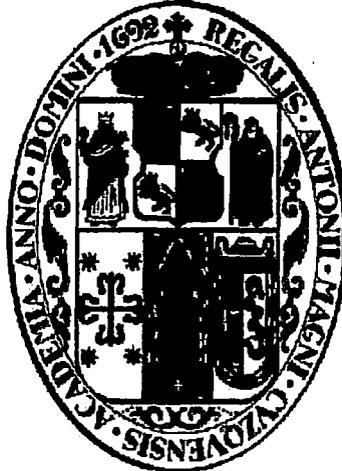


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS, QUÍMICAS,
MATEMÁTICAS, FARMACIA E INFORMÁTICA.**

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA DE LOS EXTRACTOS SECOS
ETANÓLICOS AL 70 % DE PLANTAS USADAS TRADICIONALMENTE PARA EL
TRATAMIENTO DE GOTA Y DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS**

TESIS PRESENTADA POR:

- Br. Isabel del Pilar Gutiérrez Góngora
- Br. Luz Marina Mamani Huittocollo

Para optar al Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACEÚTICO

Asesora : Mgt. Carla del Carpio Jiménez

Co- Asesora : Mgt. Emma Urrunaga Soria

**TESIS AUSPICIADA POR:
CONSEJO DE INVESTIGACIÓN
UNSAAC**

CUSCO- PERU

2011

INDICE

Resumen

Introducción

Capítulo I: Generalidades

1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Formulación del problema	3
1.3. Objetivos generales	3
1.4. Objetivos específicos	3
1.5. Justificación	4
1.6. Hipótesis	5

Capítulo II: Marco Teórico y Conceptual

2.1. Antecedentes:	6
2.1.1. Antecedentes etnobotánicos	6
2.1.2. Antecedentes fitoquímicos	11
2.1.3. Antecedentes sobre estudios de inhibición de xantina oxidasa	15
2.2. Bases teórico científicas.-	21
2.2.1. Aspectos botánicos de las especies en estudio	21
2.2.2. Gota	32
2.2.2.1. Definición	32
2.2.2.2. Epidemiología	32
2.2.2.3. Etiopatogenia	33
2.2.2.4. Causas	33
2.2.2.5. Tratamiento	34
2.2.2.6. Diagnóstico	35
2.2.3. Descripción del alopurinol (fármaco estándar)	35
2.2.3.1. Mecanismo de acción	35
2.2.3.2. Posología y forma de administración	36
2.2.3.3. Reacciones adversas	37
2.2.4. Determinación de la actividad inhibitoria de la xantina oxidasa	38

2.2.5. Caracterización del metabolito secundario del extracto con mayor porcentaje de inhibición de xantina oxidasa.	39
2.2.5.1. Extracción por maceración	39
2.2.5.2. Técnicas de purificación	39
2.2.5.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF)	39
2.2.5.2.2. Cromatografía en columna (CC)	40
2.2.5.3. Técnicas instrumentales para la elucidación e identificación de un compuesto	41
2.2.5.3.1. Espectroscopía de absorción ultravioleta	41
2.2.5.3.2. Obtención de un espectro ultravioleta	42
2.2.5.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	43
2.2.5.3.3.1 Tipos de cromatografía líquida de alta resolución	43
1. Cromatografía de adsorción	43
2. Cromatografía de reparto.	43
3. Cromatografía iónica	45
4. Cromatografía de exclusión por tamaño (sec)	45

Capítulo III: Materiales y Métodos

3.1. Materiales:	46
3.1.1. Material botánico	46
3.1.2. Materiales e instrumentos de laboratorio	46
3.2. Diseño metodológico.-	49
3.2.1. Tipo de estudio:	49
3.2.2. Diseño de la investigación	49
3.2.3. Variables	52
3.2.3.1. Variables implicadas	52
3.2.3.1.1. Variable independiente	52
3.2.3.1.2. Variables dependientes	53
3.2.3.2. Variables no implicadas	54
3.2.3.2.1. Variables intervinientes	54
3.2.3.3. Criterios de inclusión y exclusión	55

3.3 Procedimiento:	56
3.3.1. Recolección, selección, estabilización de las drogas y determinación de la humedad de las plantas	56
3.3.1.1. Recolección	56
3.3.1.2. Determinación de la humedad	56
3.3.1.3. Obtención de los extractos etanólicos de las especies	57
3.3.1.4. Porcentaje de extracción	57
3.3.2. Determinación de la Actividad Inhibitoria Enzimática	59
3.3.2.1. Protocolo experimental	59
3.3.2.1.1. Material biológico	59
3.3.2.1.2. Descripción de la técnica	59
3.3.3 Determinación de la estructura del metabolito secundario del extracto que presenta mayor porcentaje de inhibición	61
3.3.3.1 Extracción con solventes de diferente polaridad del extracto con mayor actividad inhibitoria.	61
3.3.3.2 Determinación de la actividad inhibitoria de xantina de los extractos hexánico, diclorometano, clorofórmico, cloroformo-metanol, metanólico y acuoso.	63
3.3.3.3 Análisis fitoquímico cualitativo del extracto con mayor actividad inhibitoria.	63
3.3.3.4 Separación y purificación del extracto metanólico de trébol (<i>Medicago lupulina</i> L.)	64
3.3.3.5. Cromatografía en capa fina	66
3.3.3.6. Separación por cromatografía de columna	66
3.3.3.7. Análisis espectroscópico	69
3.3.3.8. Hidrólisis ácida del extracto metanólico de <i>medicago lupulina</i> l. (Trébol)	69
3.3.3.9 HPLC (High Pressure Liquid Cromatography)	69
3.3.3.10. Análisis Estadístico	69

Capítulo IV: Análisis y Discusión de Resultados

4.1 Ensayos preliminares	70
o Determinación de la humedad	70
o Obtención de los extractos etanólicos y porcentaje de rendimiento	71
4.2 Determinación de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa por los extractos etanólicos al 70% de las especies	72
4.3 Extracción por fraccionamiento de la especie vegetal que presentó mayor porcentaje de actividad inhibitoria. (<i>Medicago lupulina</i> L.)	74
o Porcentaje de rendimiento de la extracción fraccionada	74
4.4 Determinación de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa de los extractos de <i>Medicago lupulina</i> L. (trébol) obtenidos con diferentes solventes.	75
4.5 Análisis fitoquímico cualitativo del extracto que presento mayor actividad inhibitoria de xantina oxidasa <i>Medicago lupulina</i> L.	76
4.6 Cromatografía en capa fina (TLC)	77
4.7 Cromatografía en columna	77
4.8 Análisis en el ultravioleta	80
4.9 Análisis en el HPLC	81
Conclusiones	88
Bibliografía	90
Recomendaciones y Sugerencias	96
Anexos	

ÍNDICE DE CUADROS

1. Distribución de los grupos para la evaluación de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa	60
2. Marcha Fitoquímica cualitativa del extracto de <i>Medicago lupulina</i> L.	63
3. Sistema de solventes para la elución por cromatografía en columna	66
4. Determinación de la Humedad	70
5. Porcentaje de rendimiento de los extractos liofilizados obtenidos de las diez especies	71
6. Determinación de la Actividad Inhibitoria de Xantina Oxidasa por los Extractos Etanólicos al 70% de las Especies en estudio	72
7. Porcentaje de rendimiento de la extracción fraccionada	74
8. Determinación de la Actividad Inhibitoria de Xantina Oxidasa de los Extractos de <i>Medicago Lupulina</i> L. (Trébol) obtenidos con diferentes solventes	75
9. Análisis fitoquímico cualitativo del extracto que presentó mayor actividad inhibitoria de xantina oxidasa <i>Medicago lupulina</i> L.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico de <i>Medicago lupulina</i> L.	64
2. Separación con acetona y cloroformo para purificación de los componentes	64
3. Separación con el cartucho ODS C-18	65
4. Obtención de la fracción retenida	65
5. Separación por cromatografía en columna	66
6. TLC de las fracciones del extracto acuoso	67
7. Revelado con FeCl ₃	67
8. TLC de fracciones con siembra en banda	68
9. Fracciones acuosas: placa cromatográfica a la luz ultravioleta	68
10. Cromatografía en columna de extracto acuoso	77
11. Fracciones del extracto acuoso a la luz ultravioleta	78
12. Raspado de fracción acuosa	79
13. Espectro UV de Apigenina	85

ÍNDICE DE GRÁFICOS

1. Análisis Ultravioleta de los Espectros de las Fracciones obtenidas de CC	80
2. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) del Extracto Metanólico Hidrolizado de <i>Medicago lupulina</i> L.(Trébol)	81
3. Espectros UV de los picos de mayor obtenidos del cromatograma por HPLC.	82
4. Cromatograma y espectros UV de las fracciones obtenidas por HPLC	83
5. Cromatograma del extracto metanólico hidrolizado y espectros UV de la especie vegetal <i>Petroselinum sativum</i> (perejil)	86

ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

1. Obtención de los extractos etanólicos de las diez plantas, ensayos preliminares y cromatografía	58
2. Obtención de los extractos de <i>Medicago lupulina</i> L. con solventes de diferente polaridad	62

DEDICATORIA

Dios se halla allá
donde el hombre lo
deja entrar. Gracias
Dios mío por ayudarme
a cumplir mis metas y
sueños.

A mis abuelos Agripino
e Isabel por su amor,
fortaleza y por
hacerme de mi la
persona que ahora soy.

A mis padres José
Ángel y Elizabeth por
su cariño, comprensión
y apoyo incondicional.

A mi familia por estar
siempre a mi lado
cuando los necesito.

Isabel.

DEDICATORIA

*Al Creador de los cielos, la
tierra y de todo lo que
habitan en ellas.*

*A mis amados padres:
Genaro y Valentina por todo
su amor, apoyo y confianza.
Todo lo que soy se los debo a
ustedes.*

*A mis queridas hermanas:
Judith y Karina por su
amor, colaboración y sus
palabras para que siempre
sigua adelante.*

Luz Marina.

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro más profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido con este trabajo e hicieron posible el alcance de uno de nuestros retos personales y profesionales.

En primer lugar a nuestras asesoras: Mcs. Carla del Carpio Jiménez, docente de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica y Mgt. Emma Urrunaga Soria, docente de la Carrera Profesional de Química por habernos brindado la oportunidad de realizar esta tesis bajo sus direcciones, por haber sido nuestras guías desde el primer día y por enseñarnos a tener paciencia al realizar trabajos de investigación.

Al Qco. Jorge Choquenaira y MCs. Nancy Accostupa responsables del Laboratorio de Cromatografía, por su apoyo en la parte del análisis y aislamiento del metabolito secundario.

Al MCs. Carlos Serrano, docente de la carrera profesional de química por su interés y ayuda en la elucidación estructural del compuesto aislado.

Al Q.F Gary Vidal CcanaCcapatinta, por brindarnos su ayuda tan necesaria en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Shmeda-Hirschmann, por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo determinar la actividad inhibitoria de xantina oxidasa, de los extractos secos etanólicos al 70% de diez especies vegetales, usadas tradicionalmente para el tratamiento de la gota: *Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L. (Romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (Chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (Diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (Pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (Marcju), *Urtica urens* L. (Ortiga), *Caiohora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (Alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (Trébol); para lo cual se realizó un ensayo in vitro, así como también, determinar los metabolitos secundarios presentes en la planta con mayor actividad. Utilizando un diseño metodológico: descriptivo, cuasiexperimental y transeccional descriptivo.

La actividad enzimática fue medida por medio de un espectrofotómetro, de acuerdo a los valores de absorbancia que mostró a 290nm cada especie vegetal. Fue el extracto etanólico de *Medicago lupulina* L. (trébol) quien presentó un mayor porcentaje de inhibición de 61.03 % a una concentración de 100 µg/ml, sin embargo; fue menor al que presentó el patrón alopurinol.

Para la determinación de los metabolitos secundarios de *Medicago lupulina* L. (trébol), se realizó un proceso de extracción con solventes de diferente polaridad: hexano, diclorometano, cloroformo, cloroformo-metanol (4:1), metanol y agua. A los extractos obtenidos también se les realizó el ensayo in vitro para determinar el extracto con mayor porcentaje de inhibición, presentando el extracto metanólico de *Medicago lupulina* L. (trébol) un porcentaje de inhibición de 64.65% a una concentración de 100 µg/ml.

El extracto metanólico de *Medicago lupulina* L. (trébol) fue sometido a un proceso separación y purificación con acetona, agua y cloroformo, obteniéndose dos extractos: acuoso y clorofórmico. Posteriormente al extracto acuoso se filtró a través de un cartucho ODS C-18 que fue eluida con H₂O acidulada, consiguiéndose dos fracciones de este proceso: una fracción no retenida y una fracción retenida, en la fase sólida del cartucho que fue eluida

con metanol. Ambas fracciones obtenidas, más el extracto clorofórmico fueron llevados a TLC, habiéndose usado como fase móvil: Acetato de etilo : ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:27) observándose en la fracción retenida una separación de sus componentes, por lo que a esta fracción se le llevó a CC, la elución se realizó con un gradiente de solventes: cloroformo-metanol (25:0, 20:5, 15:10, 10:15, 5:20 y 0:25), obteniéndose 80 fracciones de 2 ml cada una, las cuales fueron sometidas a TLC usando la misma fase móvil. Del resultado de este análisis, las fracciones fueron reunidas en 4 fracciones: fracción 1-23, fracción 35-37, fracción 55-59 y fracción 60-79. El extracto metanólico hidrolizado de *Medicago lupulina* L. (trébol) y las cuatro fracciones fueron llevadas a la lectura en Espectrofotómetro UV y HPLC, utilizando el extracto hidrolizado de *Petroselinum sativum* (perejil) como patrón de referencia.

Finalmente, se concluye que de las diez especies estudiadas, *Medicago lupulina* L. (trébol) posee mayor actividad inhibitoria de xantina oxidasa. Además por las características que presentaron los espectros y cromatogramas obtenidos por HPLC, los metabolitos secundarios presentes en esta planta y posiblemente responsables de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa podrían ser flavonoides: Apigenina.

Palabras claves: xantina oxidasa, inhibición, gota, *Medicago lupulina* L. flavonoides, alopurinol, metabolitos secundarios.

SUMMARY

This work aims to determine the inhibitory activity of xanthine oxidase, dried ethanolic extracts 70% of ten plant species traditionally used to treat gout: *Schinus molle* L. (Molle), *Rosmarinus officinalis* L. (Romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (Chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (Diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (Pinco, Pinco), *Ambrosia arborescens* Mill (Marcju), *Urtica urens* L. (Ortiga), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa) *Acanthoxanthium spinosum* (L) (Alkko kiska), *Medicago lupulina* L. (Trébol), for which a test was performed in vitro, as well as to determine the secondary metabolites present in the plant with increased activity. Using a methodological design: descriptive, quasi-experimental and transeccional descriptive.

The enzyme activity was measured using a spectrophotometer, according to the absorbance values at 290nm showing each plant species. It was the ethanol extract of *Medicago lupulina* L. (Trébol) who presented a higher percentage of inhibition of 61.03% at a concentration of 100 µg / ml, however, was lower than with allopurinol pattern.

For the determination of secondary metabolites of *Medicago lupulina* L. (Trébol), we performed a solvent extraction process of different polarity: hexane, dichloromethane, chloroform, chloroform-methanol (4:1), methanol and water. In the extracts obtained were also performed in vitro assay to determine the extract with the highest percentage of inhibition, presenting the methanol extract of *Medicago lupulina* L. (Trébol) a percentage of 64.65% inhibition at a concentration of 100 ug / ml.

The methanol extract of *Medicago lupulina* L. (Trébol) was subjected to separation and purification process with acetone, water and chloroform, obtaining two extracts: aqueous and chloroform. Following the aqueous extract was filtered through a cartridge ODS C-18 which was eluted with acidified water, obtaining two fractions of this process: a not retained fraction and a fraction retained in the solid phase cartridge was eluted with methanol. Both fractions obtained, plus the chloroform extract were taken to TLC, having been used as mobile phase: ethyl acetate: formic acid: acetic acid: water (100:11:11:27)

observed in the fraction retained a separation of its components, so that this fraction led to CC, elution was performed with a gradient of solvents: chloroform-methanol (25:0, 20:5, 15:10, 10:15, 5:20 and 0:25) , yielding 80 fractions of 2 ml each, which were subjected to TLC using the same mobile phase. The results of this analysis, the fractions were pooled into 4 fractions: fraction 1-23, fraction 35-37, fraction 55-59 and 60-79 split. The hydrolyzed methanol extract of *Medicago lupulina* L. (Trébol) and four fractions were taken to reading in spectrophotometer UV and HPLC, using the hydrolyzed extract *Petroselinum sativum* (Perejil) as a reference standard.

Finally, we conclude that the ten species studied, *Medicago lupulina* L. (Trébol) has greater inhibitory activity of xanthine oxidase. Besides presenting the characteristics of spectra and chromatograms obtained by HPLC, the secondary metabolites present in this plant and possibly responsible for the inhibitory activity of xanthine oxidase could be flavonoids: apigenin.

Keywords: Xanthine oxidase, inhibition, gout, *Medicago lupulina* L, flavonoids, allopurinol, secondary metabolites.

ABREVIATURAS

- ❖ **CC** : Cromatografía en columna
- ❖ **TLC, CCF**: Thin layer chromatography o cromatografía en capa fina
- ❖ **OMS** : Organización Mundial de la Salud.
- ❖ **UV** : Ultra violeta.
- ❖ **DAD** : (Detector Diodo Array) Detector de arreglo de diodos.
- ❖ **RPM** : Revoluciones por minuto
- ❖ **Rf** : Factor de retención
- ❖ **Tr** : Tiempo de retención
- ❖ **ODS C-18**: Octadecil silano de carbono 18

INTRODUCCIÓN

Durante el metabolismo de las purinas, la xantina oxidasa cataliza la oxidación de xantina e hipoxantina a ácido úrico. La hiperuricemia es un factor de riesgo para el desarrollo de gota, ésta es definida como una concentración sérica de ácido úrico superior a 7 mg/dl. Las concentraciones elevadas de ácido úrico en plasma pueden ser el resultado de un incremento en su producción, una disminución de su excreción renal, o una combinación de ambos mecanismos (1). La reducción de la hiperuricemia se puede conseguir mediante fármacos inhibidores de la síntesis de ácido úrico o también mediante facilitación de la eliminación urinaria con fármacos uricosúricos (2).

El alopurinol es un medicamento eficaz para tratar la hiperuricemia primaria de la gota, que a diferencia de los uricosúricos que intensifican la excreción renal de ácido úrico, el alopurinol se comporta como sustrato y, al mismo tiempo, como inhibidor competitivo de la xantina oxidasa, enzima que transforma la hipoxantina en xantina, y ésta en ácido úrico. Sin embargo el uso de alopurinol puede llevar a que se presenten efectos secundarios tales como síndrome de hipersensibilidad, síndrome de Stevens–Johnson, nefrotoxicidad y hepatitis (3).

