000		
200 mg/kg	5	6,880000		
100 mg/kg	5		7,580000	
50 mg/kg	5		7,970000	
Blanco	5			9,090000
Sig.		,991	,416	1,000

p<0,05

Anexo 23

Comparaciones múltiples de Dunnett de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos. Ayacucho – 2013.

(I) Tratamiento	(J) Estándar	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
50 mg/kg	Diclofenaco	1,1900000	,1960230	,000	,681841	1,698159
100 mg/kg	Diclofenaco	,8000000	,1960230	,002	,291841	1,308159
200 mg/kg	Diclofenaco	,1000000	,1960230	,920	-,408159	,608159

p<0,05

Anexo 24

Comparaciones múltiples de Duncan de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos. Ayacucho - 2013.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
200 mg/kg	5	6,880000	
100 mg/kg	5		7,580000
50 mg/kg	5		7,970000
Sig.		1,000	,080

p<0,05

Anexo 25

Matriz de consistencia

Título	Problema	Objetivos	Variables	Hipótesis	Marco teórico	Metodología
Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". Ayacucho 2012.	¿Tendrán actividad antioxidante y antiinflamatoria los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza"?	Objetivo General: Determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". Objetivos Específicos: -Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". -Aislar los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". -Determinar la concentración de compuestos fenólicos con mayor actividad antioxidante. -Determinar la dosis de compuestos fenólicos con mayor actividad antiinflamatoria.	Variable Independiente: Compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". Indicadores: -Concentraciones de 10, 50, 100 µg/ml de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" para la actividad antioxidante. -Dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" para la actividad antiinflamatoria. Variable dependiente: -Actividad antioxidante -Actividad antiinflamatoria Indicadores: -%Actividad antioxidante -Vol. Inflamación	Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza" presentan actividad antioxidante y antiinflamatoria.	<i>Rumex crispus</i> L. "romaza" -Descripción botánica: <i>Rumex crispus</i> es una hierba perenne que alcanza una altura de hasta 1,0 metro de alto aproximadamente. Compuestos fenólicos: Los compuestos fenólicos están en la naturaleza ampliamente distribuidos en el reino vegetal, todos ellos presentan anillo aromático común que puede estar unido a grupos hidroxilos libres y combinados en forma de éster, éter, heterósidos, etc., la formación de este núcleo aromático se realiza por vegetales y microorganismos. Mientras que su presencia en animales se debe a la ingesta del vegetal. Antioxidantes: Los antioxidantes son sustancias que retardan el comienzo o disminuyen la velocidad de oxidación de los materiales oxidables. Bajo condiciones fisiológicas, el organismo puede prevenir el daño producido por las especies oxidantes, a través de mecanismos de protección que incluye elevar los niveles intracelulares de defensas antioxidantes. Antiinflamatorios: Los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos da esta categoría incluyen muy diversos compuestos que casi nunca tienen quíntica alguna (aunque casi todos son ácidos orgánicos), pero que comprenden algunas actividades terapéuticas y efectos colaterales.	Nivel de Investigación: Básica- Experimental Población. Hojas de <i>Rumex crispus</i> L. recolectadas en el Distrito de Chuschi – Provincia de Cangallo. Muestra. Un Kg de hojas secas de <i>Rumex crispus</i> L. "romaza". Animales de Experimentación: Conformado por 25 ratas Híltzman, con un peso de 180 a 200 g que serán adquiridos del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia - Lima. Diseño metodológico para la recolección de datos: • Recolección, identificación y selección de la muestra. • Preparación del extracto etanólico • Tamizaje fitoquímico. • Extracción e identificación de los compuestos fenólicos. Determinación de la actividad antioxidante: Método de la capacidad secuestradora del radical DPPH (Aguilar, 2007) Determinación de la actividad antiinflamatoria (CYTED): Se utilizará el método del edema plantar inducida por carragenina descrito por primera vez por Winter y col. Diseño Experimental: Randomizado. Las ratas fueron divididas de manera aleatoria en cinco grupos cada uno con repeticiones de cinco animales cada uno. Análisis Estadístico: • Los resultados de la actividad antioxidante serán representados en forma de gráficos de barras en función de las medias. También se hallará el ANOVA en un 95% de confianza. • Los resultados de la actividad antiinflamatoria serán representados en forma de gráficos de barras de error y también se hallarán el ANOVA, Tuckey, Dunnet y Duncan al 95% de confianza.

Actividad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2015.

María Esther Díaz Vivanco, Enrique Aguilar Felices
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

La inflamación es común en casi todas las enfermedades que implican daño celular donde los radicales libres están presentes. El objetivo fue determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", empleando la técnica *in vitro* del DPPH y el modelo *in vivo* de edema plantar inducido en ratas Holtzman. Se llevó a cabo en los laboratorios de la Escuela de Farmacia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú. La muestra fue recolectada en el distrito de Chuschi, provincia de Cangallo, región Ayacucho. Se ensayó las dosis de 50, 100 y 200 mg/kg usando como estándar diclofenaco. Los compuestos fenólicos aislados e identificados mediante pruebas químicas y espectrales fueron fenoles, flavonoides, catequinas y quinonas. La actividad antiinflamatoria expresada como área bajo la curva (ABC) fue de 7,97; 7,58; 6,88 y 6,78 ml/h correspondiente a los tratamientos con 50; 100; 200 mg/kg y diclofenaco. Respecto al porcentaje de actividad antioxidante *in vitro*, a las concentraciones de 10, 50 y 100 µg/ml de compuestos fenólicos se logró 68,6; 94,6 y 96,46% de actividad, respectivamente. Se concluye que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" tienen actividad antiinflamatoria *in vivo* y antioxidante *in vitro*, donde la dosis de 200 mg/kg muestra la mejor actividad antiinflamatoria estadísticamente similar al diclofenaco; y mayor porcentaje de actividad antioxidante a las concentraciones de 50 y 100 µg/ml similar a la quercetina y vitamina C. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. constituyen una fuente potencial para el tratamiento antiinflamatorio y antioxidante.

Palabras clave: Antioxidante, antiinflamatorio, *Rumex crispus* L., romaza.

SUMMARY

Inflammation is common in almost all diseases involving cell damage where free radicals are present. The objective was to determine the antioxidant and anti-inflammatory activity of phenolic compounds isolated from the leaves of *Rumex crispus* L. "romaza", using the technique of DPPH *in vitro* and *in vivo* model of plantar edema induced in rats Holtzman. It was carried out in the laboratories of the School of Pharmacy of San Cristóbal de Huamanga University, Ayacucho, Peru. The sample was collected in the Chuschi district, Cangallo province, Ayacucho region. Was tested doses of 50, 100 and 200 mg/kg using as standard diclofenac. Phenolic compounds isolated and identified by chemical and spectral tests were phenols, flavonoids, catechins and quinones. The anti-inflammatory activity expressed as area under the curve (AUC) was 7.97; 7.58; 6.88 and 6.78 ml/h corresponding to the treatments with 50; 100; 200 mg/kg and diclofenac. Respect to percentage antioxidant activity *in vitro*, at concentrations of 10, 50 and 100 µg/ml of phenolic compounds was achieved 68.6; 94.6 and 96.46% activity respectively. It is concluded that phenolic compounds isolated from the leaves of *Rumex crispus* L. "romaza" have anti-inflammatory activity *in vivo* and *in vitro* antioxidant, where the dose of 200 mg/kg shows the best anti-inflammatory activity statistically similar to diclofenac; and higher percentage of antioxidant activity at concentrations of 50 and 100 µg/ml similar to quercetin and vitamin C. Phenolic compounds of the leaves of *Rumex crispus* L. constitute a potential source for the treatment inflammatory and antioxidant.

Keywords: Antioxidant, anti-inflammatory, *Rumex crispus* L., "romaza".

INTRODUCCIÓN

El tema de los antioxidantes ha venido adquiriendo importancia singular en los últimos tiempos. Al existir una disminución de los niveles de antioxidantes o una inhibición de las enzimas antioxidantes se desencadena un estrés oxidativo, produciendo daño celular por la oxidación a macromoléculas como proteínas, lípidos y ácido desoxirribonucleico. Estudios previos correlacionan el estrés oxidativo con la patogénesis de numerosas enfermedades como Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cáncer e infertilidad. Las sustancias antioxidantes desempeñan una función fundamental en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, por lo que es importante el consumo de sustancias antioxidantes no enzimáticas o la innovación de productos químicos enzimáticos que puedan lograr un efecto positivo en la salud del paciente.¹

De otro lado, la inflamación es común en casi todas las enfermedades que implican un daño microbiológico, químico o físico a tejidos vivos. En algunas de sus múltiples formas y manifestaciones, la inflamación se esconde tras la causa más importante de muerte en el mundo actual. Además, representa una característica permanente de muchas otras enfermedades que pueden no ser mortales, pero que, sin embargo, provocan grandes sufrimientos e incapacidad, que puede transcurrir hacia una situación crónica que suele dar lugar a enfermedades degenerativas como la artritis reumatoide, las cardiopatías reumáticas, acné, psoriasis, arteriosclerosis, enfermedades hepáticas, renales crónicas entre otras.²

A pesar de la potente acción antiinflamatoria que le es atribuida a los fármacos antiinflamatorios, estos compuestos presentan una alta incidencia de efectos adversos y algunos, incluso, no logran modular la inducción de ciertas citocinas proinflamatorias. Por esta razón una fuente importante de productos con interés farmacológico lo constituyen los productos naturales y en tal sentido, la búsqueda de principios activos con posible acción antiinflamatoria, ha estado dentro de las prioridades de quienes investigan en este campo.³

Desde hace algunos años, tanto países altamente desarrollados como aquellos países subdesarrollados con escasos recursos económicos, han retomado y desarrollado el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos en lo que se ha llamado la Revolución Verde de la Medicina.⁴

Una gran variedad de especies vegetales de nuestro país presentan propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, sin embargo, la mayoría no cuenta con información científica que avale estas propiedades. Por lo tanto, el presente proyecto de investigación se enfoca en el estudio de la especie vegetal *Rumex crispus* L. "romaza", utilizada en la medicina tradicional peruana; en patologías relacionadas con procesos inflamatorios.⁵

El contexto descrito, nos motivó a investigar dicha especie, enfocándonos en demostrar el objetivo general:

- Determinar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", haciendo uso de modelos *in vitro* e *in vivo* validados y de amplio uso en investigación.

Al mismo tiempo, nos hemos propuesto objetivos específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza".
- Aislar los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza".
- Determinar la concentración de compuestos fenólicos con mayor actividad antioxidante.
- Determinar la dosis de compuestos fenólicos con mayor actividad antiinflamatoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Farmacognosia y Farmacología de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Región Ayacucho, Perú.

Población y muestra

Población: Hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" que crecen en el distrito de Chuschi, provincia de Cangallo, Región Ayacucho.

Muestra: Un Kg de hojas secas de *Rumex crispus* L. "romaza".

Tipo de muestreo: Por conveniencia, no probabilístico.

Animales de experimentación

25 ratas albinas de la cepa Holtzman de pesos entre 180 a 200 g, en buen estado de salud, adquiridos del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – Lima.