La actividad inhibitoria de xantina oxidasa por extractos de plantas medicinales usadas en medicina popular para el tratamiento de gota y síntomas relacionados, han sido ampliamente estudiada en muchos países: Isaza M. et al., 2007, Muthuswamy et al., 2007, Mai Thanh Thi Nguyen et al., 2004 Sweeney et al., 2001, L.D. Kong et al., 2000, Owen Patrick L., Johns Timothy, 1999, González et al., 1995. Sin embargo en nuestro país, son pocas las plantas que han sido validadas para el tratamiento de esta enfermedad.

El Perú presenta una riqueza y mega diversidad de plantas medicinales nativas, siendo éste uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional, desde la época del Incanato hasta la actualidad, siendo utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud (4).

A través de este estudio se pretende determinar la actividad inhibitoria de xantina oxidasa, de los extractos etanólicos al 70% de las siguientes especies: *Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (Diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (Marcju), *Urtica urens* L. (ortiga), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (trébol), mediante un análisis espectrofotométrico, ya que poseen dentro de sus muchísimas bondades terapéuticas propiedades antigotosas, antirreumáticas y antiinflamatorias.

Además se determinará el metabolito presente en el extracto, posiblemente responsable de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de haber transcurrido muchísimo tiempo, aún el hombre utiliza las plantas para su alimentación y la curación de sus enfermedades. Según señala la OMS: hasta el 2004, el 80% de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utilizaban las plantas como principal remedio medicinal (5).

El hombre a través de la investigación farmacológica y fitoquímica pretende encontrar, en estas plantas, nuevas sustancias con actividades terapéuticas, aislarlas y caracterizarlas con la finalidad de proponer una alternativa natural frente al arsenal de medicamentos existentes, que si bien pueden ser efectivos no todos son seguros, debido a los efectos adversos que presentan.

La gota es provocada por la acumulación de cristales de ácido úrico en las articulaciones, caracterizada por inflamación articular (artritis) y dolor. (6). El ácido úrico es el producto final del metabolismo de las purinas, es un producto de desecho, que no tiene ninguna función fisiológica, es soluble en agua y es excretada principalmente por los riñones, aunque una pequeña cantidad es eliminada por el intestino y degradada por las bacterias. (7).

La inflamación articular puede volverse crónica y deformante tras ataques repetidos. Los ataques de gota aparecen de forma repentina. Pueden ser desencadenados por una lesión insignificante, una intervención quirúrgica, el consumo de grandes cantidades de alcohol o de alimentos ricos en proteínas. Por lo general se presentan dolores intensos y repentinos en una o más articulaciones, que aumentan progresivamente y son, a menudo, insoportables (6).

La gota es 5 a 8 veces más común en hombres que en mujeres. Típicamente se presenta durante la edad media de la vida, y es infrecuente

antes de los 30 años. Las mujeres raramente presentan ataques de artritis gotosa antes de la menopausia (3).

La xantina oxidasa es la enzima clave implicada en el control de la producción de ácido úrico. El tratamiento con los inhibidores de xantina oxidasa disminuye la cantidad de ácido úrico formado e incrementa la cantidad de los precursores solubles hipoxantina y xantina, que se excretan fácilmente por la orina. Por tanto, los inhibidores de xantina oxidasa se emplean en el tratamiento de gota.

El alopurinol, es un análogo de la hipoxantina, es un inhibidor de xantina oxidasa que se utiliza con más frecuencia. El alopurinol puede ser metabolizado por la enzima xantina oxidasa a oxipurinol, un inhibidor potente de xantina oxidasa. (8)

A pesar de ser el alopurinol un medicamento eficaz, su uso puede llevar a presentar reacciones adversas como reacciones de hipersensibilidad, se ha descrito también un cuadro particularmente tóxico con erupción eritematosa y descamativa, fiebre, eosinofilia, disfunción hepática y renal que puede ser mortal. Esta reacción tóxica se aprecia sobre todo en enfermos con insuficiencia renal, habiéndose responsabilizado principalmente al oxipurinol, cuyo aclaramiento es más lento que el del alopurinol (2).

Este trabajo pretende contribuir a la investigación de algunas especies vegetales presentes en el Perú: *Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (Diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L. (ortiga), *Caioophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (trébol), las cuales son usadas tradicionalmente para el tratamiento de la gota y sus síntomas, a través de un modelo *in vitro*. Así también determinar los metabolitos secundarios posiblemente responsables de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa, presentes en la especie vegetal con mayor porcentaje inhibición.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.-

- ¿Presentarán actividad inhibitoria sobre la enzima xantina oxidasa los extractos etanólicos secos al 70% de plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de gota y cuáles serán los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal con mayor porcentaje de inhibición de xantina oxidasa?

1.3. OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la actividad inhibitoria de xantina oxidasa de los extractos etanólicos secos al 70% de plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de gota y los metabolitos secundarios con potencial biológico activo del extracto con mayor porcentaje de inhibición.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Obtener los extractos etanólicos al 70 % de las especies *Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (chilca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L. (ortiga), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (trébol), por el método de maceración y posteriormente realizar un proceso de liofilización.
2. Determinar el extracto que presenta mayor actividad inhibitoria de xantina oxidasa a través de un ensayo in vitro, de las especies en estudio y del fármaco patrón (alopurinol).
3. Realizar un nuevo proceso de extracción fraccionada con solventes de diferente grado de polaridad, de la especie vegetal que muestre mayor porcentaje de inhibición.

4. Determinar la actividad inhibitoria de xantina oxidasa in vitro de los extractos obtenidos de la extracción fraccionada.
5. Determinar cualitativamente la composición fitoquímica del extracto de la especie vegetal que presente mayor actividad inhibitoria de xantina oxidasa.
6. Realizar cromatografía en capa fina y cromatografía en columna para la separación de los compuestos del extracto con mayor porcentaje de inhibición.
7. Realizar los estudios: espectroscópico de UV y cromatográfico de HPLC del extracto con mayor actividad inhibitoria.

1.5. JUSTIFICACIÓN.-

El uso de plantas medicinales para tratar enfermedades es una situación que no ha perdido interés en el país y a nivel mundial, existen justificaciones para tal hecho, como son: el acceso difícil que se tiene a los hospitales en algunas zonas, el alto costo económico y emocional de los tratamientos, las reacciones adversas que se presentan por el uso de tratamientos farmacológicos, etc., motivos por los cuales el hombre pone su confianza en la medicina tradicional.

La investigación de diferentes especies ya sean animales, vegetales o minerales, en especial de aquellas que se piensa que tienen alguna propiedad curativa, se realizan con la finalidad de comprobar dicha propiedad a través de diversos estudios.

Es así que los descubrimientos que se realizan en las investigaciones de estas especies, ya sea en forma prevista o fortuita, no solo nos dará a conocer si es efectiva o no frente a un mal que padece el hombre, sino que también nos revelará si estamos frente a una alternativa terapéutica igual o mejor a las existentes en la actualidad.

Este estudio pretende contribuir con la investigación de la rica flora que poseemos, con la finalidad de aportar al estudio fitoquímico y farmacológico de las especies: ***Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L.**

(romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (Diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (Marcju), *Urtica urens* L. (ortiga), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (trébol), usadas tradicionalmente para el tratamiento y sintomatología de la gota.

Además posiblemente nos permitirá encontrar un tratamiento natural para la gota, que presente menos reacciones adversas y de bajo costo frente al alopurinol.

El modelo *in vitro* empleado, permitirá realizar un proceso de selección de las plantas que presenten un mayor porcentaje de inhibición, lo cual indicará que estas plantas son activas frente a la enzima.

1.6. HIPÓTESIS.-

- Los extractos etanólicos al 70% de las especies: *Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L. (ortiga), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (trébol), poseen diferente actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa y los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal con mayor porcentaje de inhibición son compuestos fenólicos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

CONCEPTUAL

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL.

2.1. ANTECEDENTES:

2.1.1. ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS.

- **ALKKHO KISKA *Acanthoxanthium spinosum* (L)**

- ❖ **CATÁLOGO DE PLANTAS MEDICINALES. 1994 (9)**

La especie *Acanthoxanthium spinosum* (L) presenta propiedades: antiinflamatorias, antipiréticas y antirreumáticas, para este último fin se usa toda la planta, se prepara un cocimiento de la planta con afrecho de trigo, una pisca de sal y agua tibia, toda la mezcla se aplica sobre la zona afectada.

- ❖ **MOSCOSO CASTILLA M . 1963 (10)**

Se recomienda el cocimiento de esta yerba para lavar las hinchazones del reumatismo añadiéndole un poco de sal y afrecho de trigo, debiendo ser el lavado con agua tibia.

- **CHILLCA *Baccharis chilco* H.B.K.**

- ❖ **MOSCOSO CASTILLA M . 1963 (10)**

Hay muchas variedades de esta planta. La chilca negra es la mejor para las curaciones de las fracturas, luxaciones, estirón de nervios y dolores reumáticos, casos en los que el cocimiento se emplea en forma de baños, procedimiento con el cual cede el malestar.

- ❖ **PALACIOS VACCARO JULIO. 1993 (11)**

Los incas la utilizaban para elaborar la llipta junto a la que consumían las hojas de coca masticándolas en la boca. Conocían también sus virtudes medicinales usándola como antirreumático: "su cocimiento aplicado en las coyunturas hace grandes efectos", también se usaron

como analgésico, antiinflamatorio y antiespasmódico por aplicación local de las hojas soasadas. Si al cocimiento se le añaden hojas de molle y bastante sal, deseca y enjuaga las piernas de los gotosos.

Desde los tiempos del incanato se conocen la yanachillca o chillca negra y la yulacchillca o chillca blanca. La yanachillca se usa en curaciones, tiene hojas alargadas muy pequeñas y pegajosas.

- **MARCJU *Ambrosia arborescens* Mill.**

- ❖ **MOSCOSO CASTILLA M . 1963 (10)**

Friccionando el cocimiento de las hojas en vino a los paralíticos, alcanza a curarlos con toda facilidad. Las semillas molidas y puestas en cocimiento en un buen vino, tomado por las mañanas en la cantidad de una copa es un buen vermífugo. Este mismo remedio cura el reumatismo de cualquier parte del cuerpo, haciendo fricciones y abrigando las partes adoloridas con una tela de lana.

- ❖ **BECERRA GALLARDO ROGER, SIGÜEÑAS SAAVEDRA MANUEL (12)**

Ambrosia arborescens Mill presenta propiedades: gastrálgicas (infusión de las hojas), antirreumático (cocimiento de la planta), menstruación retardada (infusión de la planta), antineurálgico (cocimiento de la raíz).

- **PINCO PINCO *Ephedra americana* H. & B**

- ❖ **PALACIOS VACCARO JULIO. 1993 (11)**

Fue usada por los antiguos peruanos que la consideraban como remedio universal para varias enfermedades.

Se usaba medicinalmente entre los indígenas como astrigente, antiinflamatorio, hemostático, diurético y antidisentérico. Mezclados sus polvos con sal y clara de huevo sueldan las fracturas de los huesos. Se usa también en afecciones bucales como piorrea e inflamación de las encías. Por la propiedad de

curar los huesos fracturados en algunos lugares se le llama "suelta con suelta"

❖ **CATÁLOGO DE PLANTAS MEDICINALES. 1994 (9)**

La especie efhedra andina posee propiedades antidisentéricas, hemostáticas, antiinflamatorias y diuréticas, se usan el cocimiento de raíz, tallos y hojas el cual debe ser bebido.

• **ROMERO. *Rosmarinus officinalis* L.**

❖ **AGAPITO T. SUNG I. 2000 (13)**

Las hojas son un estimulante nervioso eficaz. También para la amenorrea, cirrosis, litiasis biliar, reumatismo, gota, fibrosis uterina. Así mismo para aliviar dolores articulares y musculares (hacer fricciones).

❖ **CUADROS J. MANUEL. 1939 (14)**

Las hojas frescas sirven para preparar alcoholaturos. Las hojas secas, para preparar la tintura, la cual entra en la preparación de frotaciones y linimentos, para las afecciones reumáticas.

❖ **MOSCOSO CASTILLA M . 1963 (10)**

En casos de reumatismo se fricciona la parte afectada entibiando con una cosa caliente y se consigue buenos resultados. Las fricciones de romero hervido dan buenos resultados en casos de luxaciones y fracturas.

❖ **TRÉBOL. *Medicago lupulina* L.**

❖ **FITOTERAPIA. 2003 (15)**

Se ha comprobado que previenen la osteoporosis al inhibir la resorción ósea. Las flores secas se han empleado popularmente como expectorante, antiinflamatorio y cicatrizante.

❖ **MOLLE *Schinus molle* L.**

❖ **CATÁLOGO DE PLANTAS MEDICINALES. 1994 (9)**

Se usa tradicionalmente para afecciones respiratorias, como antirreumático, antiparasitario, cicatrizante, depurativo y hemostático. En medicina folklórica las hojas y las flores se utilizan como cataplasmas calientes contra el reumatismo y otros dolores musculares. Las hojas en infusión junto con hojas de eucalipto, y en inhalaciones, son usadas para el alivio de afecciones bronquiales.

Se trata de una planta ampliamente utilizada por la medicina tradicional. A su corteza y resina se le han atribuido propiedades tónicas, antiespasmódicas y cicatrizantes y la resina es usada para aliviar las caries. Al frotarse en la piel genera una sustancia que aleja a los mosquitos. Los frutos fresco en infusión se toman contra la retención de orina. Las hojas hervidas y los baños con el agua de las hojas en decocción, sirven como analgésico, cicatrizante y antiinflamatorio de uso externo, y las hojas secas expuestas al sol se usan como cataplasma para aliviar el reumatismo.

❖ **ORTIGA *Urtica urens* L.**

❖ **CATÁLOGO DE PLANTAS MEDICINALES. 1994 (9)**

Se utiliza las hojas secas cocidas en agua para el tratamiento del reumatismo y artritis, para la hipertensión y hemorragia nasal.

❖ **FITOTERAPIA.2003 (15)**

Las hojas (sumidad): diurético. Las hojas frescas en aplicación tópica son rubefacientes. Raíces: diurético, antiinflamatorio, con una acción específica, sobre el tejido prostático.

La administración oral de una fracción de raíz de ortiga mostró una actividad antiinflamatoria comparable a la de la indometacina.

También está indicada como coadyuvante en el tratamiento de afecciones reumáticas.

Popularmente se utilizan los puntos machacados y aplicados en forma de cataplasmas para tratar problemas dermatológicos y afecciones reumáticas.

- **DIENTE DE LEÓN *Taraxacum officinale* Wiggers.**

- ❖ **CATÁLOGO DE PLANTAS MEDICINALES. 1994 (9)**

La raíz se considera tradicionalmente, colerético y colágogo. Las hojas se utilizan popularmente como diurético.

Popularmente la planta entera se considera depurativa y laxante suave, utilizándose en el tratamiento de eccemas y otras afecciones cutáneas, gota y trastornos reumáticos.

Puede actuar en el hígado, riñón y la vesícula biliar, y con su efecto diurético evitar la aparición de piedras en el riñón.

También es un tónico digestivo contra el estreñimiento y la resaca de alcohol. Para uso tópico es eficaz para limpiar la impurezas de la piel, acné, urticaria. Estas propiedades son por su contenido de inulina, ácidos fenólicos, sales minerales, entre otras sustancias que aportan beneficios en la piel. En algunos periodos de escasez, se ha utilizado como sustituto de la achicoria, que a su vez era sustituto del café. Sus hojas comestibles se han utilizado para ensaladas.

- **MADRE KISA *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg**

- ❖ **IBARRA SOSA, FLORA FANEROGÁMICA. (16)**

Planta herbácea, ramificada, contortoso, hojas simples pecioladas, pinnatisecta, cubierta de pelos urticantes. Flores axilares hermafroditas de color anaranjado, androceo formado por numerosos estambres, gineceo con ovario ínfero, fruto capsular.

2.1.2. ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS.-

- **ALKHOKISKA (*Acanthoxanthium spinosum* L.)**

- ❖ **SALINAS A, DE RUIZ R. Y RUIZ S. 1998 (17)**

Reportaron en su estudio: "Esteroles, Flavonoides y Lactonas Sesquiterpénicas aisladas de *Acanthoxanthium spinosum* L. Cronquist (Asteraceae)" donde se aisló en la fracción soluble en éter de petróleo, un esteroles identificado como beta-sitosterol. Además, aplicando la técnica de extracción con solventes de polaridad creciente se aislaron, en el extracto correspondiente al acetato de etilo, un pigmento flavonoide como genina, cuya identificación corresponde a quercetina y en el extracto de metanol cuatro flavonoides al estado de glicósidos siendo ellos pendulina, ioceína, centaurina y 3-O-glicósido patuletina. Por otro lado, mediante una técnica adecuada se aislaron dos lactonas sesquiterpénicas: frullania lactona y douglanina.

- **CHILLCA (*Baccharis chilco* H.B.K.)**

- ❖ **PALACIOS VACCARO JULIO. 1993 (11)**

Baccharis chilco contiene taninos, flavonoides, triterpenoides, esteroides y saponinas.

- ❖ **ALVARADO CHÁVEZ BRITT. 2007 (18)**

En su estudio realizado en la Cordillera Negra (Ancash), reportó que esta especie presenta: azúcares reductores, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, taninos, alcaloides, aminoácidos libres.

- **MARCJU (*Ambrosia arborescens* Mill.)**

- ❖ **FITOICA. 2009 (19)**

Contiene: taninos, triterpenoides y/o esteroides, catequinas, flavonoides, saponinas y compuestos con anillo lactónico.

❖ **ALVARADO CHÁVEZ BRITT. 2007 (18)**

Publica en sus resultados que el maraju contiene: antraquinonas, azúcares reductores, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, taninos, alcaloides, aminoácidos libres.

• **PINCO PINCO (*Ephedra americana* H. & B.)**

❖ **PALACIOS VACCARO JULIO. 1993 (11)**

Alcaloides: efedrina, pseudoefedrina, N-metil efedrina, taninos y flavonoides.

• **ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.)**

❖ **BALLÚS PURI . 2005 (20)**

Hojas, flores y tallos contiene un aceite esencial, cuya proporción varia según la época de recolección y el clima a que ha estado sometida la planta. Poseen además ácidos orgánicos, un glucósido, saponina y un principio amargo.

❖ **PAHLOW M .1985 (21)**

Aceite esencial, taninos, un poco de saponina, ácidos vegetales, sustancias amargas y flavonoides.

❖ **TRÉBOL (*Medicago lupulina* L.)**

❖ **FITOTERAPIA. 2003 (15)**

Parte utilizada sumidad florida. Contiene cumestrol y alrededor de un 2% de isoflavonas derivadas de la genisteína, daidzeína, formononetin y biochanina A.

- **MOLLE (*Schinus molle* L.)**

- ❖ **CONGRESO DE TERAPIAS ALTERNATIVAS UNIVERSIDAD DE WEINER LIMA -PERU . APORTE DE LOS VEGETALES EN LA ETNOMEDICINA (2007) (22)**

En los frutos de *Schinus molle* se encuentra: cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinosido y peonina-3-glucósido; en corteza y hojas: ácido linoleico y linolénico, lignoglicérico y esteárico. Además se ha reportado la presencia de α -amirina, fisetina, ácido gálico, glucosa y fructosa, piperina, ácido pirocatéquico, quercetina, quercetrina, rutina, β -sitosterol, taninos, preisocalamenediol.