Diseño metodológico para la recolección de datos

Recolección de la muestra

El procedimiento para la recolección, selección y secado de las muestras se realizó de acuerdo a los procedimientos establecidos por Villar del Fresno.⁶ Se seleccionó las hojas intactas; se lavó con abundante agua y se secó a la sombra, en una habitación ventilada, sobre papel periódico, aproximadamente por una semana, después se trituró con un molino.

Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza"

Un Kg de muestra seca y molida se maceró en frascos de color ámbar por un periodo de una semana en 9 litros de alcohol de 96° cuyo volumen cubrió la muestra. Durante el proceso se agitó mecánicamente el frasco, para que el alcohol se distribuya homogéneamente en la muestra. Luego se procedió a filtrar, concentrar en un rotavapor y luego en una estufa a 40°C, hasta obtener un extracto de consistencia blanda.

Ensayo fitoquímico cualitativo

La identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios se realizó mediante ensayos de coloración y precipitación, siguiendo los procedimientos de Miranda y Cuellar.⁷

Extracción de los compuestos fenólicos

El extracto etanólico seco se reconstituyó con agua destilada y se trató con 300 ml de éter de petróleo con la finalidad de eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que puedan interferir con la extracción de los compuestos fenólicos. La extracción líquido-líquido se realizó con 300 ml de acetato de etilo en un embudo de separación, para recuperar finalmente la fracción

de acetato de etilo donde se encuentra los compuestos fenólicos.⁸

Identificación de compuestos fenólicos

Pruebas cualitativas.

- Reactivo de cloruro férrico: Se añadió unas gotas de cloruro férrico sobre la fracción de acetato de etilo.⁷
- Shinoda.⁷
- Bornträger.⁷

Cromatografía en capa fina (CCF)

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 20 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: Butanol: Ácido acético: Agua (4:1:5)
- Volumen de inyección: 20 µl
- Revelador: Luz ultravioleta, cloruro férrico, hidróxido de potasio y DPPH

La fracción de acetato de etilo se disolvió en 1 ml de metanol y mediante un capilar de vidrio se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica previamente activada (fase estacionaria), se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente butanol: ácido acético: agua (4:1:5)⁹ no sobrepase a la muestra aplicada y dejando que el líquido ascienda por capilaridad. Posteriormente se procedió sacar a la placa cromatográfica, teniendo en cuenta que el solvente haya llegado hasta los 2 cm de la parte superior de la placa, se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se observó en la lámpara UV CAMAG, finalmente se reveló con cloruro férrico al 5%, hidróxido de potasio al 5% y DPPH; y se observó la presencia de manchas.

Aislamiento de los compuestos fenólicos

Se realizó por cromatografía en capa fina a escala preparativa, para el cual se siguió el:

Sistema cromatográfico:

- Fase estacionaria: Placa cromatográfica 20 x 5 conteniendo Silicagel G 254 (Merck)
- Fase móvil: Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)

La siembra de la fracción de acetato de etilo se realizó en bandas con el propósito de aislar los compuestos fenólicos, los cuales se evidenciaron en la luz ultravioleta. Estas bandas fueron recuperadas, disueltas en metanol y filtradas; obteniéndose 5 bandas.

Pruebas espectrales

Las bandas obtenidas fueron leídas en el espectrofotómetro ultravioleta GENESYS 6, en el rango de 200 a 400 nm, registrándose los máximos picos de absorción para su posterior identificación.

Determinación de la Actividad Antioxidante

Método: Actividad Secuestradora del Radical DPPH

Fundamento: El radical libre y estable DPPH, es una sustancia que mide la capacidad de secuestro de cualquier compuesto con actividad antioxidativa. Se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre en toda la molécula, de manera que las moléculas no dimericen, como en el caso de la mayoría de otros radicales libres. La deslocalización también da lugar a un color violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción en solución de etanol a aproximadamente 520 nm. Cuando una solución de DPPH se mezcla con la de una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces

esto da lugar a la forma reducida con la pérdida de este color violeta.¹⁰

Procedimiento:

Para el ensayo se utilizó lo siguiente:

- Una solución metanólica de DPPH de 20 mg/l.
- Una solución metanólica del extracto a una concentración de 300 µg/ml (solución A).
- Una solución blanco de metanol: agua (2:1) para ajustar el espectrofotómetro a cero.
- Un blanco de muestra con 0,75 ml de muestra (solución A) más 1,5 ml de metanol.
- Un patrón de referencia con 1,5 ml de DPPH más 0,75 ml de agua destilada.
- La muestra, con 0,75 ml de solución A y 1,5 ml de DPPH obteniéndose una solución final de 100 µg/ml.
- Inmediatamente se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro.
- Se diluyó la solución A (2) con metanol en una proporción de 1:1 para obtener una solución final de 50 µg/ml (solución B) y luego en una proporción de 1:9, para obtener una concentración final de 10 µg/ml (solución C).
- Con la solución B y C se procedió igual que el anterior.
- Para la comparación, el estándar Vitamina C y Quercetina, se preparó siguiendo el mismo procedimiento que conlleva a lograr concentraciones de 100 µg/ml, 50 µg/ml y 10 µg/ml.

Para los cálculos del porcentaje de actividad antioxidante se empleó la siguiente fórmula:

$$AA\% = \frac{Ac - (Am - Ab)}{Ac} \times 100$$

Dónde:

AA%: Porcentaje de actividad antioxidante.

Ac: Absorbancia del DPPH.

Am: Absorbancia de la muestra.

Ab: Absorbancia del blanco.

Determinación de la actividad antiinflamatoria

Método del edema plantar inducida por carragenina

Fundamento: Consiste en la administración subcutánea de una pseudosolución de carragenina, extraída de las algas marinas *Chondrus crispus* a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatorio agudo mediado por la liberación de diversos autacoides generando edema, eritema, dolor.¹¹

Procedimiento:

- Preparación de la muestra: Se diluyó 2 g de los compuestos fenólicos en 100 ml de carboximetilcelulosa al 0,1%, obteniéndose una concentración del 2%.
- Preparación de carragenina: La suspensión de carragenina al 1% (Laboratorios SIGMA), fue preparado por disolución de 1 g de carragenina en 100 ml de carboximetilcelulosa al 0.1%.
- Preparación de estándar: Se diluyó tres tabletas de diclofenaco (150 mg) en 50 ml de carboximetilcelulosa al 0.1%.
- Las 25 ratas fueron divididos en 5 grupos: primer grupo (blanco), segundo grupo

(estándar), tercer grupo, cuarto grupo y quinto grupo (compuestos fenólicos), los cuales estuvieron en ayunas previo al experimento.

- Cada rata fue marcada con plumón marcador.
- La administración de la muestra problema y el estándar fue por vía oral a través de una sonda adaptada por un medidor de volumen.
- A todos los grupos se le administró 0,1 ml de carragenina, después de 30 minutos de administrar la muestra y el estándar en el tejido subplantar de la pata posterior derecha de la rata.
- La medición del volumen de la pata se realizó utilizando un pletismómetro desde el tiempo cero y cada 60 minutos hasta 5 horas.

Técnicas de medición:

- Preparar el pletismómetro manual.
- Enrazar con agua a la altura de la marca de la jeringa.
- Sumergir la pata inflamada en la jeringa hasta coincidir con la marca de la pata y la jeringa superior.
- Retirar el animal y medir el volumen desplazado en la jeringa inferior.

El cálculo del porcentaje de inflamación se realizó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inflamación} = \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100$$

Dónde:

V_t = Volumen de la pata inflamada en un tiempo "x"

V_0 = Volumen de la pata normal.

Diseño experimental

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 5 ratas, y tratados vía oral de la siguiente manera:

- Grupo I: Control o Blanco, al cual se le administró carboximetilcelulosa al 0,1% y 30 minutos después se inyectó carragenina (0,1 ml) al 1%.
- Grupo II: Estándar, al cual se le administró diclofenaco 20 mg/kg y 30 minutos después se inyectó 0,1 ml de carragenina al 1%.
- Grupo III, IV, V: Se administró 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg de los compuestos fenólicos en carboximetilcelulosa al 0,1% y 30 minutos después se les inyectó 0,1 ml de carragenina al 1%.

Análisis de datos

Los resultados de la actividad antioxidante se representaron en forma de gráficos en función de las medias. Las diferencias entre las medias fueron contrastadas mediante el Análisis de Varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos de la actividad antiinflamatoria se representaron mediante gráficos y cuadros, para ello se halló el área bajo la curva (ABC) del volumen en función al tiempo, utilizando el programa SIMFIT. Con los valores del ABC (Volumen/tiempo), se halló la media de cada uno de los tratamientos y se representó en forma de gráficos de barras de error. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante el ANOVA. Además se hicieron las pruebas de Tukey, Dunnet y Duncan.

RESULTADOS

Tabla 1. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.

Metabolito secundario	Ensayo	Resultado	Observación
Catequinas	Catequina	+++	Coloración verde carmelita a la luz UV
Fenoles y taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	++	Fase amilica de color naranja
Quinonas	Borntrager	+++	Fase amoniacal de color rojo
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado rojo
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	++	Coloración verde oscura
Saponinas	Espuma	+++	Formación de espuma
Alcaloides	Dragendorff	+	Hay opalescencia
	Wagner	+	
	Mayer	+	

(+): Escaso (++) Regular (+++): Abundante

Tabla 2. Características de las reacciones químicas de la fracción de acetato de etilo que contiene los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.

Ensayo	Resultado	Características
Cloruro férrico 5%	+++	Verde oscuro
Shinoda	++	Naranja
Bornträger	+++	Rojo

(+): Escaso, (++) regular, (+++): abundante



Figura 1. Pruebas químicas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho – 2013.

Tabla 3. Características cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" y de los estándares de referencia. Ayacucho – 2013.

Fracción	Revelador			
	Fluorescencia	FeCl ₃	K(OH)	DPPH
melón verde		marrón	anaranjado	amarillo
Acetato de etilo	fluorescente	verde	amarillo	amarillo
	verde oscuro	marrón	amarillo	amarillo
	naranja	amarillo	rojo	amarillo
	marrón	verde	amarillo	amarillo
Quercetina	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
Ácido clorogénico	celeste	amarillo	amarillo	amarillo

*: estándares de referencia

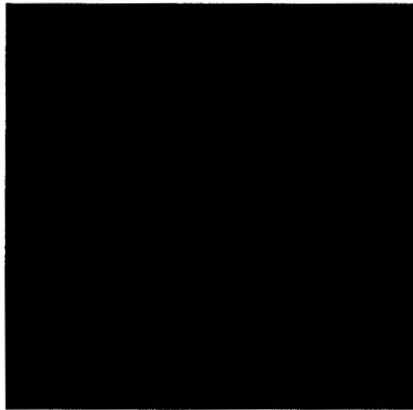


Figura 2. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos aislados (I), quercetina (II) y ácido clorogénico revelados con luz UV. Ayacucho – 2013.