- ❖ **DOMÍNGUEZ XA, CARMONA JF, VENEGAS RBD (1971) (23)**

La composición química de *Schinus molle* es compleja y varía en función del órgano o parte de la planta. Los frutos contienen aceite esencial (3 a 5%) donde predominan componentes como α y β -felandreno, bespatuleno, D-limoneno, silvestreno, α y β -pineno, perillaldehído, carvacrol, mirceno, canfeno, *o*-etil-fenol, *p*-cimeno y *p*-cimol como componentes mayoritarios. La corteza contiene aproximadamente un 23% de taninos y gomoresina (55% de resina y 40% de goma). Las hojas contienen entre 0,2 y 1% de aceite esencial (con predominio de felandreno y carvacrol), flavonoides (miricetina, quercetina, kaempferol), proantocianidinas, ácidos grasos y esteroides. Las semillas secas contienen aproximadamente un 8% de proteínas y un 10% de lípidos.

Los frutos contienen una oleoresina de la que se han aislado diversos triterpenos. Estos son mayoritariamente tetracíclicos, derivados del eufano (20*R*) y tirucallano (20*S*), y en general poseen funciones alcohol o ceto en C-3, aldehído en C-21 y ácido ó éster en C-27. Además, los derivados 3-hidroxi presentan posibilidades isoméricas, habiéndose aislado indistintamente los compuestos 3 α - y 3 β -hidroxi.

❖ **ORTIGA (*Urtica urens*)**

❖ **CATÁLOGO DE PLANTAS MEDICINALES. 1994 (9)**

Contiene tanino, histamina, ácido fórmico, clorofila, hierro, calcio, vitamina A, C y K.

❖ **FITOTERAPIA. 2003 (15)**

Las hojas y planta fresca contienen clorofila a y b (2,5 - 3%), carotenoides (beta caroteno), flavonoides derivados del quercetol, kaemferol y ramnetol, sales minarales (Fe^{3+} , Ca^{2+} , sílice, azufre, potasio, manganeso).

En los tricomas (pelos urticantes) acetilcolina, histamina, serotonina. Raíces: 0.1% de aglutinina (lectina).

• **DIENTE DE LEÓN (*Taraxacum officinale* Wiggers)**

❖ **CATÁLOGO DE PLANTAS MEDICINALES. 1994 (9)**

Constituyentes, raíces: lactonas sesquiterpénicas tipo germacranólido y eudesmanólico, inulina (2% que se encuentra hasta un 40% en otoño) alcoholes triterpénicos pentacíclicos (taraxa esterol y sus derivados hidroxilados) fitosteroles.

Hojas: lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, fitoesteroles, flavonoides. Abundantes sales potásicas (hasta con 4.5%).

• **MADRE KISA (*Caiohora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg.).**

❖ **Khera S, Woldemichael GM (2003) (24)**

En el estudio realizado a una de las especies pertenecientes a la familia Loasaceae se encontraron los constituyentes: triterpeno, 1 beta, 3 beta-dihidroxi-12-en-27- ácido oic 1, iridoid, 1 alpha-metoxi-6 alpha, 10-dihidroxi isoeipiiridomirmecin (caiohoraenina).

2.1.3. ANTECEDENTES SOBRE ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE XANTINA OXIDASA.

❖ **MURATA et al. 2009 (25)**

En su estudio: "**Hydroxychavicol: a potent xanthine oxidase inhibitor obtained from the leaves of betel, *Piper betle***" se realizaron una selección de plantas Piperáceas con actividad inhibitoria de xantina oxidasa, el estudio reveló que las hojas de *Piper betle* poseen una potente actividad sobre dicha enzima. La purificación de este extracto permitió obtener hidroxiclavicol como principio activo, el cual sería un potente inhibidor comparado con el alopurinol.

❖ **KONG L.D, CAI Y, W.W. HUANG, CHRISTOPHER CHENG, R.X. TAN. 2000 (26)**

En su estudio: "**Inhibition of xanthine oxidase by some Chinese medicinal plants used to treat gout**", se analizaron un total de 122 plantas medicinales chinas, usadas tradicionalmente para el tratamiento de gota y otras patologías relacionadas a hiperuricemia, las cuales fueron evaluadas por la actividad inhibitoria de la enzima. Cada planta fue extraída con metanol y agua. De los 112 extractos metanólicos, 69 mostraron actividad inhibitoria a 100µg/mL, de los cuales 29 extractos presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 50%. De los 112 extractos extraídos con agua, 40 presentaron actividad inhibitoria a 100µg/mL, de los cuales 13 extractos presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 50%.

❖ **GONZÁLEZ G. ANTONIO et al. 1995 (27)**

En su estudio: "**Xanthine oxidase inhibitory activity of some Panamanian plants from Celastraceae and Lamiaceae**", donde se preparó treinta y cuatro extractos crudos de plantas Panameñas, a partir de cinco especies de la familia Celastraceae y cuatro de la familia Lamiaceae, que fueron sometidos al

ensayo de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa. La actividad enzimática fue estimada por incremento de la absorbancia a 290nm debido a la formación de ácido úrico, 85% de los extractos crudos mostraron actividad inhibitoria a 50µg/ml y todos los extractos de las especies pertenecientes a la familia Lamiaceae fueron activos, incluso usando 1 µg/ml. Los extractos etanólicos de *Hyptis obtusiflora* Presl ex Benth (Lamiaceae) y *H. lantanaefolia* Poit. (Lamiaceae) mostraron una gran actividad inhibitoria con una inhibición de aproximadamente 40% a 1 µg/ml.

❖ **SWEENEY A.P, WYLLIE S.G, SHALLIKER R.A, MARKHAM J.L. 2001 (28)**

En su estudio: "**Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants**", veintiocho extractos de 17 especies de plantas nativas Australianas usadas tradicionalmente como antiinflamatorios, por personas autóctonas de Australia fueron analizadas para la inhibición de la enzima xantina oxidasa. Los extractos de nueve especies mostraron un porcentaje de inhibición superior al 25% a 100 µg/ml.

Los extractos de tres especies *Clerodendrum floribundum* R. Br. (Verbenaceae), *Eremophila maculata* (Ker Gawler) (Myoporaceae) y *Stemodia grossa* Benth. (Scrophulariaceae) mostraron una gran actividad inhibitoria de 84, 61 y 57%, respectivamente, otras cuatro especies también mostraron actividad inhibitoria mayor al 40% a esta misma concentración.

❖ **OWEN L.P, JOHNS T. 1999 (29)**

En su estudio: "**Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout**", donde la actividad inhibitoria de xantina oxidasa fue ensayada en 26 especies pertenecientes a 18 familias tradicionales, usadas para el tratamiento de gota y síntomas relacionados por las personas autóctonas del noreste de Norteamérica. El grado de inhibición fue determinado por medición del incremento de la

absorbancia a 290nm asociado con la formación de ácido úrico. El 88% de las plantas mostraron actividad inhibitoria a la concentración de 100 µg/ml, de los cuales un 20% mostro un porcentaje de inhibición mayor al 50%. *Larix laricina* muestra un alto porcentaje de inhibición 86.33%. También se señala que el porcentaje de inhibición de la actividad de xantina oxidasa está relacionado con el contenido total de fenoles y taninos.

❖ **FERRAZ FILHA Z.S et al. 2006 (30)**

En su estudio: “**Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil (Arnica)**”, veintidós extractos de cinco especies de *Lychnophora* y una especie *Lychnophoriopsis*, usadas tradicionalmente en Brasil como analgésico, antiinflamatorio y para el tratamiento de heridas y reumatismo fueron analizadas para determinar la actividad inhibitoria de xantina oxidasa, 16 extractos mostraron una excelente actividad inhibitoria de xantina oxidasa, con una un porcentaje de inhibición mayor al 38% a 100 µg/ml. Las plantas más activas fueron: *Lychnophora trichocarpha*, *Lychnophora ericoides*, *Lychnophora staavioides* y *Lychnophoriopsis candelabrum*, con porcentaje de inhibición de 77, 78, 66 y 63% a 100 µg/ml respectivamente.

❖ **UNNO TOMONORI, SUGIMOTO AKIO, KAKUDA TAKAMI. 2004 (31)**

En el estudio: “**Xanthine oxidase inhibitors from the leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers.**”, determinaron la actividad inhibitoria de xantina oxidasa por las hojas de *Lagerstroemia speciosa* (L.) Pers. (Lythraceae), que es usada tradicionalmente en la medicina folklórica de Filipinas. Usando una técnica de fraccionamiento guiado, dos componentes fueron aislados de los extractos acuosos de las hojas de *Lagerstroemia speciosa*, denominada: Valoneic acid dilactone y Ellagic acid. Los resultados

demonstraron que la actividad inhibitoria de xantina oxidasa por valoneic acid dilactone fue superior a la del alopurinol.

❖ **NORO TADATAKA, ODA YASUSHI et al. 1983 (32)**

En el estudio: **“Inhibitors of Xanthine Oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa*”**, realizó el aislamiento e identificación de los principios activos de las flores y yemas de la planta *Daphne genkwa* (Thimelaceae), como son la genkwanina, apigenina, luteolina – 7 metil eter, y luteolina. De los cuales, apigenina y luteolina, muestran una fuerte actividad inhibitoria de la xantina oxidasa. Es el primer reporte de aislamiento de luteolina - 7 metil eter y luteolina de flores y yemas.

❖ **ISAZA M. JOSE HIPOLITO, GARCIA V. ANDREA et al. 2007 (33)**

En el estudio: **“Determinación Espectrofotométrica de la Actividad Inhibitoria de Xantina Oxidasa en extractos de algunas plantas melastomataceas”**; se realizó una extracción en fase sólida con isopropanol grado analítico (iPr – OH): agua en diferentes proporciones (30:70, 1:1, 70:30), de 14 especies de la familia Melastomataceae. Para evaluar el comportamiento de estos extractos, estandarizaron un método de cuantificación de ácido úrico indirecto, utilizando uricasa, para obtener un cromógeno violeta (555nm). Se obtuvo dos fracciones, donde en la fracción 1: *Miconia coronata* Bonpl, *Tibouchina ciliaris* Vent, y *Tococa guianensis* Aubl, mostraron mayor actividad inhibitoria de la enzima xantina oxidasa. En la fracción 2, los que mostraron mayor actividad fueron: *Miconia coronata* Bonply *Tibouchina ciliaris* Vent.

❖ **UMAMAHESWARI M, K. ASOKKUMAR et al. 2009 (34)**

En el estudio: **“In vitro xanthine oxidase inhibitory activity of the fractions of *Erythrina stricta* Roxb”**, realizaron un ensayo in vitro de la actividad inhibitoria de varias fracciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Erythrina stricta* y determinaron el

mecanismo de acción de la inhibición de la enzima. Para lo cual utilizaron un método espectrofotométrico en condiciones aeróbicas, donde el grado de inhibición enzimática, fue determinado midiendo el incremento de la absorbancia a 295nm, asociada a la formación de ácido úrico.

De las fracciones ensayadas, la clorofórmica muestra un alto porcentaje de inhibición (50%), seguida de las fracciones etérea y de etil-acetato.

❖ **IIO MASAYOSHI, MORIYAMA AYAKO, et al. 1985 (35)**

En el estudio: **“Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids”**, evaluaron la influencia de 19 flavonoides sobre la enzima xantina oxidasa. La actividad de la enzima fue determinada, midiendo el incremento de la absorbancia a 290 nm de la formación de ácido úrico. Así como un método colorimétrico para medir la formación de peróxido de hidrógeno generado a partir del ácido úrico por la uricasa.

De los flavonoides evaluados, la myricetina, kaempferol, quercetina, fisetina, quercitrina mostraron un porcentaje de inhibición de la enzima mayor al 50%. La crisina y naringenina, mostraron moderada actividad inhibitoria. Mientras los demás flavonoides no mostraron actividad inhibitoria significativa.

❖ **JUNG-FENG HSIEH, SHIH-HSIUNG WU, et al. 2007 (36)**

En el estudio: **“The screening and characterization of 6-aminopurine-based xanthine oxidase inhibitors”**, determinaron la actividad inhibitoria de la 6-aminopurina (adenina). La actividad inhibitoria de la 6-aminopurina y sus análogos fue comparada con la del alopurinol.

Mostrando los análogos, 6-cloro-(metilamino) purina y aminopirazol [3,4-d] pirimidina, potente actividad inhibitoria de la xantina oxidasa. Así como, el estudio cinético mostró que 2-cloro-6 (metilamino) purina es no competitivo, mientras que 4-aminopirazol

[3,4-d] pirimidina muestra un efecto competitivo contra la xantina oxidasa.

❖ **LING DONG KONG, CHEN YANG et al. 2004 (37)**

En el estudio: **“A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice”**, utilizaron Ermiao wan, medicina china utilizada en forma exitosa para el tratamiento de gota, compuesta por la corteza de phellodendri y el rizoma de atractylodis, 840 y 480 mg/kg/día por vía oral, por 7 días. Donde demostraron que poseían potente actividad hipouricémica en ratones hiperuricémicos, tratados previamente con oxonato, y ratones normales.

En los ratones hiperuricémicos el efecto del Ermiao wan fue igual a la droga patrón, alopurinol (10mg/kg/día por 7 días), pero en los ratones normales el efecto fue más temprano. Además ambos Ermiao wan y la corteza de phellodendri tienen relativa actividad inhibitoria de la enzima hepática deshidrogenasa y xantina oxidasa.

❖ **SCHMEDA-HIRSCHMANNG., ZUÑIGA. J.1996 (38)**

En el estudio: **“Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Flavonoids and Tannins from *Hexachlamys edulis* (Myrtaceae)”**, aislaron el ácido gálico, miricitrina (desmantina-1), (-)-epigallocatecina-3-O-gallate y entagaloilglucosa a partir del extracto de acetona: agua de *Hexachlamys edulis*. De los cuales el ácido gálico muestra una actividad inhibitoria no competitiva de la enzima xantina oxidasa y un porcentaje de inhibición del 50%.

2.2. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.-

2.2.1. ASPECTOS BOTÁNICOS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO:

- **ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: ALKKHOKISKA**
(*Acanthoxanthium spinosum* (L))

- ❖ **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:**

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Magnolipsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Acanthoxanthium*

Especie: *Acanthoxanthium Spinosum* (L) Fourreau



Fuente: <http://wolf.mind.net>¹

- ❖ **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.-**

Planta herbacea anual de 30 - 80 cm, monoica, tallo recto más o menos grueso.

Hojas: Cortamente pecioladas, lanceoladas, de enteras a pinnatipartidas en tres lóbulos, con tres espinas amarillentas en su base y tomento gris en el envés.

Capítulos: Unisexuales con flores tubulosas, numerosas en los masculinos y sólo 2 en los femeninos.

Infrutescencia: El capítulo femenino se transforma en infrutescencia espinosa, menor de 13 mm de longitud, cubierta de agujones y con dos picos en su extremo.

Flores: De dos tipos, son de color amarillento o verdoso. Las productoras de polen nacen sobre cortas ramillas terminales. Las productoras de semillas surgen arracimadas en las axilas de las hojas.

Semillas: Las semillas estan encerradas en una especie de fruto granado llamado aquenio. Éste consiste en un pequeño y duro cadillo de forma ovalada, dividido en dos cámaras, recubierto de espinas rígidas y ganchudas.

❖ **HÁBITAT:**

Crece en climas templados; borde de caminos, basurales, en viejas ruinas olvidadas, campos olvidados, etc.

Se distribuye en la sierra y amazonia entre los 2000 y 3500 m.s.n.m

• **ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: CHILLCA (*Baccharis chilco* H. B.KI)**

❖ **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:**

Reino:Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden:Asterales

Familia:Asteraceae

Género:*Baccharis*

Especie:*Baccharis chilco* H. B.KI



Fuente:http://wc.pima.edu/Bfiero/tucsonecology/plants/shrubs_sewi.htm²

❖ DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.-

Arbusto de 1 a 1.5 metros de alto.

Tallo: Muy ramificado, densamente folioso.

Hojas: Simples, subsésiles, de disposición alterna, forma aovada espatulada, con dientes marginales más o menos gruesas hasta el ápice y algo cóncavo atenuados hacia la base, miden de 0.5 a 3 cm de largo por 0.3 a 1.8cm de ancho, de color verde intenso brillante.

Inflorescencias: Cabezuelas o capítulos numerosos, sésiles, cortamente pedunculados ya sea en las axilas de las hojas superiores o a lo largo de las ramas terminales.

Los capítulos femeninos con involucre cilíndrico y con brácteas dispuestas más o menos en cuatro series, las externas aovadas semiobtusas y las internas angostamente aovadas. Receptáculo cónico, alveolado.

Flores: En escaso número con la corola algo filiforme y con el ápice biselado y dentado.

Aquenos glabros con un disco anular en la parte superior y lateralmente hasta con diez costillas. Pappus algo amarillento.

Capítulos masculinos con involucre cilíndrico acampanado con brácteas dispuestas en tres series, las externas aovadas y las internas elípticas. Receptáculo cónico, alveolado. Flores con corola tubulosa, limbo ensanchado y pentapartido de color blanco.

❖ HÁBITAT:

Distribuida en Costa y Sierra. Crece todo el año en terreno húmedo: acequias y orillas de los ríos. Se encuentra a nivel del mar y entre los 1200 a 2500 msnm. Arequipa, Lima, Cusco y Junín.

- **ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: MARCJU (*Ambrosia arborescens* Mill)**

❖ **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.-**

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Ambrosia*

Especie: *Ambrosia arborescens* Mill



Fuente: intranet.inc-cusco.gob.pe³

❖ **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:**

Arbusto erecto, ramificado de 0.5 -1 m. de altura. Tallos ramificados, hojas simples alternas, pecioladas bipinnatisectas pubescentes en haz y envés de 5-8 cm de largo por 2-3.5 cm de ancho. Capítulos masculinos dispuestos en racimos terminales en poco número, tubulosos, amarillos.

- **ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: PINCO PINCO (*Ephedra americana*)**

❖ **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.-**

Reino: Vegetal

División: Gnetophyta

Clase: Gnetopsida

Orden: Ephedrales

Familia: Ephedraceae

Género: *Ephedra*

Especie: *Ephedra americana* H. & B.



Fuente: intranet.inc-cusco.gob.pe³

❖ **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.-**

Arbusto muy ramificado, erguido o decumbente. Sus hojas son opuestas o verticiladas, generalmente caducas, quedan reducidas a escamas muy pequeñas por lo que la fotosíntesis se realiza en el tallo cilíndrico y nudoso. Sus flores: dioicas, unisexuales, las flores masculinas nacen en estróbilo compuesto, cada flor masculina contiene de uno a ocho estambres y queda rodeada de dos brácteas pequeñas. Los estambres son monodelfos y están soldados por sus filamentos. La flor femenina está protegida por un involucro de brácteas, consta de un solo óvulo, posee tegumento prolongado a modo de estilo. Fruto: nuculiforme (semejante a una nuez), de color rojo y sabor ácido.

❖ **HÁBITAT:**

Se le encuentra en la sierra y en algunos lugares baja hasta las lomas situadas cerca al mar. Cusco: Valle del Vilcanota 3400 msnm, Sacsayhuaman 3600 msnm, Pampa de Anta 3400 msnm, Arequipa: Tiobaya 2100 msnm, Huánuco, Junín: Yanahuanca 3000 msnm, Amazonas: Chachapoyas, Lima: Matucana 2400 msnm, Puno: Altos de Toledo 4900 msnm.

- **ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.)**

- ❖ **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.-**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: Rosmarinus

Especie: *Rosmarinus officinalis*



FUENTE: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

- ❖ **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.-**

El romero es un arbusto leñoso de hojas perennes muy ramificado, puede llegar a medir 2 metros de altura, con tallos jóvenes borrosos (aunque la borra se pierde al crecer) y tallos añosos de color rojizo y con la corteza resquebrajada.

Las hojas, pequeñas y muy abundantes, presentan forma linear. Son opuestas, sésiles, enteras, con los bordes hacia abajo y de un color verde oscuro, mientras que por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de vellosidad. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos.

Las flores son de unos 5 mm de largo. Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado.

Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas (contienen miel), se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados soldados a la corola y con un pequeño diente.

El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraquenio, de color parduzco.

❖ **ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: TRÉBOL (*Medicago lupulina* L.)**

❖ **CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA**

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

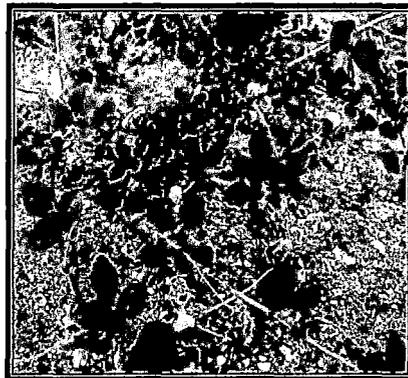
Clase: Magnoliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Medicago*

Especie: *Medicago lupulina* L.



FUENTE: <http://Wikipedia.org/imagenes.4>

❖ **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.-**

Es una planta baja, a menudo extendida, pubescente, anual o perenne, de hasta 60 cm. Hojas con tres folíolos redondeados oblongos, generalmente de punta fina, dentados; estípulas lanceoladas aovadas. Flores amarillas, diminutas de 2-3 mm, 10-50 en inflorescencias densas redondeadas en largos cabillos desde axilas foliares. Vaina arriñonada, negra cuando madura y

oscuramente de nervios reticulados. Florece desde la primavera y hasta el otoño.

❖ HÁBITAT

Habita en lugares de hierba, tierras baldías, riberas secas, cunetas y muros. No prospera en las zonas secas de piedra caliza y las dunas costeras, donde sufre menos la competencia de otras plantas. Es relativamente resistente al frío y puede ser vista en las montañas de hasta 1800 msnm.

• ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: MOLLE (*Schinus molle* L.)

❖ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Schinus*

Especie: *Schinus molle* L.



Fuente: wikipedia.org/imagenes⁴

❖ DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Las hojas son compuestas imparipinnadas, grandes, lampiñas, con numerosas hojuelas largas y estrechas, con disposición alterna y terminadas en punta; su borde es entero o raramente serrado. Flores hermafroditas o unisexuales, de pequeño tamaño, dispuestas en un gran número en panículas colgantes terminales y

axilares; son de color amarillo, tienen un cáliz con cinco lóbulos, cinco pétalos, diez estambres y un pistilo, rematado en tres estilos. Al madurar este último, origina una drupita del tamaño de un grano de pimienta, de color rosa brillante, con muy poca carne y un solo hueso; al romperlo desprende un agradable olor, algo resinoso, a pimienta.

❖ HÁBITAT

Se encuentra de forma espontánea, desde el sur de México hasta el norte de Chile y centro de Argentina, especialmente en el Perú, de donde fue llevado a Europa por los españoles. En Europa se cultiva en parques, paseos y avenidas es muy resistente a la sequía y a las altas temperaturas, aunque no aguanta bien las heladas. En España, es frecuente su cultivo, en las provincias más cálidas, especialmente en el Levante y Andalucía.

❖ ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: ORTIGA (*Urtica urens* L.)

❖ CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Urticaceae

Género: *Urtica*

Especie: *U. urens* L.



FUENTE: wikipedia.com.imágenes⁴

❖ DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La *Urtica urens* L. es una especie de la familia de las Urticaceae. Se trata de una especie cosmopolita.

Es un arbusto con follaje persistente, tallo cuadrangular, hojas alternas, grandes, con pelos urticantes, flores lilas. Florece de otoño a primavera y fructifica en primavera.

La característica más conocida de esta planta es presencia de pelos urticantes cuyo líquido cáustico (acetilcolina) produce una irritación con picor intenso en la piel cuando se la toca o roza.

• ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: DIENTE DE LEÓN (*Taraxacum officinale* Wiggers)

❖ CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Taraxacum*

Especie: *Taraxacum officinale* Wiggers.

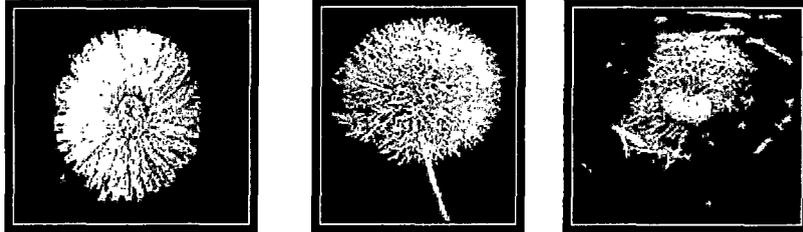


Fuente: wikipedia.com.imágenes⁴

- ❖ **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.** Esta planta vivaz, anual y perenne con raíz primaria y roseta basal, no suele alcanzar más de 40-50 cm. Tiene hojas alternas, sin peciolo diferenciado, pinnatipartidas con lóbulos en forma triangular de márgenes dentados y agudos. Pedúnculos de la inflorescencia huecos. Flores hermafroditas de un

color amarillo dorado que la hacen fácilmente identificable. Corola en lígulas terminada en cinco pequeños dientes. El fruto es una cipsela o aquenio con vilano.

- ❖ **HÁBITAT:** Se encuentra fácilmente en los caminos, pastizales, prados, siembra directa, y sobre todo en jardines.



Fuente: wikipedia.com.imágenes⁴

- **ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE: MADRE KISA**
(*Caiohora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg)

- ❖ **CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Violales

Familia: Loasaceae

Género: *Caiohora*

Especie: *Caiohora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg



Fuente:© S. Vogel⁵

- ❖ **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

Planta herbácea, ramificada, contortoso, hojas simples pecioladas, pinnatisecta, cubierta de pelos urticantes. Flores axilares hermafroditas de color anaranjado, androceo formado por numerosos estambres, gineceo con ovario ínfero, fruto capsular.

2.2.2. GOTA

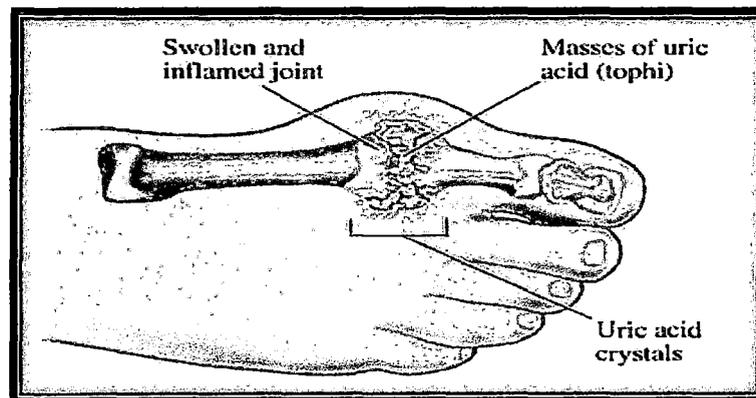
2.2.2.1. DEFINICIÓN

La gota es una enfermedad que resulta del depósito de cristales de urato monosódico, causado por la sobreproducción o la hipoexcreción de ácido úrico. Generalmente, pero no siempre, la enfermedad se asocia a una elevación de los niveles de ácido úrico en plasma. Las manifestaciones clínicas incluyen artritis aguda y crónica, tofos, enfermedad renal intersticial y nefrolitiasis por cálculos de ácido úrico. (1)

La gota deriva su nombre del latín "gutta" (gota) reflejando la creencia que la enfermedad era causada por un humor malevolente que caía o "goteaba" en articulaciones debilitadas.

Había una cierta sabiduría en esta concepción: la gota es el síndrome clínico producido por una anomalía en el metabolismo del ácido úrico, que resulta del depósito de cristales de uratos (urato monosódico monohidratado) en estructuras del interior de las articulaciones, tejidos blandos y tracto urinario.

Es la causa más común de artritis inflamatoria en varones menores de 40 años, y es frecuentemente diagnosticada en la práctica clínica.



FUENTE: 2009 Nucleus Medical Media, Inc.⁶

2.2.2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La gota es 5 a 8 veces más común en hombres que en mujeres. Típicamente se presenta durante la edad media de la vida, y es infrecuente antes de los 30 años. Las mujeres raramente presentan ataques de artritis gotosa antes de la menopausia. El prototipo del paciente que sufre su primer episodio de

gota es un varón entre 40 y 50 años de edad, casi siempre algo obeso, aficionado a la buena comida (donde la carne y el pescado sean abundantes), y que consume habitualmente alcohol.(39)

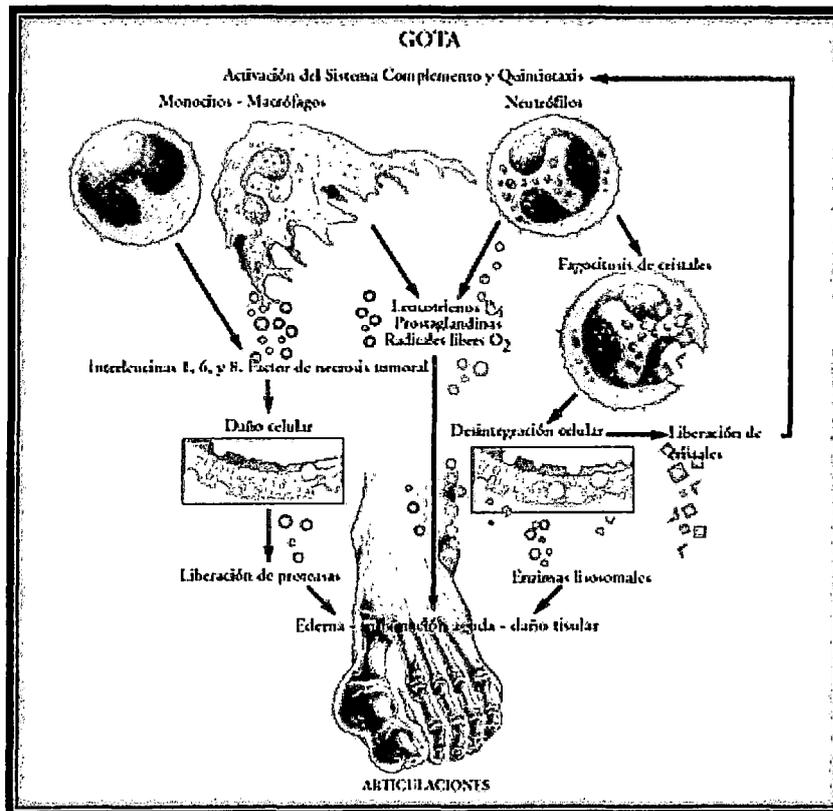
2.2.2.3. ETIOPATOGENIA

La hiperuricemia es un factor de riesgo para el desarrollo de gota, aunque la relación exacta entre hiperuricemia y gota aguda es aún poco clara. La hiperuricemia es definida como una concentración sérica de ácido úrico superior a 7 mg/dl. En los hombres la uricemia se eleva con la pubertad y luego año a año gradualmente, en las mujeres el aumento es brusco con la menopausia. A mayor concentración sérica de ácido úrico, y a mayor duración de la hiperuricemia, el riesgo de desarrollar gota se incrementa paralelamente. Por ejemplo, en hombres con una concentración plasmática de 7 mg/dl de ácido úrico el riesgo es aproximadamente 0.5 %/año, y éste índice aumenta a aproximadamente 5 %/año si las concentraciones séricas son mayores a 9 mg/dl. Sin embargo, la gota puede presentarse en presencia de concentraciones séricas normales de ácido úrico, y por el contrario, algunos individuos con hiperuricemia nunca experimentan un ataque.

2.2.2.4. CAUSAS

El ácido úrico es uno de los productos de desecho del organismo que, en condiciones normales, se elimina a través de la orina. Cuando se produce una cantidad mayor que la que se puede filtrar y eliminar por los riñones, se acumula, formando cristales. Asimismo, un deficiente funcionamiento de los riñones o la ingestión de cantidades exageradas de alimentos que contienen purinas, como carnes rojas, mariscos, arvejas y porotos, bebidas alcohólicas e incluso el estrés también aumentan significativamente los niveles de ácido úrico en la sangre y provocan ataques de gota. Estos se deben a la presencia de dichos cristales en los espacios interarticulares, que fueron acumulándose por el paso del tiempo y que provocan la inflamación de algunas articulaciones y del tejido que las rodea. La inflamación así generada suele atacar las terminaciones nerviosas de las articulaciones y producir un intenso dolor. En algunas ocasiones, los cristales se acumulan

en los riñones y las vías urinarias formando cálculos que pueden obstruir el flujo de orina y provocar cólicos renales muy dolorosos. También se puede desencadenar por una insuficiencia renal, es decir, un funcionamiento deficiente, o quizá nulo, de los riñones.



FUENTE: 2009 Nucleus Medical Media, Inc.⁶

2.2.2.5. TRATAMIENTO

Tratamientos para un ataque súbito o reagudización de la gota:

- Antinflamatorios no esteroides (AINES), como ibuprofeno, naproxeno o indometacina tan pronto como los síntomas empiecen.
- Codeína, hidrocodona y oxicodona.
- Colchicina ayuda a reducir el dolor, la hinchazón y la inflamación.
- Los corticoesteroides también pueden ser muy eficaces. Infiltrar la articulación inflamada con esteroides para aliviar el dolor.
- El dolor con frecuencia desaparece al cabo de 12 horas de empezar el tratamiento y se alivia completamente en 48 horas.

El uso diario de alopurinol o probenecida disminuye los niveles del ácido úrico en la sangre.

Algunos cambios en la dieta y en el estilo de vida pueden ayudar a prevenir los ataques de gota:

- Evitar el alcohol, las anchoas, las sardinas, los aceites, el arenque, las vísceras (hígado, riñón y mollejas), legumbres (frijoles y guisantes secos), salsas, champiñones, espinaca, espárrago, coliflor, consomé y levadura de cerveza o de panadería.
- Reducir la cantidad de carne consumida en cada comida.
- Evitar alimentos grasos como aderezos, helado y alimentos fritos.
- Comer suficientes carbohidratos.
- La pérdida rápida de peso puede provocar la formación de cálculos renales de ácido úrico.

2.2.2.6. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la gota generalmente puede realizarse basándose en un examen y una historia médica completa. Para confirmar el diagnóstico puede extraerse una muestra del líquido de la articulación para buscar cristales de urato.

2.2.3. DESCRIPCIÓN DEL ALOPURINOL (FÁRMACO ESTÁNDAR)

El alopurinol es un inhibidor de la xantina oxidasa, que se utiliza en el tratamiento de la gota. Se puede administrar por vía oral o intravenosa.

2.2.3.1. MECANISMO DE ACCIÓN

El alopurinol actúa sobre el catabolismo de las purinas sin modificar su biosíntesis. Reduce la producción de ácido úrico al inhibir las reacciones bioquímicas que conducen a su formación. El alopurinol es un análogo estructural de la base púrica natural hipoxantina y actúa como un inhibidor de la xantina-oxidasa, la enzima responsable de la conversión de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico el producto final de catabolismo de las purinas en el hombre.

El alopurinol es metabolizado al oxipurinol que también es un inhibidor de la xantina oxidasa.

Se ha comprobado que la reutilización de la xantina y de la hipoxantina para la síntesis de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos se mejora

cuando sus oxidaciones son inhibidas por el alopurinol y oxipurinol. Esta reutilización no afecta el normal anabolismo de los ácidos nucleicos. Como resultado de la inhibición de la xantina oxidasa, en los pacientes tratados con alopurinol se han detectado unos niveles de xantina + hipoxantina de 0.3 a 0.4 mg/dl en comparación con los niveles normales de aproximadamente 0.15 mg/dl. El valor máximo detectado, de 0.9 mg/dl de estas oxipurinas después de dosis muy altas de alopurinol están muy por encima de la saturación (> 7 mg/dl).

El aclaramiento renal de la hipoxantina y de la xantina es unas 10 veces mayor que el del ácido úrico. Los niveles urinarios más elevados de estos compuestos no están acompañados por problemas de nefrolitiasis. Solo ha habido tres informes de casos de cristaluria por xantinas: en dos casos se trataba de pacientes con el síndrome de Lesh-Nyhan (caracterizado por una producción excesiva de ácido úrico por la carencia de la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HGPRTasa) . Esta enzima es necesaria para la conversión de la hipoxantina, la xantina y la guanina a sus respectivos nucleótidos). El tercer caso era un paciente con un linfosarcoma en el que se producían grandes cantidades de ácido úrico por la lisis de las células durante la quimioterapia.(40)

2.2.3.2. POSOLOGÍA Y FORMA DE ADMINISTRACIÓN

La dosis se debe ajustar mediante el control de las concentraciones séricas de uratos y los niveles urinarios de uratos/ácido úrico. Frecuencia de la dosificación: se puede administrar una vez al día después de las comidas. Si la dosis excede de 300 mg, y se manifiesta intolerancia gastrointestinal, puede ser adecuado repartir la dosis en varias tomas al día.

Adultos: 2 a 10 mg/kg peso corporal/día o 100 a 200 mg diarios en alteraciones leves. 300 a 600 mg diarios en alteraciones moderadas. 700 a 900 mg diarios en alteraciones graves.

Niños menores de 15 años: 10 a 20 mg/kg de peso corporal/día o 100 a 400 mg diarios. El uso en niños está raramente indicado, excepto en procesos malignos (especialmente, leucemia) y ciertas alteraciones enzimáticas tales como el síndrome de Lesch-Nyhan.

Uso en ancianos: Se deberá usar la dosis menor que produce una reducción satisfactoria de uratos. Se debe prestar atención especial a la dosis en los casos de alteración de la función renal.(40).

2.2.3.3. REACCIONES ADVERSAS

La incidencia es mayor en presencia de alteración renal y/o hepática.