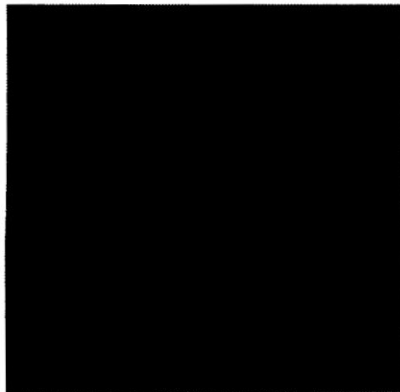
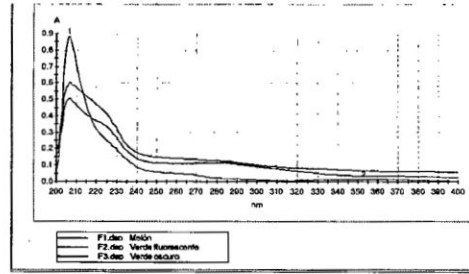


Figura 3. Cromatografía en capa fina de los compuestos fenólicos revelados con cloruro férrico al 5% (I), hidróxido de potasio 5% (II) y DPPH (III). Ayacucho – 2013.

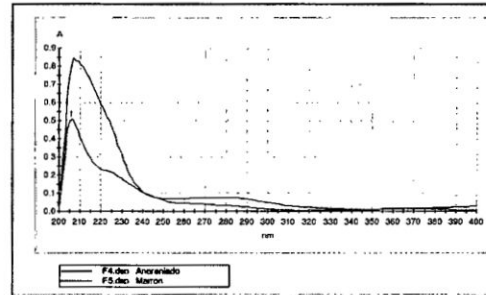


F1.dep Melón
 Maxima Threshold: 0.01 A
 1 207 nm: 0.508 A

F2.dep Verde fluorescente
 Maxima Threshold: 0.01 A
 1 207 nm: 0.654 A

F3.dep Verde oscuro
 Maxima Threshold: 0.01 A
 1 207 nm: 0.694 A 2 353 nm: 0.015 A

Figura 4. Espectros de absorción UV-VIS de los compuestos fenólicos (Fracciones 1, 2 y 3) aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho - 2013.



F4.dep Anaranjado
 Maxima Threshold: 0.01 A
 1 207 nm: 0.844 A

F5.dep Marrón
 Maxima Threshold: 0.01 A
 1 206 nm: 0.509 A

Figura 5. Espectros de absorción UV-VIS de los compuestos fenólicos (Fracciones 4 y 5) aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza". Ayacucho - 2013.



Figura 6. CCF a escala preparativa para aislar los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L., evidenciados en la luz ultravioleta (cinco bandas). Ayacucho – 2013.

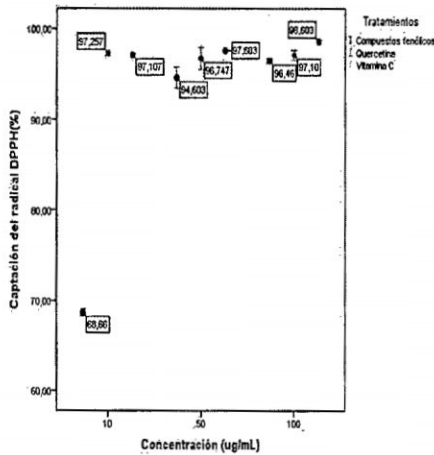


Figura 7. Porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH *in vitro* por acción de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* "romaza" y los estándares. Ayacucho - 2013.

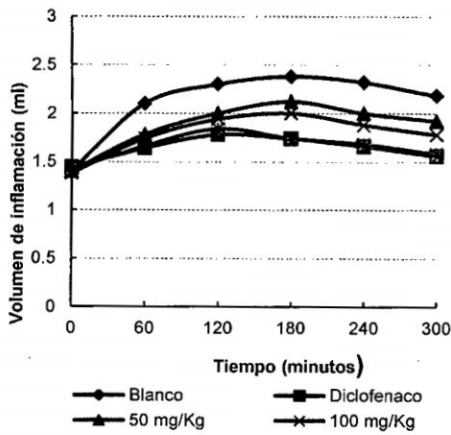


Figura 8. Variación del volumen de inflamación en función del tiempo por efecto antiinflamatorio de los compuestos fenólicos. Ayacucho - 2013.

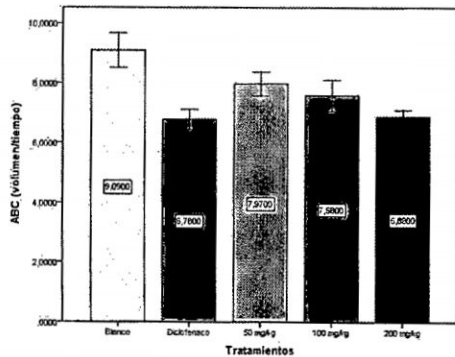


Figura 9. Área bajo la curva (ABC) del volumen inflamación a través del tiempo según los tratamientos de los compuestos fenólicos aislados. Ayacucho - 2013.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) de las áreas bajo la curva (ABC) descrita por los tratamientos. Ayacucho - 2013.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	17,651	4	4,413	36,409	0,000
Intra-grupos	2,424	20	,121		
Total	20,075	24			

p<0,05

Tabla 5. Subconjuntos homogéneos por comparaciones múltiples de HSD de Tukey de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos. Ayacucho - 2013.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0,05		
		1	2	3
Diclofenaco	5	6,780000		
200 mg/kg	5	6,880000		
100 mg/kg	5		7,580000	
50 mg/kg	5		7,970000	
Blanco	5			9,090000
Sig.		,991	,416	1,000

p<0,05

Tabla 6. Comparaciones múltiples de Dunnett de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos. Ayacucho - 2013.

(I) Tratamiento	(J) Estándar	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
50 mg/kg	Diclofenaco	1,1900000	,1960230	,000	,681841	1,698159
100 mg/kg	Diclofenaco	,8000000	,1960230	,002	,291841	1,308159
200 mg/kg	Diclofenaco	,1000000	,1960230	,920	-,408159	,608159

p<0,05

Tabla 7. Comparaciones múltiples de Duncan de las áreas bajo la curva (ABC) descritas por los tratamientos. Ayacucho - 2013.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
200 mg/kg	5	6,880000	
100 mg/kg	5		7,580000
50 mg/kg	5		7,970000
Sig.		1,000	,080

p<0,05

DISCUSIÓN

La identificación cualitativa de los principales grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", se desarrolló según la técnica de Miranda y Cuellar⁷, permitiéndonos observar la presencia del grupo de compuestos fenólicos en general, valorándose su presencia como abundante (Tabla 1).

En las características de las reacciones químicas de la fracción de acetato de etilo que contiene los compuestos fenólicos (Tabla 2 y Figura 1) fueron diferenciadas por las pruebas de cloruro férrico al 5%, Shinoda y Bornträger. En la prueba química con FeCl_3 al 5% se produjo un color verde oscuro, identificándose presencia de compuestos fenólicos en abundante concentración. En la prueba con Shinoda la fase amilica se colorea de naranja, lo cual indica la presencia de flavonoides en regular cantidad. En la prueba con Bornträger la fase superior se colorea de rojo, lo que indica la presencia de quinonas en abundante concentración, especialmente de las antraquinonas libres.⁹

En la Tabla 3 y Figura 2, se observa la presencia de fluorescencia de color melón, verde fluorescente, verde oscuro, naranja y marrón a la luz del espectro ultravioleta, indica que se trata de compuestos fenólicos. Cuando se revela a la misma placa con cloruro férrico al 5%, hidróxido de potasio al 5% y DPPH (Figura 3), se observan manchas de color marrón, verde, amarillo y rojo respectivamente a la luz visible. En caso de la parte revelada con cloruro férrico se observan manchas de color marrón, verde y amarillo; dichas manchas indican la presencia de fenoles. En la parte revelada con hidróxido de potasio al 5% se observan manchas de color rojo, amarillo; dicho color de manchas indican la presencia de antranas y antraquinonas.⁹

Las Figuras 4 y 5, muestran los cromatogramas de los espectros UV obtenidos para cada una de las bandas aisladas de los cromatofolios (Figura 6). Dichos cromatogramas muestran las 5 bandas (F1, F2, F3, F4 y F5). Las fracciones F1 y F2, de acuerdo con las lecturas realizadas, muestran picos máximos de absorción en el rango de 206 a 207 nm. Si bien la extracción líquido - líquido con acetato de etilo es una técnica empleada para la extracción de compuestos fenólicos en general, los compuestos aislados en este estudio corresponderían a dicho grupo de compuestos por dar positivo a la reacción de FeCl_3 5% (Figura 1), pero no corresponderían a flavonoides por los resultados espectrales hallados puesto que se sabe que los espectros de absorción UV-VIS de los flavonoides típicamente consisten de dos máximos de absorción en los rangos 240-285 nm y 350-550 nm.⁹ La fracción 3 (F3) muestra picos máximos de absorción en el rango de 207 y 353 nm, este segundo pico entonces correspondería a un compuesto fenólico del tipo flavonoide, ya que se mencionó que el rango de los flavonoides va desde 350-550nm. Y según los valores que se mencionan en el libro de Lock de Ugaz, la F3 correspondería a los flavonoles ya que su rango va desde 350 a 385 nm. En las fracciones F4 y F5 también se observan picos máximos de absorción a 207 y 206 nm respectivamente.⁹

En primera instancia se ha desarrollado el ensayo de la actividad antioxidante *in vitro* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", en vista de que es muy

ampliamente conocido que los radicales libres juegan un papel muy importante en los procesos inflamatorios. En este sentido, la actividad antioxidante se determinó midiendo la reducción del radical libre DPPH.

En la Figura 7, podemos apreciar gráficamente el porcentaje de actividad secuestradora del radical libre DPPH *in vitro* por acción de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. Es evidente el alto porcentaje de actividad antioxidante de dichos compuestos de manera concentración dependiente, incluso comparables con las sustancias de referencia quercetina y ácido ascórbico, cuya naturaleza química y perfil antioxidante son conocidos ampliamente. La actividad captadora de los compuestos de prueba y los estándares se expresó en términos de la concentración necesaria para disminuir la absorción inicial de DPPH en 50% (IC_{50}), siendo que a las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de compuestos fenólicos se logró 94,6 y 96,46% de actividad, respectivamente, muy similar a las mismas concentraciones de quercetina con 96,7 y 97,10 %, respectivamente, incluso frente al ácido ascórbico con 97,6 y 98,6%. Los compuestos fenólicos a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, a su vez, mostraron un porcentaje de actividad antioxidante relativamente importante con 68,6%. Esta prueba preliminar de la actividad antioxidante *in vitro* realizada nos orienta en cierta medida para ensayos experimentales *in vivo* posteriores.