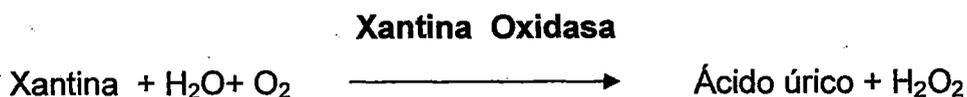
1. **Reacciones cutáneas:** Son las más comunes y pueden aparecer en cualquier momento del tratamiento. Estas reacciones pueden ser prurito, maculopápulas, a veces aparece descamación, otras veces aparición de lesiones purpúricas y raramente, exfoliación. El tratamiento con alopurinol deberá interrumpirse inmediatamente si se producen tales reacciones. Después de la recuperación de las reacciones leves, se puede reiniciar el tratamiento a una dosis menor (como 50 mg/día), incrementándola de forma gradual. Si se produce rash, se deberá retirar permanentemente.
2. **Hipersensibilidad generalizada:** Raramente se han producido reacciones cutáneas asociadas con exfoliación, fiebre, linfadenopatía, artralgia y/o eosinofilia que se asemejan al síndrome de Stevens-Johnson y/o al de Lyell. La vasculitis asociada a alopurinol y la respuesta tisular se pueden manifestar de formas diversas incluyendo hepatitis, nefritis intersticial y más raramente, epilepsia. Si se producen esas reacciones, el alopurinol se deberá interrumpir de forma inmediata y permanente. Los corticosteroides pueden ser beneficiosos en esas situaciones. Cuando se presentaron reacciones de hipersensibilidad generalizadas, por lo general se produjo también una alteración renal o hepática particularmente cuando estas reacciones tuvieron una consecuencia fatal.
3. **Linfadenopatía angioinmunoblástica:** Raramente se ha descrito linfadenopatía angioinmunoblástica tras la biopsia de una linfadenopatía generalizada. Parece ser reversible tras la interrupción del tratamiento con alopurinol.
4. **Hepatitis granulomatosa:** Muy raramente se ha descrito la presencia de hepatitis granulomatosa, sin evidencia obvia de una

hipersensibilidad más generalizada. Parece ser reversible tras la interrupción del alopurinol.

5. **Alteraciones gastrointestinales:** Se han registrado náuseas y vómitos. Se pueden evitar tomando el alopurinol tras las comidas. Tanto la hematemesis recurrente como la ateorrea han sido consideradas como efectos adversos muy raros.
6. **Sangre y sistema linfático:** Existen informes ocasionales de trombocitopenia, agranulocitosis y anemia aplásica, particularmente en individuos con la función renal alterada remarcando la necesidad de precaución especial en este grupo de pacientes.
- **Varias:** Se ha registrado las siguientes reacciones ocasionalmente: fiebre, malestar general, astenia, cefalea, vértigo, ataxia, somnolencia, coma, depresión, parálisis, parestesia, neuropatía, alteraciones visuales, cataratas, cambios maculares, cambio de gusto, estomatitis, cambios en los hábitos intestinales, infertilidad, impotencia, emisión nocturna, diabetes mellitus, hiperlipemia, forunculosis, alopecia, decoloración del cabello, angina, hipertensión, bradicardia, edema, uremia, hematuria y ginecomastia.(40)

2.2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA XANTINA OXIDASA.

FUNDAMENTO



CONDICIONES:

T = 25°C, pH = 7.5, A 290nm, Light Path = 1 cm

MÉTODO

La espectrofotometría es un método analítico que utiliza los efectos de la interacción de las radiaciones electromagnéticas con la materia (átomos y moléculas) para medir la absorción o la transmisión de luz por las sustancias.

La espectrofotometría se refiere a los métodos, cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas.

Este método se basa en la ley de **Bourguer-Lambert-Beer** o ley general de la espectrofotometría que permite hallar la concentración de una especie química a partir de la medida de la intensidad de luz absorbida por la muestra.

2.2.5. CARACTERIZACIÓN DEL METABOLITO SECUNDARIO DEL EXTRACTO CON MAYOR PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE XANTINA OXIDASA.

2.2.5.1. EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN .-

La extracción es un proceso por el cual podemos aislar una sustancia o grupos de sustancias basandose en la diferencia de solubilidad de los mismos en un determinado solvente.

El método de maceración consiste en mantener el material vegetal en contacto con el líquido (disolvente) frío, en recipientes de vidrio o de acero inoxidable. Esta operación requiere un tiempo más o menos largo y generalmente va acompañada de la trituración mecánica del material. Es el método más recomendable para extraer sustancias termolábiles. (41)

2.2.5.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN –

2.2.5.2.1. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).-

La cromatografía en papel y electroforésis en papel fueron usados extensamente para el análisis de flavanoides, pero ahora el método escogido por la simpleza y por ser económico es el TLC.

Las ventajas de esta técnica son bien conocidas: separación en corto tiempo, la docilidad de la detección con reactivos y la posibilidad de correr varias muestras al mismo tiempo.

TLC es además usado idealmente para realizar screening preliminar de extractos de plantas antes del análisis en el HPLC. Se emplean diferentes sistemas de solventes para la separación de flavonoides usando TLC. (42)

2.2.5.2.2. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA (CC).-

La cromatografía en columna es utilizada para la purificación de muestras extraídas de material vegetal (o de otra naturaleza, pero en la cual la sustancia a estudiar se encuentre formando parte de una mezcla compleja). El proceso de cromatografía consta de una fase móvil (eluyente) y una fase estacionaria (adsorbente), los cuales dependen de las sustancias.

Como fase estacionaria se usa, generalmente gel de sílice o alúmina dentro de una columna. La elección del o los disolventes es crucial para una buena separación.

La columna se prepara mezclando el soporte con el disolvente y se rellena la columna poniendo en el fondo de ésta un poco de algodón o lana de vidrio, para evitar que la sílica o la alúmina queden retenidas en la columna. A continuación se introduce la muestra por la parte superior de la columna y se eluye con el disolvente elegido, recogándose por lo general en tubos de ensayo o frascos viales.

La mezcla de compuestos a separar se disuelve en una pequeña cantidad de disolvente y se coloca sobre el adsorbente, en la parte superior de la columna, quedando adsorbida por el mismo. A continuación se pasa un flujo de eluyente a través de la columna. Los compuestos constituyentes de la mezcla son arrastrados por el eluyente a su paso, haciéndoles avanzar a lo largo de la columna. Sin embargo, no todos los compuestos avanzan a la misma velocidad, y esta es precisamente la clave de la cromatografía, pues algunos compuestos se ven más fuertemente retenidos por el adsorbente (fase estacionaria) y por lo tanto avanzarán más despacio. Por el contrario, otros apenas son retenidos y avanzarán a mayor velocidad.

La elección del disolvente es crucial para una buena separación. Dicho disolvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien por aplicación de presión (cromatografía flash).

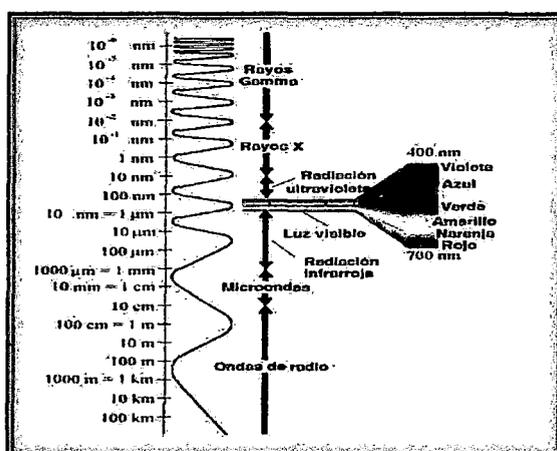
2.2.5.3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES PARA LA ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS.

2.2.5.3.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA.-

Detecta las transiciones de sistemas conjugados y proporcionan información acerca de la longitud y estructura de la parte conjugada de una molécula.

La espectroscopía ultravioleta proporciona información más especializada que la infrarroja o la resonancia magnética nuclear.

Las frecuencias ultravioleta corresponden a longitudes de onda más cortas y energías mucho mayores que el infrarrojo.



FUENTE: <http://www.ehu.es/imacris>⁷

La región ultravioleta es un rango de frecuencias cercanas y superiores que el visible: **ultra** significa: “más allá”, y **violeta**, es la luz del visible de mayor frecuencia. Sus longitudes de onda se dan en nanómetros (nm; 10^{-9} cm), los espectros ultravioleta trabajan en el rango de 200 a 400 nm (2×10^{-5} a 4×10^{-5} cm), que corresponden a energías de aproximadamente 70 a 140 Kcal por mol. Esos espectrómetros frecuentemente se extienden a la región visible (mayor longitud de onda, menor energía), y se llaman espectrómetros ultravioleta – visible.

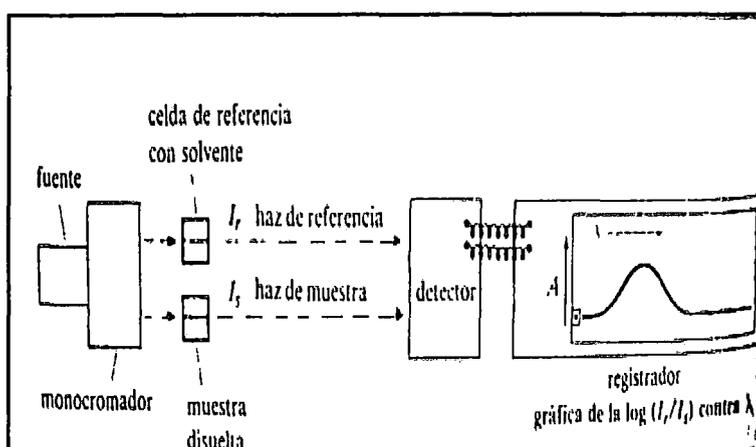
Las longitudes de onda de la luz ultravioleta que una molécula absorbe están determinadas por las diferencias de energía entre los orbitales de la molécula. Los enlaces sigma son muy estables, y los electrones en estos enlaces normalmente no se afectan por longitudes de onda mayores de 200 nm. Los enlaces pi tienen electrones que se excitan más fácilmente y

pasan a orbitales de mayor energía. Es más probable que los sistemas conjugados tengan orbitales inferiores vacíos, y las transiciones electrónicas en esos orbitales producen absorciones características en la región ultravioleta. (43)

2.2.5.3.2. OBTENCIÓN DE UN ESPECTRO ULTRAVIOLETA.

Para medir en el espectro ultravioleta de un compuesto, la muestra se disuelve con un solvente que no absorba a más de 200nm. La solución de la mezcla se coloca en una celda de cuarzo y se coloca un poco de solvente en la celda de referencia. Un espectrómetro ultravioleta funciona comparando la cantidad de luz transmitida a través de la muestra con la cantidad de luz de un haz de referencia, el cual pasa a través de la celda de referencia para compensar cualquier absorción de la luz originada por la celda y el solvente. El espectrómetro tiene una fuente que emite todas las frecuencias del ultravioleta (más de 200 nm). Esta luz pasa a través de un monocromador, que emplea una rejilla de difracción o un prisma para descomponer la luz de un espectro y seleccionar la longitud de onda determinada. Esta longitud de onda se divide en dos haces, uno que pasa a través de la muestra y otro que pasa a través de la celda de referencia (solvente). El detector mide de forma continua la relación de intensidad del haz de referencia (I_r) en comparación con el haz de la muestra (I_m). Al barrer el espectrómetro las longitudes de onda de la región ultravioleta, un registrador traza una gráfica (que se llama espectro) de la absorbancia de la muestra como función de la longitud de onda.(43)

Componentes del Espectrómetro Ultravioleta.



Fuente: Wade L.G, 2004 (43)

2.2.5.3.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

La cromatografía líquida es una técnica utilizada desde hace tiempo y probablemente la más útil en nuestros días para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre el analito y la columna cromatográfica, porque presenta las ventajas de tener una alta sensibilidad, fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicación a sustancias que son de primordial interés en la industria y en muchos campos de la ciencia.

La cromatografía líquida "clásica" se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas.

2.2.5.3.3.1 TIPOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.-

Dependiendo del tipo de fase fija y del tipo de fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía líquida de alta resolución puede ser:

I. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN.

La fase fija es un sólido y se utiliza casi exclusivamente sílice (sílica) y en mucha menor medida alúmina.

II. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO.

En casi todos los casos, como fase estacionaria se utilizan compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílica. Esta cromatografía se subdivide en cromatografía en fase normal y fase reversa.

a) Cromatografía de fase normal.-

La cromatografía de fase normal o "Normal phase HPLC"(NP-HPLC) fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención.

La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención.

La NP-HPLC cayó en desuso en los años setenta con el desarrollo del HPLC de fase reversa o Reversed-phase HPLC debido a la falta de reproductibilidad de los tiempos de retención puesto que los disolventes próticos cambiaban el estado de hidratación de la sílica o alúmina de la cromatografía.

b) Cromatografía de fase inversa

La HPLC de fase reversa (RP-HPLC) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe_2SiCl , dónde la R es una cadena alquil tal como $\text{C}_{11}\text{H}_{23}$ ó C_8H_{17} .

El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos.

La cromatografía de fase reversa es tan utilizada que a menudo se la denomina HPLC sin ninguna especificación adicional.

La cromatografía de fase reversa se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión

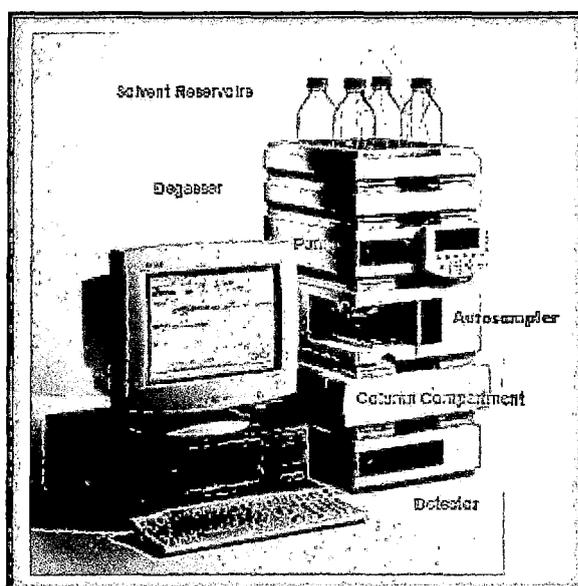
entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar.

III. CROMATOGRAFÍA IÓNICA.

Se utilizan columnas rellenas con resinas de intercambio iónico para separar y determinar iones.

IV. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN POR TAMAÑO (SEC).

La fase fija está formada por partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros y llevan a cabo un fraccionamiento relacionado con el tamaño molecular. Las moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas más tiempo.



DAD HPLC Agilent 1200

Esquema de los componentes del equipo HPLC .

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES:

3.1.1. MATERIAL BOTÁNICO:

Las especies vegetales:

- *Rosmarinus officinalis* L. (romero) (hojas y tallos) (S)
- *Ephedra americana* (pinco-pinco) (tallos y frutos) (Q)
- *Ambrosia arborescens* Mill (Marcju) (hojas y tallos) (Q)
- *Baccharis chilco* H.B.K.(chillca) (hojas y tallos) (Q)
- *Acanthoxanthium spinosum*.(alkkhokiska),(hojas y tallos)(Q)
- *Medicago lupulina* L.(trébol) (hojas, tallos y raíz) (S)
- *Schinus molle* L. (molle), (hojas, tallos y frutos) (Q)
- *Urtica urens* L. (ortiga) (hojas y tallos) (Q)
- *Taraxacum officinale* Wiggers.(Diente de león)(hojas, tallos, raíz y flores) (S)
- *Caiphora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa) (hojas, tallos y flores) (Q)

3.1.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

• MATERIALES DE RECOLECCIÓN:

- Bolsas de polietileno
- Bolsas de papel kraft
- Tijeras podadoras
- Cámara fotográfica
- Libreta de campo
- Etiquetas.
- Etanol al 70%
- Lapiceros.
- Plumones de tinta indeleble

- **MATERIALES DE LABORATORIO:**

- Vasos de precipitados de 20, 50, 100 ml
- Micropipetas de 10, 200, 1000 μ l
- Baguetas
- Tubos de ensayo.
- Viales de 20ml
- Cámara cromatográfica
- Estufa
- Pinzas
- Capilares.
- Pizetas.
- Placas para cromatografía.
- Embudo de vidrio.
- Columna cromatográfica.
- Gradillas
- Cubetas de cuarzo

- **EQUIPOS:**

- Rotavapor R- 215 + Vacuum Controller V- 850 + Vacuum Pump V-700 + Heating Bath B- 491 BUCHI
- Sonicador BRANSON-3510 R-MTH
- Liofilizador L - 101 LIOBRAS
- Balanza de precisión OHAUS EP 214C
- Generador de agua ultrapura BARNSTEAD D-7401
- Estufa FISHER SCIENTIFIC
- Espectrófotometro UV EVOLUTION 300
- DAD HPLC Agilent 1200, Columna ZORBAX ECLIPSE XDB-C18 analytical 4.6 x 250mm, 5 micrones

- **SOLVENTES Y REACTIVOS :**

- Etanol de 70%
- Cloroformo.
- Hexano

- Diclorometano
- Dimetilsulfóxido
- Agua ultrapura
- Agua destilada
- Acetato de etilo
- Ácido fórmico
- Ácido acético
- Metanol
- HCL 1N
- Acetonitrilo
- Reactivo de Benedict
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo difenilborinato de etanolamina 1% NP (natural product)
- Reactivo de FeCl₃ 5 %
- Agente tensoactivo.
- Xantina (Sigma)
- Xantina oxidasa from bovine milk Grade I, ammonium sulfate suspension, 0.4 – 1 units/mg protein (Sigma)
- Solución buffer fosfato pH 7.5.
- Sílica gel para cromatografía en columna.
- Sílica gel para cromatografía en capa fina.

- **FÁRMACO STANDAR**

- Alopurinol pureza por TLC > 99 % (Sigma)

3.1.3 INFRAESTRUCTURA

- Laboratorio del Área de Bioquímica UNSAAC
- Laboratorio del Área de Farmacognosia UNSAAC
- Laboratorio del Área de Cromatografía UNSAAC

3.2. DISEÑO METODOLÓGICO.-

3.2.1. TIPO DE ESTUDIO:

Es un estudio descriptivo, y cuasiexperimental, por no haber una asignación al azar, ni emparejamiento, sino que los grupos de experimentación serán intactos y se formarán antes del experimento.

3.2.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.-

- PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA POR LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS SECOS AL 70 % DE LAS ESPECIES: *Schinus molle* L. (molle), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L. (ortiga), *Caiohora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Medicago lupulina* L. (trébol).

Estudio cuasiexperimental, donde se determinó la actividad inhibitoria de xantina oxidasa de los extractos etanólicos secos al 70% de las especies en estudio. La medición se realizó en un espectrofotómetro.

Diseño: cuasiexperimental con tratamientos múltiples de varios grupos, con secuencia diferente.

G ₀	X ₁	X ₂	X ₃	O ₀
G ₁	X ₁	---	X ₃	O ₁
G ₂	X ₁	X ₂	---	O ₂
G ₃	X ₁	---	---	O ₃

DONDE:

G₀: Grupo que contiene la solución enzimática (Xantina oxidasa), el sustrato (xantina) y solución de muestra (inhibidor) a la concentración de $C_1=100\mu\text{g/mL}$ de las especies: *Schinus molle* L. (molle), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L.(ortiga), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg.(madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Medicago lupulina* L.(trébol) y/o patrón (alopurinol) a la concentración de $25\mu\text{g/ml}$.

G₁: Grupo que contiene sólo la solución del sustrato (xantina) y la solución de la muestra.