La bibliografía recoge diversas referencias sobre la actividad de sustancias fenólicas, principalmente flavonoides, dentro de las que destaca la actividad antiinflamatoria. Los compuestos bioactivos derivados de plantas pueden ejercer sus efectos ya sea por el incremento de enzimas antioxidantes, disminución de peróxidos lipídicos y/o modulación de vías que conlleven al daño celular, entre otros. En base a evidencias que respaldan lo anterior, se busca alternativas a los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), debido a que éstos presentan efectos secundarios dañinos para el tejido.¹² Se entiende por tanto que el interés en el desarrollo de nuevas drogas antiinflamatorias a partir de este tipo de compuestos radica en su alto margen de seguridad y en la ausencia de efectos ulcerogénicos. Además, los AINEs presentan propiedades antiinflamatorias y analgésicas asociadas, mientras que los flavonoides poseen sólo actividad antiinflamatoria por inhibición de la peroxidación del ácido araquidónico. Inhiben la catecol O-metiltransferasa (COMT) y por consiguiente la duración de la acción de las catecolaminas (contracción de los vasos, elevación de la resistencia vascular) se encuentra prolongada; estimulan la prolinahidroxilasa, favorecen la solidez del colágeno y tienen actividad antielastasa.¹³

La acción captadora de radicales libres generados en los procesos inflamatorios, se considera uno de los tantos mecanismos de acción mediante los cuales una sustancia puede ejercer un efecto antiinflamatorio.¹⁴ La inflamación es considerada una resultante de la interacción de células y otros factores presentes en los tejidos en respuesta a una injuria externa, produciéndose especies reactivas del oxígeno (EROs) en respuesta a los agentes potencialmente dañinos, donde normalmente estas EROs son efectivamente detoxificadas por la presencia de sustancias antioxidantes, de una manera simple, el estrés oxidativo resulta de un desbalance entre la

producción de EROs y la capacidad intrínseca de su captura. Entre los posibles mecanismos subyacentes de éste desbalance está el inadecuado metabolismo del ácido araquidónico (AA), el cual vía la enzima ciclooxigenasa (COX) genera mediadores pro-inflamatorios sindicados para la mayoría de eritemas causado durante la inflamación aguda.¹²

Nuestro estudio confirma lo hallado en un estudio de la actividad antioxidante donde se empleó el extracto etéreo, acuoso y etanólico de hojas y semillas de *Rumex crispus* L. En este estudio la actividad en mención fue concentración dependiente (50-150 microgramos) sobre el DPPH, donde el extracto acuoso de las hojas y semillas mostró la actividad antioxidante más alta. De todos los extractos, la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales se encontró en el extracto etanólico de las semillas, mientras que la cantidad más baja se encontró en el extracto etéreo de las semillas. La mayor actividad se observó con el extracto etanólico de las semillas. A 400 µg de extracto acuoso y etanólico de las semillas la actividad de antioxidante fue de 85 y 90%, respectivamente.¹⁵

Se ensayaron extractos butanólicos y de acetato de etilo mostrando un efecto notable frente al DPPH, en comparación con el ácido ascórbico.¹⁶

En segunda instancia, se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza".

El edema de la pata trasera inducida por carragenina es un modelo experimental estándar de inflamación aguda, donde la carragenina es el agente flogístico elegido para ensayar agentes antiinflamatorios, además de ser antigénico. El modelo exhibe un alto grado de reproducibilidad.¹² Diversos trabajos previos describen ampliamente la actividad antiinflamatoria de compuestos fenólicos. Nuestros resultados obtenidos ratifican dichos antecedentes ya que se observó que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. son activos en el edema plantar inducido por carragenina al inhibir la inflamación, incluso, de manera significativa.

En la Figura 8, se muestra la variación del volumen del efecto antiinflamatorio de los tratamientos expresado como volumen de agua desplazado en función del tiempo. Se puede ver cómo el proceso inflamatorio progresa fisiopatológicamente normal en el grupo de animales sin tratamiento (grupo blanco), hasta un volumen máximo a las tres horas de administrada la carragenina. En este momento, la formación del edema es principalmente debido a la liberación de metabolitos del ácido araquidónico por el efecto de la COX.

En contraste, el fármaco de referencia, diclofenaco, cuyo mecanismo de acción y eficacia antiinflamatoria son conocidos, ejerce una acción inhibitoria importante del edema plantar inducido. A su vez, los tratamientos con los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. muestran también una acción antiinflamatoria importante dado que las curvas se ubican por debajo de la curva descrita por el grupo blanco donde, además, se puede apreciar que la dosis de 200 mg/kg se encuentra prácticamente superpuesta con la curva descrita por el estándar diclofenaco. Es evidente que los compuestos de naturaleza fenólica aislados de las hojas de *Rumex crispus* L. ejercen efecto antiinflamatorio por inhibición de la liberación de agentes

proinflamatorios, responsables de la formación de edema.

Calculando el área bajo la curva (ABC volumen/tiempo) de cada curva descrita por los tratamientos y luego observándolas en forma gráfica (Figura 9), se aprecia, en concordancia con la Figura 8, que el grupo blanco posee mayor área (9,0900 ml/t), lo cual es lógico debido a que este grupo sólo recibió vehículo como tratamiento y el proceso inflamatorio progresa fisiopatológicamente normal con desplazamiento de volúmenes mayores de agua. En contraste, el ABC del estándar (6,7800 ml/h) es el menor dado que actúa eficazmente inhibiendo la inflamación con desplazamiento minoritario de agua en el pletismómetro. Los valores de las ABC de los tratamientos con compuestos fenólicos a 50 mg/kg (7,9700 ml/h), 100 mg/kg (7,5800 ml/h) y 200 mg/kg (6,8800 ml/h), se encuentran comprendidos entre las ABC del grupo blanco y del estándar lo cual indica más claramente que *Rumex crispus* L. posee compuestos fenólicos con actividad antiinflamatoria.

El análisis de varianza (ANOVA) de todas las ABC calculadas nos indica que existe diferencia estadística significativa entre ellas ($p < 0,05$), es decir, que al menos una ABC de un grupo experimental se diferencia de las demás (Tabla 4). En efecto, luego de realizar la prueba de comparaciones múltiples de HSD de Tukey (Tabla 5), se puede ver grupos homogéneos donde el ABC del grupo blanco se diferencia de las demás y que el ABC del tratamiento a una dosis de 200 mg/kg es estadísticamente similar al ABC del estándar diclofenaco ($p = 0,9$). Del mismo modo, el ABC del tratamiento con una dosis de 50 mg/kg es estadísticamente similar al ABC del tratamiento a una dosis de 100 mg/kg. La prueba de Dunnett (Tabla 6) empleada para comparar todos los tratamientos frente al estándar diclofenaco confirma la similitud estadística entre el ABC del tratamiento a una dosis de 200 mg/kg y el ABC del estándar diclofenaco ($p = 0,9$).

Si prescindimos del grupo estándar, la prueba de Duncan (Tabla 7), al comparar las ABC de sólo los tratamientos con los compuestos fenólicos aislados de *Rumex crispus* L., pone en evidencia que el ABC de la dosis de 200 mg/kg es estadísticamente diferente de las otras, donde además podemos apreciar que las ABC de la dosis de 50 mg/kg es estadísticamente similar al ABC del tratamiento a la dosis de 100 mg/kg.

CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" tienen actividad antioxidante *in vitro* y antiinflamatoria *in vivo*.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" presenta metabolitos secundarios como son: catequinas, fenoles y taninos, flavonoides, quinonas, lactonas, triterpenos, saponinas y alcaloides.
3. Se aisló los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza", los mismos que espectralmente corresponden a fenoles, flavonoides, catequinas o quinonas.
4. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" a las concentraciones de 50 y 100 µg/ml muestran mayor porcentaje de actividad antioxidante que es similar a la quercetina y vitamina C.
5. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Rumex crispus* L. "romaza" a una dosis de 200

mg/kg muestran la mejor actividad antiinflamatoria estadísticamente similar al diclofenaco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. López A, Fernando C, Lazarova Z, Bañuelos R, Sánchez S. Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. REVISTA ANACEM. [revista en internet] 2012. [acceso diciembre 2012]; 6(1):48-58. Disponible en: <http://www.revistaanacem.cl/wp-content/uploads/2015/10/AR1.-Antioxidantes-un-paradigma-en-el-tratamiento-de-enfermedades.pdf>.
2. Siñani G. Determinación de la actividad antiinflamatoria e interacción de extractos de la planta kiswara (*Buddleja coriácea* Rémy) con dexametasona, mediante los ensayos de edema plantar y auricular en modelo murino. [Tesis de grado para obtener el Título de Licenciatura en Bioquímica]. La Paz-Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés; 2009.
3. Garrido G. Contribución al estudio del mecanismo de acción antiinflamatoria del extracto natural de *Mangifera indica* L. (Vimang®). [Tesis de grado científico de Doctor en Ciencias Farmacéuticas]. Ciudad de La Habana – Cuba: Centro de Química Farmacéutica. Laboratorio de Farmacología; 2005.
4. García L, Rojo M, García V, Hernández M. Plantas con Propiedades Antiinflamatorias. Centro de Investigaciones Biomédicas Victoria de Girón. Rev. Cubana Invest Biomed. [revista on line] 2002. [acceso noviembre 2012]; 21(3):214-6. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002002000300012.
5. Palacios J. Plantas medicinales nativas del Perú. Lima-Perú: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONCYTEC; 1997
6. Villar del Fresno, A. Farmacognosia General. Madrid – España: Editorial Síntesis S.A; 1999.
7. 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.
8. Aguilar E. Estudio de los Flavonoides aislados de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunológica. [Tesis de Maestría]. Lima: UNMSM; 2007.
9. Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. Métodos en el Estudio de los Productos Naturales. 2ª ed. Lima – Perú: Fondo Editorial de la P.U.C.P; 1994.
10. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenyl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Sangklanakarín J. sci. technol. [revista en internet] 2003. [acceso agosto 2013]; 26(2): 211-219. Disponible en: <http://rdo.psu.ac.th/sjstweb-old/journal/26-2/07-DPPH.pdf>
11. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo. Métodos Farmacológicos para la Validación de Plantas Medicinales. Barcelona - España; 2001.
12. Zaa C, Valdivia M, Marcelo Á. Efecto antiinflamatorio y antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Petiveria alliacea*. *Revista Peruana de Biología*. [revista en internet] 2012. [acceso setiembre 2015]; 19(3):329-334.
13. Martino V. Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. [revista en internet] 2000. [acceso setiembre 2015]; 19(4):303-308. Disponible en: http://www.latamjpharm.org/trabajos/19/4/LAJO_P_19_4_3_1_34V5L4749H.pdf
14. Franco L, Castro JP, Ocampo YC, Pájaro IB, Díaz F. Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. [revista en internet] 2013. [acceso setiembre 2015]; 18(1):34-46. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol18_1_13/pla06113.htm
15. Yildirim A, Mavi A, Kara A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem*. [revista on line] 200. [acceso noviembre 2012]; 49 (8):4083-9. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0103572>
16. Suh H, Lee K, Kim S, Shin M, Park S. Determination of singlet oxygen quenching and protection of biological systems by various extracts from seed of *Rumex crispus* L. *J Photochem Photobiol B*. [revista on line] 2011. [acceso noviembre 2012]; 102(2):102-7. Disponible en: <https://www.deepdyve.com/lp/elsevier/determination-of-singlet-oxygen-quenching-and-protection-of-biological-L8keflvD2o>