G₂: Grupo que contiene la mezcla de la solución enzimática (xantina oxidasa) y el sustrato (xantina),

G₃: Grupo que contiene sólo el sustrato (xantina).

X₁: Solución del sustrato(xantina)

X₂: Solución de la enzima (xantina oxidasa)

X₃: Extracto etanólico seco al 70% de las especies: *Schinus molle* L. (molle), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L.(ortiga), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg.(madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Medicago lupulina* L.(trébol) a una concentración de $100\mu\text{g/ml}$ y/o el fármaco patrón (alopurinol) a la dosis de $25\mu\text{g/ml}$.

O₀,O₁,O₂,O₃: Mediciones que se realizarón en el espectrofotómetro UV a 290nm.

- **PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS CON SOLVENTES DE DIFERENTE POLARIDAD DE LA ESPECIE VEGETAL CON MAYOR PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.**

G₀	X₁	X₂	X₃	O₀
G₁	X₁	---	X₃	O₁
G₂	X₁	X₂	---	O₂
G₃	X₁	---	---	O₃

DONDE:

G₀: Grupo que contiene la solución enzimática (xantina oxidasa) el sustrato (xantina) y la solución de muestra (extracto hexánico, diclorometano, cloroformo, cloroformo-metanol (4:1), metanol y agua de la especie vegetal que presentó mayor porcentaje de inhibición a la concentración de C=100µg/mL).

G₁: Grupo que contiene la solución sustrato (xantina) y la solución de la muestra.

G₂: Grupo que contiene la mezcla de la solución enzimática (xantina oxidasa) y el sustrato (xantina).

G₃: Grupo que contiene sólo el sustrato (xantina).

X₁ : Solución del sustrato (xantina)

X₂ : Solución de la enzima (xantina oxidasa)

X₃: Extracto hexánico, diclorometano, cloroformo, cloroformo-metanol (4:1), metanol y agua de la especie vegetal que presentó mayor porcentaje de inhibición a una concentración de C=100µg/mL.

O₀,O₁,O₂,O₃: Mediciones que se realizarón en el espectrofotómetro UV a 290 nm.

- **PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL METABOLITO SECUNDARIO DEL EXTRACTO CON MAYOR PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE XANTINA OXIDASA.**

Se propone un diseño **transeccional descriptivo**, pues se trata de un diseño no experimental.

G₁ X₁ X₂ X₃ X₄ X₅

G₁: Grupo de la especie vegetal que presentó mayor actividad inhibitoria y extraído con solventes de diferente polaridad.

X₁: Recolección de datos y descripción del procedimiento de fraccionamiento.

X₂: Recolección de datos y descripción de los metabolitos en cromatografía en capa fina.

X₃: Recolección de datos y descripción de los metabolitos en cromatografía en columna.

X₄: Recolección de datos y descripción de los metabolitos detectados por espectroscopía UV.

X₅: Recolección de datos y descripción de los metabolitos detectados por HPLC.

3.2.3. VARIABLES

3.2.3.1. VARIABLES IMPLICADAS

3.2.3.1.1. VARIABLE INDEPENDIENTE:

➤ **TIPOS DE EXTRACTOS ETÁNICOS SECOS AL 70% DE LAS ESPECIES:** *Schinus molle* L. (molle), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L.(ortiga), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg.(madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Medicago lupulina* L. (trébol).

DEFINICIÓN CONCEPTUAL:

Cantidad de extracto seco obtenido por maceración en etanol al 70% de las plantas secas pulverizadas de las especies en estudio, las que se utilizarán para comprobar la actividad que se les atribuye.

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

- ◆ **Naturaleza:** cuantitativa.
- ◆ **Escala de medición:** de razón.
- ◆ **Unidad de medida:** µg/mL.
- ◆ **Medición:** directa.
- ◆ **Instrumento de medida:** Balanza analítica de precisión.
- ◆ **Procedimiento:** Los extractos obtenidos por el método de maceración de las especies en estudio, fueron liofilizados para la obtención de los diferentes extractos
- ◆ **Expresión final de la variable:** C₁

3.2.3.1.2. VARIABLES DEPENDIENTES:

➤ ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA

DEFINICIÓN CONCEPTUAL:

Los inhibidores de xantina oxidasa bloquean el paso final de la biosíntesis del ácido úrico, logrando disminuir la concentración plasmática de ácido úrico, usados generalmente para el tratamiento de la gota.

INDICADOR: Disminución de la producción de ácido úrico, que se observa en el aumento del porcentaje de inhibición.

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

- ◆ **Naturaleza:** cuantitativa.
- ◆ **Escala de medición:** de razón.
- ◆ **Unidad de medida:** absorbancia.
- ◆ **Medición:** directa.
- ◆ **Instrumento de medida:** espectrofotómetro.
- ◆ **Procedimiento:** en un tubo de ensayo se colocaron las soluciones problema, junto a la enzima y sustrato de la enzima, luego se hizo la lectura en un espectrofotómetro a 290 nm, obteniéndose la absorbancia de cada muestra.
- ◆ **Expresión final de la variable:** porcentaje de inhibición enzimática.

➤ **CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO QUE PRESENTE MAYOR PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.**

DEFINICIÓN CONCEPTUAL:

Aislamiento y conocimiento estructural de los metabolitos secundarios presentes en el extracto con mayor actividad inhibitoria.

INDICADOR: Espectros obtenidos por método de barrido de 200 a 400 nm por espectroscopía UV y cromatogramas obtenidos a 370 nm por HPLC usando como referencia bibliografía.

DEFINICIÓN OPERACIONAL:

- ◆ **Naturaleza:** cualitativa.
- ◆ **Escala de medición:** nominal.
- ◆ **Medición:** directa.
- ◆ **Instrumento de medida:** UV y HPLC.
- ◆ **Procedimiento:** La muestra purificada, fue analizada por el equipo de UV y HPLC, para la determinación de su probable estructura.
- ◆ **Expresión final de la variable:** nombres probables de los metabolitos secundarios.

3.2.3.2. VARIABLES NO IMPLICADAS

3.2.3.2.1. VARIABLES INTERVINIENTES:

A. DE LAS MUESTRAS VEGETALES.-

- **TIEMPO DE RECOLECCIÓN:** Mes de Abril.
- **PARTES DE LAS PLANTAS A RECOLECTAR:**
 - *Rosmarinus officinalis* L (hojas y tallos) (S)
 - *Ephedra americana* (tallos y frutos) (Q)
 - *Ambrosia arborescens* Mill (hojas y tallos)(Q)
 - *Baccharis chilco* H.B.K.(hojas y tallos)(Q)
 - *Acanthoxanthium spinosum*.(hojas y tallos)(Q)
 - *Medicago lupulina* L.(hojas, tallos y raíz)(S)
 - *Schinus molle* L (hojas, tallos y frutos)(Q)
 - *Urtica urens* L. (hojas y tallos)(Q)

- *Taraxacum officinale* Wiggers.(hojas, tallos, raíz y flores)(S)
- *Caiothora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg.(hojas, tallos y flores) (Q)

• **LUGAR DE RECOLECCIÓN:**

Siete especies vegetales fueron recolectadas en el distrito de Quiquijana, provincia de Quispicanchi, Cusco (Q) y tres especies fueron recolectadas en la comunidad de Pumamarca del distrito de San Sebastian, Cusco (S)

- **TEMPERATURA DE SECADO:** Temperatura ambiente (13 a 15°C).

B. DE LA EXTRACCIÓN.-

Solvente: Etanol al 70%.

Tipo de extracción: Por método de maceración.

C. DEL ENSAYO.-

La temperatura a la que se realizaron las diferentes pruebas, fue a 30°C.

3.2.3.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

3.2.3.3.1. DE LOS REACTIVOS:

Criterio de inclusión:

Se trabajó con: Xantina, xantina oxidasa y alopurinol SIGMA.

3.2.3.3.2. DE LAS MUESTRAS VEGETALES:

Criterio de inclusión:

Se recolectaron aquellas partes de las plantas que se encuentran en buen estado, en el mes de Abril y en la etapa de crecimiento de las plantas.

Criterios de exclusión:

Se excluyeron las muestras vegetales que presentaban signos de putrefacción o estaban contaminadas y las partes de las plantas que no se utilizaron en el estudio.

3.3 PROCEDIMIENTO:

3.3.1. RECOLECCIÓN, SELECCIÓN, ESTABILIZACIÓN DE LAS DROGAS Y DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD DE LAS PLANTAS.

3.3.1.1. RECOLECCIÓN:

Las especies *Ephedra americana*, *Ambrosia arborescens* Mill, *Baccharis chilco* H.B.K., *Acanthoxanthium spinosum*, *Urtica urens* L., *Schinus molle* L., y *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg se recolectaron en el distrito de Quiquijana, provincia de Quispicanchi y las especies *Medicago lupulina* L., *Rosmarinus officinalis* L. y *Taraxacum officinale* Wiggers se recolectaron en el Distrito de San Sebastián, provincia de Cusco, Departamento del Cusco.

- Se recolectaron 500g de las plantas en el mes de abril del año 2010, posteriormente se trasladaron en bolsas de polietileno al lugar de secado.
- Las plantas se secaron en un ambiente ventilado.
- Una vez secas las plantas, éstas fueron sometidas a molienda en un molino de granos.
- Posteriormente se tamizaron a través de una malla N° 40, para obtener un peso de 50g de cada planta seca y pulverizada.

3.3.1.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

La determinación de la humedad se realizó por triplicado, en placas petri con 1 g de muestras frescas, las mismas que fueron introducidas a la estufa a una temperatura de 80 °C hasta peso constante, para luego determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente relación:

$$\%H = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

Donde:

%H = Porcentaje de humedad

M₁ = Peso de muestra fresca

M₂ = Peso de muestra seca

3.3.1.3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO.

EXTRACCIÓN HIDROALCOHÓLICA MEDIANTE MACERACIÓN CON ETANOL AL 70°.-

Para lo cual se emplearon 50gr de las plantas secas molidas, se concentraron con etanol 70° se agitó constantemente durante todo un día, luego se procedió a filtrar y volver a añadir el solvente, macerar por otro día, agitar constantemente y posteriormente volver a filtrar esta operación se realizó por espacio de 4 días a temperatura ambiente.

Tras separar el residuo vegetal y el líquido extractivo, se procedió a concentrar los líquidos filtrados de cada planta en un rotavapor a 450 RPM, 40°C; con lo cual se logró evaporar el etanol y quedar el extracto acuoso de las muestras.

LIOFILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS

Luego de concentrar los extractos de las 10 plantas se procedió a liofilizar las muestras para extraer el agua, y obtener el extracto seco.

3.3.1.4. PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN.-

El porcentaje de rendimiento de las especies se calculó con la siguiente relación:

$$\%E = \frac{P_f}{P_i} \times 100$$

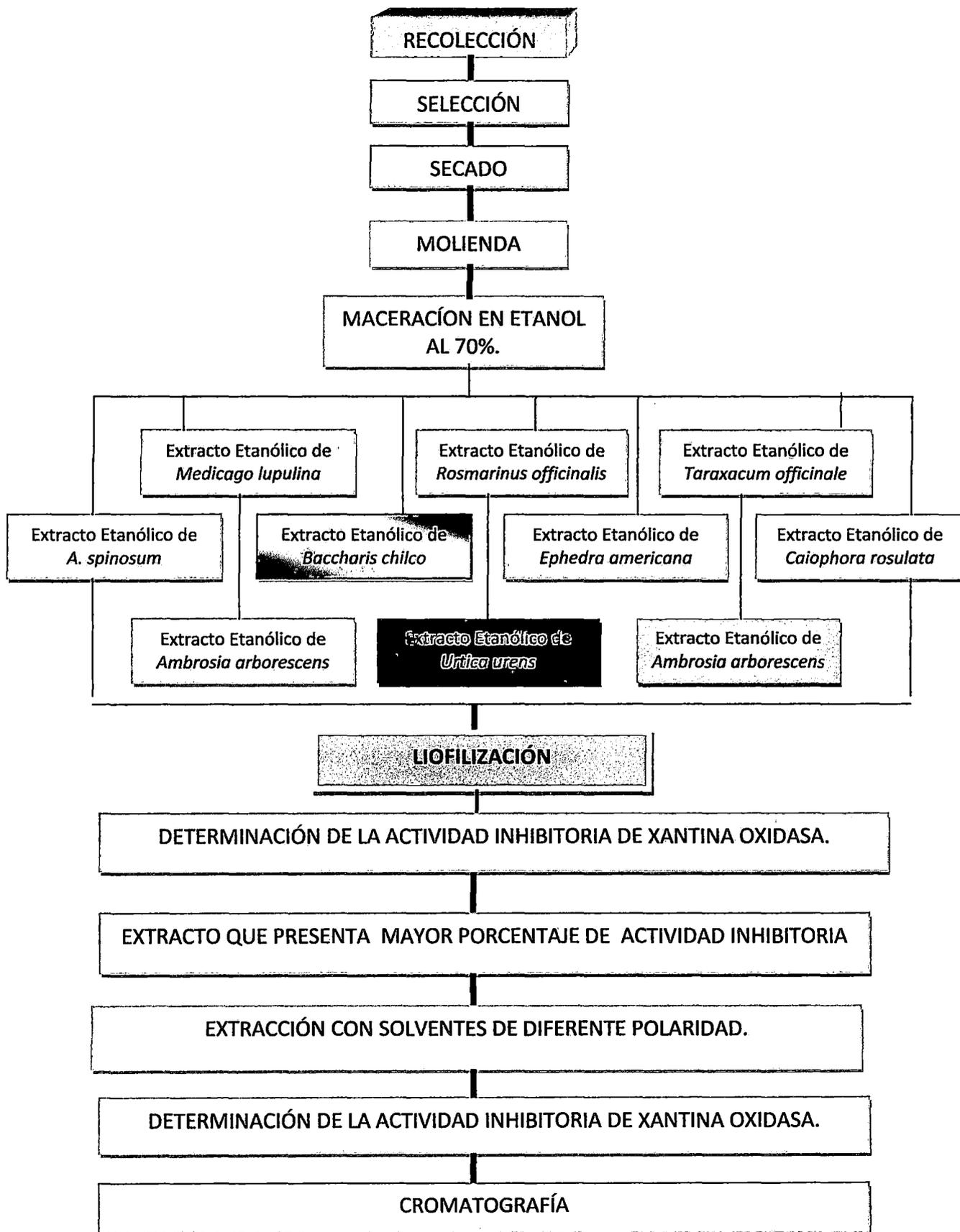
DONDE:

% E = PORCENTAJE DEL EXTRACTO SECO.

P_F = PESO FINAL

P_I = PESO INICIAL

FLUJOGRAMA 1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS DIEZ PLANTAS, ENSAYOS PRELIMINARES Y CROMATOGRAFÍA.



FUENTE: Gutiérrez G, Mamani H, 2011.

3.3.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA ENZIMÁTICA.-

3.3.2.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.3.2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO:

Se trabajó con extractos etanólicos al 70% liofilizados de las especies: *Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (chillca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (Diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L. (ortiga), *Caioophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (trébol).

3.3.2.1.2. REACTIVOS:

Xantina (Sigma), Xantina oxidasa (Sigma), Alopurinol (Sigma).

3.3.2.1.3. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA:

- ◆ Se utilizaron los extractos etanólicos al 70% liofilizados de las especies en estudio.
- ◆ Se preparó la solución de prueba, para llegar a una concentración final de 100 µg/mL de extracto de cada planta, utilizando en algunos casos (romero, molle y los extractos hexánico, diclorometánico y clorofórmico de *Medicago lupulina* L.) un agente tensoactivo (dimetilsulfoxido), para lograr la disolución total del extracto.
- ◆ Se preparó la solución de buffer fosfato, utilizando NaHPO₄ y K₂HPO₄. Para obtener buffer fosfato 70mM, pH 7.5.
- ◆ Se preparó la solución de la enzima, a una concentración de 0.2 UI/µl.
- ◆ Se preparó la solución del sustrato (xantina) 150µM.
- ◆ Posteriormente se colocó en un primer tubo de ensayo 330 µl de la solución del extracto de cada planta (100 µg/ml), 970 µl de buffer fosfato, 30 µl de la solución de la enzima. Conformando así el "tubo de la MUESTRA".
- ◆ En un segundo tubo se colocó, 330 µl de solución del extracto y 1000 µl de buffer fosfato, formando así el BLANCO DE LA MUESTRA.

- ◆ En un tercer tubo se colocó, 330 µl de agua ultrapura, 970 µl de buffer fosfato y 30 µl de la solución de la enzima, formando así el CONTROL.
- ◆ Y en un cuarto tubo se colocó, 330 µl de agua ultrapura y 1000 µl de buffer fosfato, formando así el BLANCO DEL CONTROL.
- ◆ Los cuatro tubos de ensayo (por planta) se incubaron a 30°C por 15 minutos, luego se agregó 670 µl de sustrato (xantina), y se incubó por 30 minutos más, para posteriormente detener la reacción agregando 330 µl de HCl 1N.
- ◆ Se llevó inmediatamente a lectura en el espectrofotómetro a 290nm.
- ◆ El porcentaje de inhibición se determinó mediante:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{(A - B) - (C - D)}{(A - B)} \times 100\%$$

Donde:

A = absorbancia del CONTROL.

B = absorbancia del BLANCO DEL CONTROL.

C = absorbancia de la MUESTRA.

D = absorbancia del BLANCO DE LA MUESTRA.

- ◆ En el caso del fármaco patrón (Alopurinol), se realizó el mismo ensayo, considerándolo como otra solución de prueba.

CUADRO N° 1

DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA

TUBOS DE ENSAYO REACTIVOS	MUESTRA	BLANCO DE LA MUESTRA	CONTROL	BLANCO DEL CONTROL
Solución de la Muestra (100ug/ml)	330 µl	330 µl	—	—
Agua ultrapura	—	—	330 µl	330 µl
Buffer Fosfato	970 µl	1000 µl	970 µl	1000 µl
Enzima	30 µl	—	30 µl	—
Incubar a 30 °C por 15 minutos				
Sustrato	670 µl	670 µl	670 µl	670 µl
Incubar a 30°C por 30 minutos				
HCl 1N	330 µl	330 µl	330 µl	330 µl

FUENTE: Metodología según Noro Tadataka Et Al.(32) con modificaciones.

3.3.3 DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL METABOLITO SECUNDARIO DEL EXTRACTO QUE PRESENTA MAYOR PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.-

De los diez extractos etanólicos evaluados se determinó el extracto de la especie que presenta mayor actividad inhibitoria de xantina oxidasa, posteriormente se procede a:

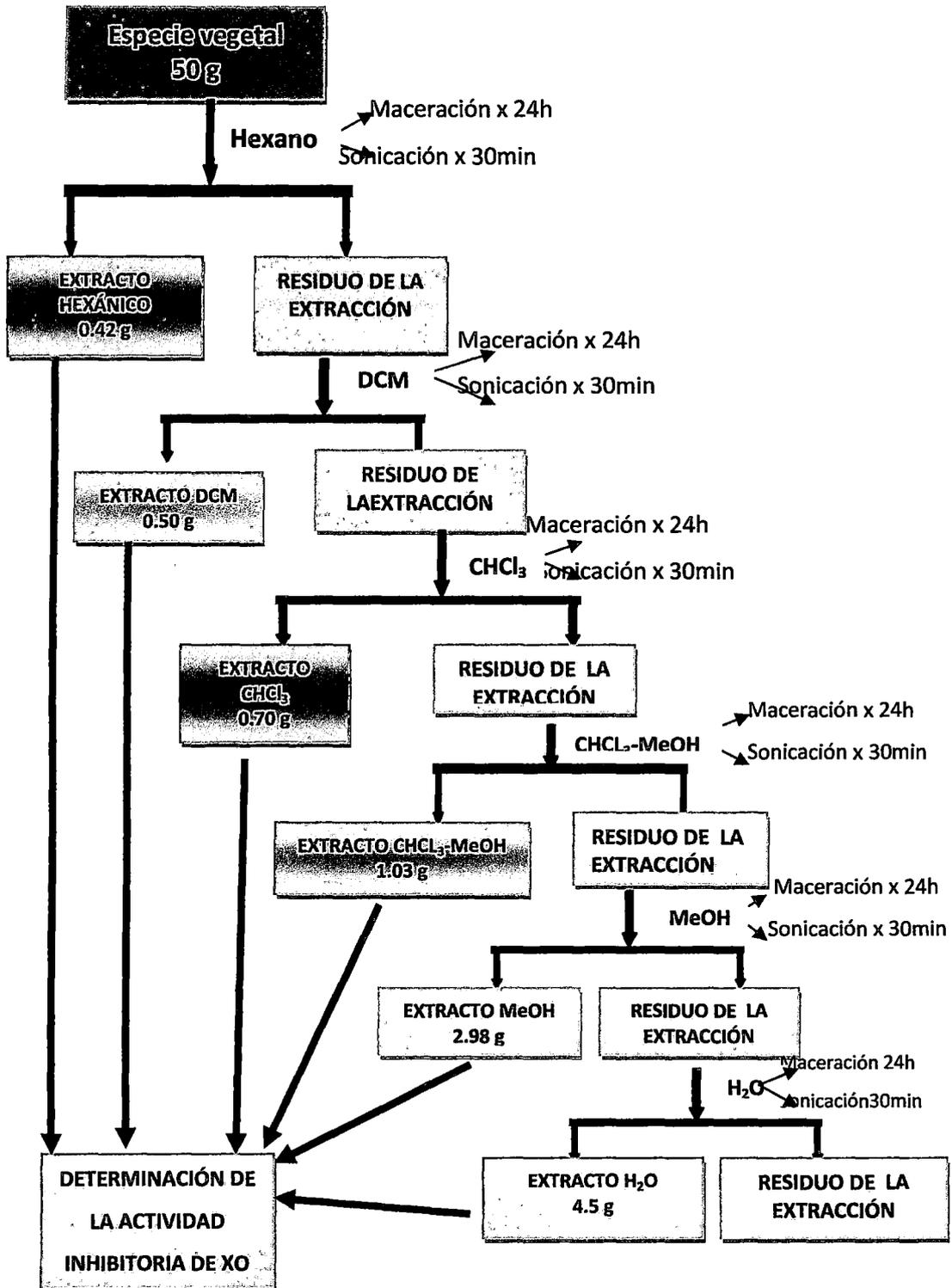
3.3.3.1 EXTRACCIÓN CON SOLVENTES DE DIFERENTE POLARIDAD DEL EXTRACTO CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBITORIA.

Se procedió a un proceso de extracción, a partir de la planta seca y molida, con solventes de polaridad creciente que permitió separar sustancias o grupo de sustancias presentes en la planta de acuerdo a la solubilidad de los mismos en determinados solventes.

Para ello se tomó 50 g de la especie vegetal seca y pulverizada, la extracción fue realizada por maceración por 24 horas más 30 minutos de sonicación.

La extracción con cada uno de los disolventes: hexano, diclorometano, cloroformo, cloroformo-metanol (4:1), metanol y agua se llevó a cabo usando inicialmente 130 mL de cada solvente por 24 horas para la extracción por maceración y luego con 50 ml más del solvente por 30 minutos para la extracción por sonicación, los filtrados obtenidos fueron combinados y concentrados en un rotavapor a 450 RPM, a 40°C, a excepción del extracto acuoso que fue sometido al proceso de liofilización para la obtención del extracto seco. Los rendimientos se indican en el flujograma N° 2.

Flujograma N° 2: Obtención de los extractos de *Medicago lupulina* L. con solventes de diferente polaridad



FUENTE: Gutiérrez G, Mamani H, 2011.

3.3.3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO, DICLOROMETANO, CLOROFÓRMICO, CLOROFORMO-METANOL, METANÓLICO Y ACUOSO.

Se realizó de acuerdo al protocolo antes mencionado en el cuadro N°1, los diferentes extractos se prepararon a la misma concentración, 100 µg/mL. Para la preparación de las soluciones de los extractos hexánico, diclorometánico y clorofórmico fue necesario la adición de unas gotas DMSO (dimetilsulfoxido), que no superaron el 1 % de la solución final, debido a la baja solubilidad de éstos en agua.

3.3.3.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO CON MAYOR ACTIVIDAD INHIBITORIA.

Se realizaron las pruebas de coloración al extracto de trébol (*Medicago lupulina* L.), extracto que presentó mayor porcentaje de inhibición, que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, que se muestra por la aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de un gas (41). Los reactivos de coloración y/o precipitación usados se observan en el cuadro N° 2.

CUADRO N° 2
MARCHA FITOQUÍMICA CUALITATIVA DEL EXTRACTO
DE *Medicago lupulina* L. (TRÉBOL)

METABOLITO	REACTIVO
Azúcares Reductores y Glicósidos.	Benedict
Aminoácidos	Ninhidrina
Compuestos fenólicos	FeCl₃ al 1%
Flavonoides	Shinoda
	Amoniaco
	Dragendorf
Alcaloides	Mayer
Saponinas	Espuma
Taninos	Gelatina - sal

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

FIGURA N° 1
ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO METANÓLICO
DE *Medicago lupulina* L.



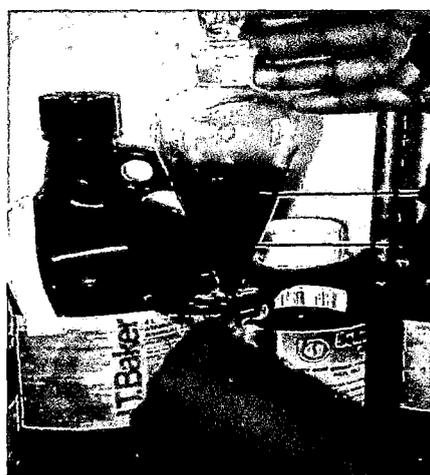
Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

3.3.3.4 SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO
DE TRÉBOL (*Medicago lupulina* L.)

Luego de determinar que el extracto metanólico presentó mayor actividad inhibitoria de xantina oxidasa, se procedió a realizar un proceso de separación con acetona, agua y cloroformo.

Para lo cual se tomó 1.32 gr del extracto metanólico seco y se extrajo con 40 ml de acetona más 0.5 ml de agua destilada, se colocó dicha mezcla en una pera de decantación, luego se agregó 27 ml de cloroformo para separar la acetona y el agua; para así poder obtener los componentes polares solubles en agua.

FIGURA N°2
SEPARACIÓN CON ACETONA Y CLOROFORMO PARA PURIFICACIÓN
DE LOS COMPONENTES



Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

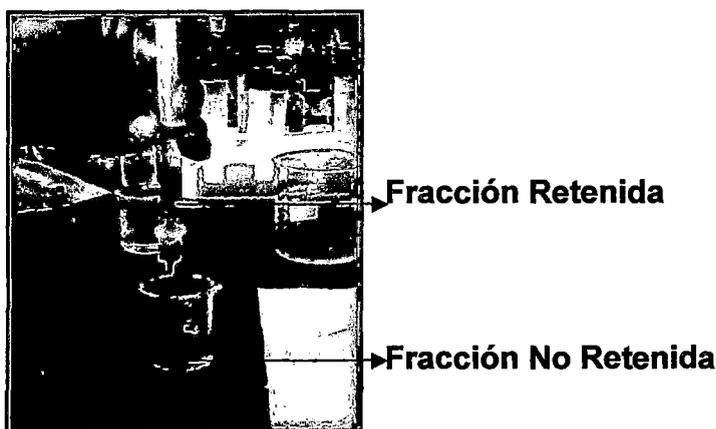
Por este proceso se obtuvieron dos fases: una orgánica (clorofórmica) que a la luz ultravioleta muestra una fluorescencia naranja y una acuosa, que a la luz ultravioleta muestra una fluorescencia amarilla. Se llevaron a evaporación para concentrarlos.

Luego la fracción acuosa se filtró por medio de un cartucho ODS C-18, de lo cual se obtuvo una fracción no retenida, que muestra una fluorescencia amarilla a la luz UV y una fracción retenida en el cartucho, que muestra una fluorescencia amarilla-naranja a la luz UV. La fracción retenida fue lavada con agua acidulada, para poder eliminar los azúcares unidos a las moléculas, y finalmente fue eludida con metanol. Lo cual se puede observar en la Figura N° 3 y N° 4.

Finalmente se obtuvieron tres fracciones: una cloroformica, una retenida y una no retenida (a partir de la fracción acuosa).

FIGURA N°3

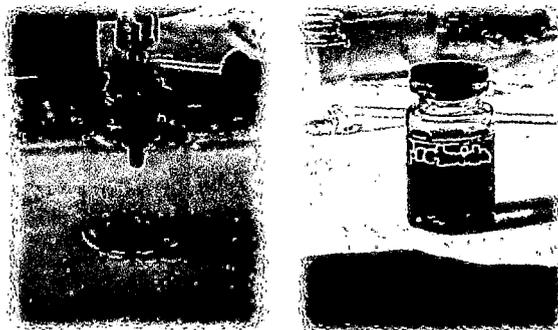
SEPARACIÓN CON EL CARTUCHO ODS C-18



Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

FIGURA N° 4

OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN RETENIDA



Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

3.3.3.5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.-

A las tres fracciones obtenidas por los procesos de separación líquido – líquido (para de decantación) y líquido – sólido (ODS C-18) previos, se les realizó un ensayo de cromatografía en capa fina para determinar la presencia, naturaleza y cantidad de componentes de las muestras, utilizando el sistema de solventes:

- Acetato de etilo : ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:27)

Las placas cromatograficas se revelaron con dos tipos de reveladores: NP (natural product) y Cloruro férrico al 5%.

3.3.3.6. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA.-

Después de haber realizado el TLC de las tres fracciones obtenidas anteriormente, y observar que sólo una de ellas (fracción retenida) presenta componentes, se procedió a realizar la cromatografía en columna de esta muestra, para lo cual se utilizó 4g de sílica gel en una bureta de 29.2 cm de largo y 1cm de diámetro interno. de para poder separar sus componentes. Lo cual se puede observar en la Figura N° 5. Para ello se utilizó un gradiente de sistema de solventes; cloroformo-metanol (25:0).

CUADRO N° 3

SISTEMA DE SOLVENTES PARA LA ELUCIÓN EN CC

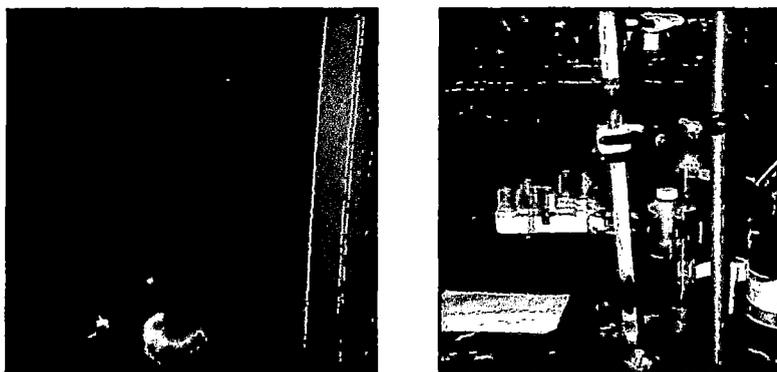
CLOROFORMO	25 ml	20 ml	15 ml	10 ml	5 ml	0 ml
METANOL	0 ml	5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

Se colectaron fracciones de 02 ml cada una, a una velocidad de 2ml/minuto.

FIGURA N° 5

SEPARACIÓN EN CC

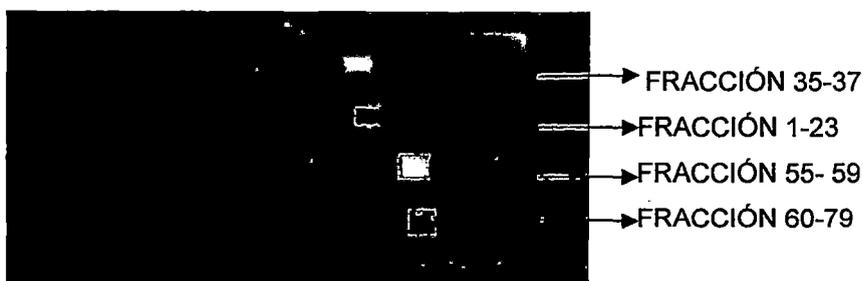


Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

Se realizó el TLC de todas las fracciones y se obtuvieron 04 fracciones del extracto acuoso (fracción retenida). Lo cual se puede observar en la Figura N° 6.

FIGURA N° 6

TLC DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO ACUOSO A LA LUZ UV.

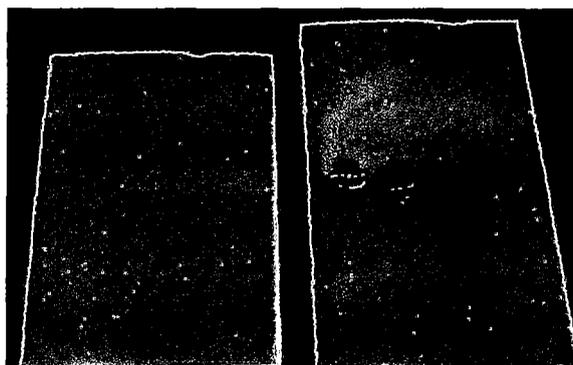


Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

Luego de observar las placas cromatográficas a la luz UV, estas fueron reveladas con FeCl_3 al 5%. Lo cual se puede observar en la Figura N° 7.

FIGURA N° 7

REVELADO CON FeCl_3



Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

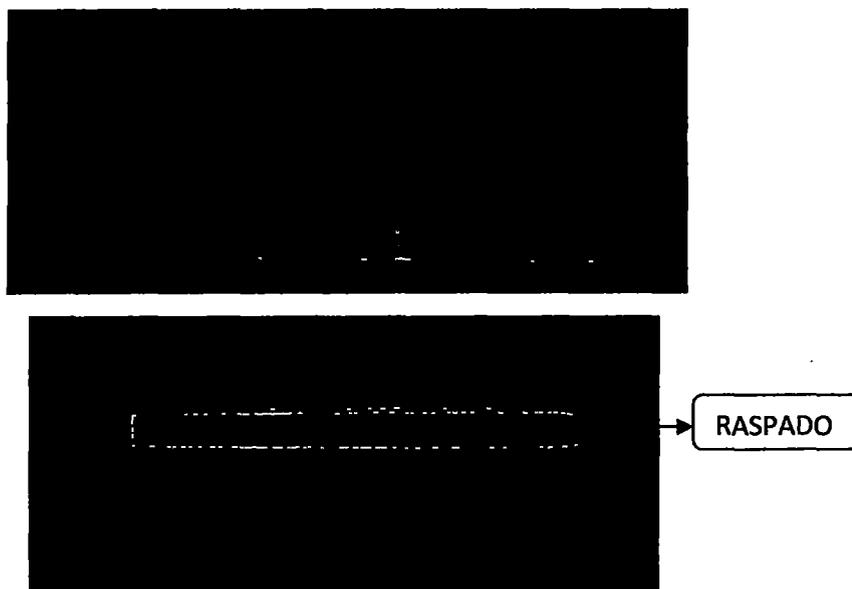
Luego se sembró cada fracción en banda en la placa cromatográfica, y se realizó la corrida, con el sistema: Acetato de etilo : ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:27), para luego realizar un raspado, filtrado y finalmente se evaporó, para así obtener la fracción pura. Lo cual se puede observar en la Figura N° 8, N° 9.

FIGURA N°8
TLC DE FRACCIONES CON SIEMBRA EN BANDA



Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

FIGURA N° 9
FRACCIONES ACUOSAS



PLACA CROMATOGRÁFICA A LA LUZ ULTRAVIOLETA

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

3.3.3.7. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

3.3.3.7.1. ULTRA VIOLETA.- Se llevaron las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna a una lectura en el UV, método de barrido de 200nm a 400nm. Las muestras se disolvieron en metanol absoluto y se procedió a su lectura.

3.3.3.8. HIDRÓLISIS ÁCIDA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Medicago lupulina* L.(trébol)

Se tomó 0.5gr del extracto metanólico de *Medicago lupulina* L.(Trébol) que fue disuelto con metanol, al cual se le adicionó HCl 0.3 N. Posteriormente se llevó la solución a ebullición en un Baño María por 30 minutos.

Se dejó enfriar y se purificó a través de un cartucho ODS C-18.

3.3.3.9. HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).- Se corrieron las muestras del extracto metanólico hidrolizado y sus fracciones. Las fracciones se disolvieron en metanol y se filtraron a través de un filtro de 0.45µm de diámetro de poro.

Se estableció las condiciones de corrida:

- Fase móvil: Ácido fórmico al 5%-Acetonitrilo
- Flujo: 0.8ml/min
- Temperatura: 48°C
- Volumen de inyección: 5µl
- Tiempo de corrida: 35min
- Longitud de onda: 370nm

TIEMPO	% A	%B
0 min	100	0
30 min	70	30
35 min	0	100

3.3.3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico ha sido realizado mediante el ensayo de varianza ANOVA seguido del test de Duncan para comparaciones múltiples.

Los porcentajes de inhibición (%) fueron calculados a partir de las diferencias entre los grupos problemas y el control.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

DE LOS RESULTADOS

CAPÍTULO IV:

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 ENSAYOS PRELIMINARES

CUADRO N° 4
DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

MUESTRA VEGETAL	PORCENTAJE DE HUMEDAD (%)
<i>Baccharis chilco</i> H.B.K. (Chillca)	1.65
<i>Schinus molle</i> L. (Molle)	1.52
<i>Ephedra americana</i> (Pinco - pinco)	1.32
<i>Medicago lupulina</i> L. (Trébol)	2.61
<i>Taraxacum officinale</i> Wiggers. (Diente de león)	2.00
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	1.64
<i>Urtica urens</i> L. (Ortiga)	1.70
<i>Caiophora rosulata</i> (Weddel) Urban & Gilg (Madre kisa)	2.47
<i>Ambrosia arborescens</i> (Marcju)	1.68
<i>Acanthoxanthium spinosum</i> (L) (Alkko kiska)	0.84

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos podemos observar que los porcentajes de humedad de las especies vegetales: Trébol y Madre Kisa muestran los valores más altos de 2.61 % y 2.47 % respectivamente. También se observa que el Alkko kiska presenta el menor porcentaje de humedad 0.84%, estas diferencias podrían deberse al hábitat en el cual se desarrolla cada especie, así como también, a la temporada en la que se realiza la recolección de las especies, ya que las condiciones climáticas varían según la estación.

Sin embargo los porcentajes de humedad obtenidos no superan el 3 %, es decir, que la cantidad de agua que poseen las muestras, no afectará la concentración de etanol utilizado para la extracción.

CUADRO N° 5

PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS LIOFILIZADOS OBTENIDOS DE LAS DIEZ ESPECIES.

FAMILIA / ESPECIE Y NOMBRE COMÚN	MATERIAL VEGETAL (50 g)	RENDIMIENTO (%)
Anarcadiaceae: <i>Schinus molle</i> L. (Molle)	Tallo, hojas y frutos	15.07
Lamiaceae: <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	Tallos y hojas	39.01
Asteraceae: <i>Ambrosia arborescens</i> (Marcju)	Hojas y tallos.	14.75
<i>Baccharis chilco</i> H.B.K. (Chillca)	Hojas y tallos.	13.37
<i>Taraxacum officinale</i> Wiggers. (Diente de león)	Raíz, tallos, hojas y flores.	15.46
<i>Acanthoxanthium spinosum</i> (L) (Alkko kiska)	Tallos, hojas.	14.44
Urticaceae: <i>Urtica urens</i> L. (Ortiga)	Tallos y hojas	10.42
Loasaceae: <i>Caiophora rosulata</i> (Weddel) Urban & Gilg (Madre kisa)	Hojas, tallos y flores.	9.78
Fabaceae: <i>Medicago lupulina</i> L. (Trébol)	Hojas, tallos y raíz.	8.71
Ephedraceae: <i>Ephedra americana</i> . (Pinco - pinco)	Tallos y frutos	10.28

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo al cuadro N° 5 se observa que la especie vegetal que presentó mayor porcentaje de rendimiento fue *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) (39.01 %). Las especies *Taraxacum officinale* Wiggers. (Diente de león), *Schinus molle* L. (Molle), *Ambrosia arborescens* Mill. (Marcju), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (Alkko kiska), *Baccharis chilco* H.B.K. (Chillca) mostraron un porcentaje de rendimiento entre 13 y 16 %. Mientras *Urtica urens* L. (Ortiga), *Ephedra americana* H. & B. (Pinco - pinco), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (Madre kisa), *Medicago lupulina* L. (Trébol) son las especies que obtuvieron los menores rendimientos entre 8 y 11%.

El porcentaje de rendimiento permite conocer la cantidad de metabolitos secundarios obtenidos, la naturaleza polar o apolar de éstos, de acuerdo al

solvente utilizado y la cantidad de materia prima necesaria para obtener un rendimiento óptimo del extracto.

El rendimiento de la extracción depende de las condiciones experimentales: temperatura, presión, naturaleza del solvente así como la naturaleza de los compuestos a extraer (peso molecular, estructura química, volatilidad, polaridad).

4.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA POR LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE LAS ESPECIES: *Schinus molle* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Baccharis chilco* H.B.K., *Taraxacum officinale* Wiggers., *Ephedra americana* H. & B., *Ambrosia arborescens* Mill., *Urtica urens* L., *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg., *Acanthoxanthium spinosum* (L) Fourreau, *Medicago lupulina* L.

CUADRO N°6

ESPECIE VEGETAL 100 µg/ml	PORCENTAJE DE INHIBICION DE XANTINA OXIDASA (%)
Alopurinol (Patrón) 25µg/ml	94,1033
<i>Medicago lupulina</i> L. (Trébol)	61,0300
<i>Baccharis chilco</i> H.B.K. (Chilca)	52,3567
<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	45,2033
<i>Urtica urens</i> L. (Ortiga)	41,9167
<i>Ambrosia arborescens</i> (Marcju)	39,8533
<i>Caiophora rosulata</i> (Weddel) Urban & Gilg (Madre kisa)	32,2700
<i>Taraxacum officinale</i> Wiggers. (Diente de león)	29,5533
<i>Acanthoxanthium spinosum</i> (L) (Alkko kiska)	8,5933
<i>Schinus molle</i> L. (Molle)	7,5667
<i>Ephedra americana</i> (Pinco - pinco)	4,6200

ANOVA: sig = 0.000

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos se observa que las diez especies vegetales evaluadas mostraron inhibición frente a la enzima xantina oxidasa a la concentración de 100 µg/ml.

De acuerdo al análisis estadístico realizado (ANOVA), que mostró una significancia igual a 0.000, lo cual indica que si existe diferencia significativa entre los porcentajes de inhibición de xantina oxidasa de los extractos de cada especie vegetal.

Sin embargo sólo dos especies: *Medicago lupulina* L. (Trébol) y *Baccharis chilco* H.B.K. (Chillca) fueron las que presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50%, pero menores al porcentaje de inhibición del fármaco patrón (alopurinol) 94.10%.

Las especies *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Urtica urens* L. (ortiga), *Ambrosia arborescens* Mill. (Marcju), *Caiophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg (madre kisa) y *Taraxacum officinale* Wiggers (diente de león) presentaron porcentajes de inhibición entre 46 y 20%.

En tanto que las especies: *Acanthoxanthium spinosum* (L) (Allkko kiska), *Schinus molle* L. (Molle) y *Ephedra americana* H. & B. (Pinco - pinco) mostraron los porcentajes de inhibición más bajos, menores al 9%.

En este estudio las especies que presentan mayor porcentaje de inhibición pertenecen a las Familias Fabaceae (*Medicago lupulina* L.) y Asteraceae (*Baccharis chilco*).

En estudios anteriores sobre Actividad Inhibitoria de Xantina Oxidasa realizado por Patrick L. Owen y Timothy Johns, 1999 (29). Se obtuvieron: 37.56% para *Trifolium repens* y -2.05% para *Medicago alba*; especies también pertenecientes a la familia Fabaceae. Así como se reporta un -1.96% para *Urtica dioica* (raíces) perteneciente a la Familia Urticaceae.

Esto demuestra que especies pertenecientes a una misma familia no poseen la misma concentración ni composición de metabolitos secundarios, responsables de esta actividad.

Otros estudios realizados sobre la actividad inhibitoria de xantina oxidasa, muestran que los flavonoides son fuertes inhibidores de esta enzima. (32),(35).

Así también en un estudio realizado en la Familia Lamiaceae, se observa que la actividad inhibitoria de xantina oxidasa puede deberse al contenido de flavonoides y polifenoles presentes en las especies de esta familia (27).

4.3 EXTRACCIÓN POR FRACCIONAMIENTO DE LA ESPECIE VEGETAL QUE PRESENTÓ MAYOR PORCENTAJE DE ACTIVIDAD INHIBITORIA. (*Medicago lupulina* L.)

CUADRO N° 7

PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN FRACCIONADA

SOLVENTE	PORCENTAJE DE RENDIMIENTO (%)
Hexano	0.84
Diclorometano	1.02
Cloroformo	1.45
Cloroformo-Metanol (4:1)	2.11
Metanol	6.68
Agua	10.03

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento de la extracción fraccionada de *Medicago lupulina* L. (Trébol), los extractos metanólico y acuoso muestran mayor rendimiento 6.68 % y 10.03 % respectivamente, a diferencia del extracto hexánico, el cual obtuvo menor rendimiento 0.84%.

Esto podría deberse a la cantidad de metabolitos secundarios de naturaleza polar presentes en la planta, ya que la extracción con solventes de polaridad creciente permite realizar un análisis más completo de metabolitos secundarios presentes en esta planta (trébol), ya que estos se irán separando según su mayor o menor polaridad, de acuerdo a la afinidad que presentan éstos por los solventes de naturaleza polar o apolar.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA DE LOS EXTRACTOS DE *Medicago lupulina L.* (Trébol) OBTENIDOS CON DIFERENTES SOLVENTES.

CUADRO N° 8

EXTRACTO 100µg/ml	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN (%)
Alopurinol (Patrón) 25µg/ml	91,7267
Hexano	28,2067
Diclorometano	12,7700
Cloroformo	18,9400
Cloroformo-Metanol (4:1)	41,1100
Metanol	64,6567
Agua	34,3733

ANOVA: sig = 0.000

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Del cuadro N° 8 de acuerdo al análisis estadístico realizado (ANOVA) que muestra una sig= 0.000; que indica que existe diferencia significativa en los porcentajes de inhibición de xantina oxidasa de los extractos obtenidos con diferentes solventes de *Medicago lupulina L.* (trébol).

Además se observa que los extractos de diclorometano y cloroformo presentan una baja actividad inhibitoria de xantina oxidasa de 12.77% y 18.94% respectivamente.

Los extractos hexánico, acuoso y cloroformo-metanol presentan un mediano porcentaje de inhibición de 28.2%, 34.37% y 41.11% respectivamente.

En el caso de los extractos hexánico, diclorometánico y clorofórmico se utilizó como agente tensoactivo el DMSO (dimetilsulfóxido), para mejorar la solubilidad de los extractos en agua; se usó un volumen de 20 µl, ya que este corresponde a una concentración que no excede el 1% de la solución final de la mezcla.

El extracto metanólico es el que presenta mayor porcentaje de inhibición de xantina oxidasa 64.65% en comparación con los demás extractos. Sin embargo el porcentaje de inhibición de éste en comparación al del patrón (alopurinol) es menor, por ser este último un inhibidor específico de xantina oxidasa.

Por lo tanto se puede concluir, que los metabolitos secundarios presentes en este extracto son de naturaleza polar y responsables de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa.

4.5 ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO QUE PRESENTÓ MAYOR ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA *Medicago lupulina* L.

CUADRO N° 9

METABOLITO SECUNDARIO	PRUEBA	RESULTADO
Azúcares Reductores	Benedict	+
Glicósidos	HCl al 1% + NaOH AL 1% + Benedict	+
Aminoácidos	Ninhidrina	+
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ al 1%	+
Flavonoides	Shinoda	+
	Amoniaco	+
Alcaloides	Dragendorf	-
	Mayer	-
Saponinas	Espuma	+
Taninos	Gelatina - sal	+

Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

Leyenda:

- El signo + indica reacción positiva.
- El signo - indica reacción negativa.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Como se observa en el cuadro N° 9 El análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico de *Medicago lupulina* L. (Trébol) mostró la presencia de azúcares reductores, glicósidos, aminoácidos, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y taninos.

Así como la prueba para la detección de alcaloides en el extracto metanólico de *Medicago lupulina* L. resultó negativa.

De acuerdo a los estudios fitoquímicos realizados a esta especie (trébol) se ha reportado la presencia de: cumestrol y alrededor de un 2% de isoflavonas derivadas de la genisteína, daidzeina, formononetin y biochanina A (15)

Estudios realizados en Norteamérica de plantas nativas reportaron que la actividad inhibitoria de xantina oxidasa esta relacionada positivamente con su contenido en compuestos fenólicos y taninos (29).

Por lo tanto de acuerdo a los resultados obtenidos y a los antecedentes bibliográficos revisados, la actividad inhibitoria de xantina oxidasa mostrada por *Medicago lupulina* L. podría deberse a su contenido de compuestos fenólicos, flavonoides o taninos.

4.6 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

- En la TLC realizada en la primera parte, a las fracciones obtenidas de la separación del extracto metanólico se obtuvieron:

Una fracción retenida que muestra una buena separación de sus componentes luego de la corrida cromatográfica, más no se observa lo mismo en la fracción no retenida (obtenidas a partir de la fracción acuosa) y en la fracción clorofórmica.

De acuerdo con la separación observada en las placas cromatográficas y del sistema de solventes utilizado, se puede concluir que los metabolitos presentes en esta fracción son de naturaleza polar.

Por lo tanto se decidió continuar con el proceso de purificación y separación por cromatografía en columna sólo con esta fracción.

4.7 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

FIGURA N° 10

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA DE EXTRACTO ACUOSO

A LUZ UV

A SIMPLE VISTA



Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El extracto acuoso fue sometido a cromatografía en columna, utilizando el sistema: gradiente de cloroformo: metanol (Cuadro N° 3). Se observó en el extracto acuoso, una fluorescencia azulina a la luz UV y luego se tornó de color amarillo a simple vista.

Se obtuvieron 80 fracciones de 2ml cada una, algunas a simple vista no presentaron coloración (fracción 1 – 23), coloración naranja (fracción 35-37), coloración amarilla (fracción 50 – 55) y ligeramente amarilla (fracción 60 – 79) que fueron llevadas a TLC, para determinar la similitud y naturaleza de estas.

- En la segunda parte de TLC, luego de haber realizado la cromatografía en columna del extracto acuoso, se puede observar:

FIGURA N° 11:

FRACCIONES DEL EXTRACTO ACUOSO A LA LUZ ULTRAVIOLETA



Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

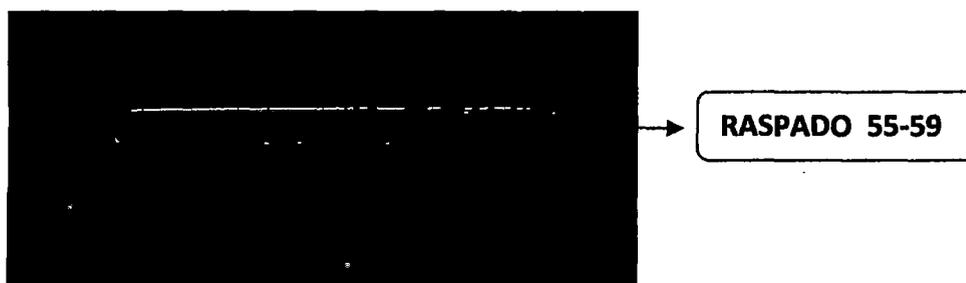
En la placa cromatográfica del extracto acuoso observada a la luz UV, se muestran las cuatro fracciones obtenidas por CC.

Se puede observar que la fracción 1-23 muestra una mancha fluorescente amarilla en la zona superior de la placa con un $R_f = 0.75\text{cm}$. En la fracción 35-37 muestra una mancha fluorescente de color amarillo – naranja con $R_f = 0.63\text{cm}$. En la fracción 55-59 se observa una sola mancha amarilla oscura con $R_f = 0.54\text{cm}$. En la fracción 60-79 se observa una mancha oscura similar a la fracción 55-59, con $R_f = 0.50\text{cm}$. de acuerdo a los R_f obtenidos se

puede concluir que las fracciones 55-59 y 60-79 poseen el mismo metabolito secundario.

- En la tercera parte de TLC, se realizó una siembra en banda de cada una de las fracciones, obtenidas en la CC y después de haber realizado un TLC previo para observar la naturaleza y número de componentes de cada fracción. Con el objetivo de hacer un raspado de la zona de la mancha cromatográfica de cada fracción, para poder obtener fracciones más puras.

FIGURA N° 12
RASPADO DE FRACCIÓN ACUOSA



Fuente: Gutiérrez G, Mamani H, 2011

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

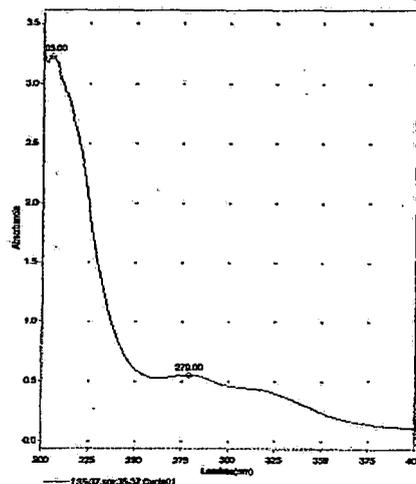
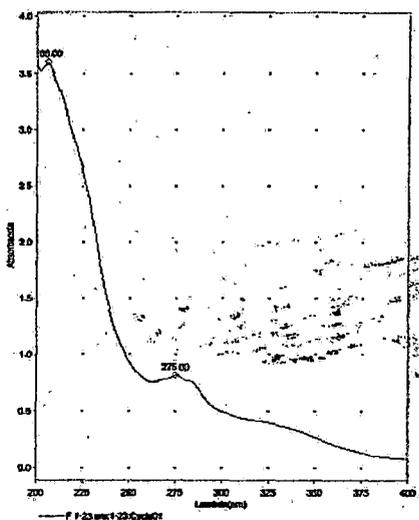
Por medio de este proceso se obtuvieron los raspados de cada fracción, luego fueron disueltas en metanol y filtrados en un filtro de 0.2 μm de diámetro de poro. Las soluciones de cada una de las fracciones se llevaron a una estufa a 40°C para que se concentren, y así obtener las fracciones puras.

Se obtuvieron en total cuatro fracciones raspadas provenientes del extracto acuoso.

4.8 ANÁLISIS ULTRAVIOLETA DE LOS ESPECTROS DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE CC.

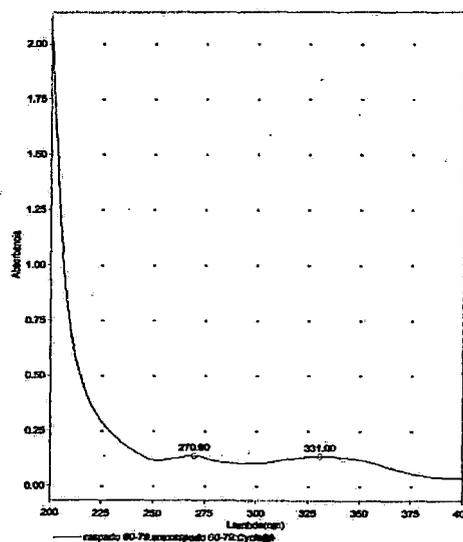
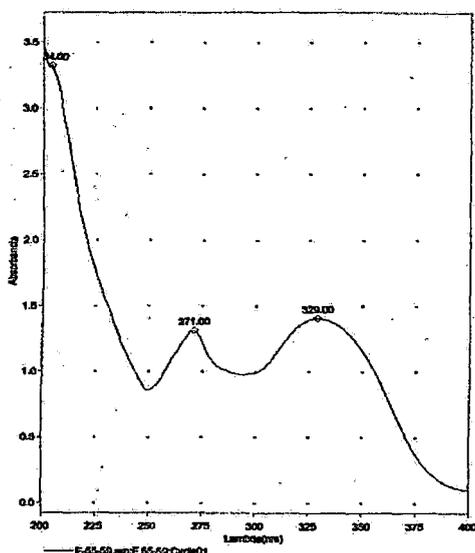
GRÁFICO N° 1

FRACCIÓN 1 – 23 FRACCIÓN 35 – 37



FRACCIÓN 55 – 59

FRACCIÓN 60 - 79



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo a los antecedentes revisados: Waksmundzka-Hajnos et. al, 2010(44). Los flavonoides son compuestos que contiene al menos un anillo aromático que absorben a la luz UV. La primera máxima longitud de onda se localiza en el rango de de 240 – 285 nm (banda II), la cual está presente en todos los tipos de flavonoides, el cual se debe a la presencia del anillo A. la segunda máxima longitud de onda está en el rango de 300 – 550 nm, que se debe al tipo de sustitución y conjugación del anillo C (banda I). Sustituyentes

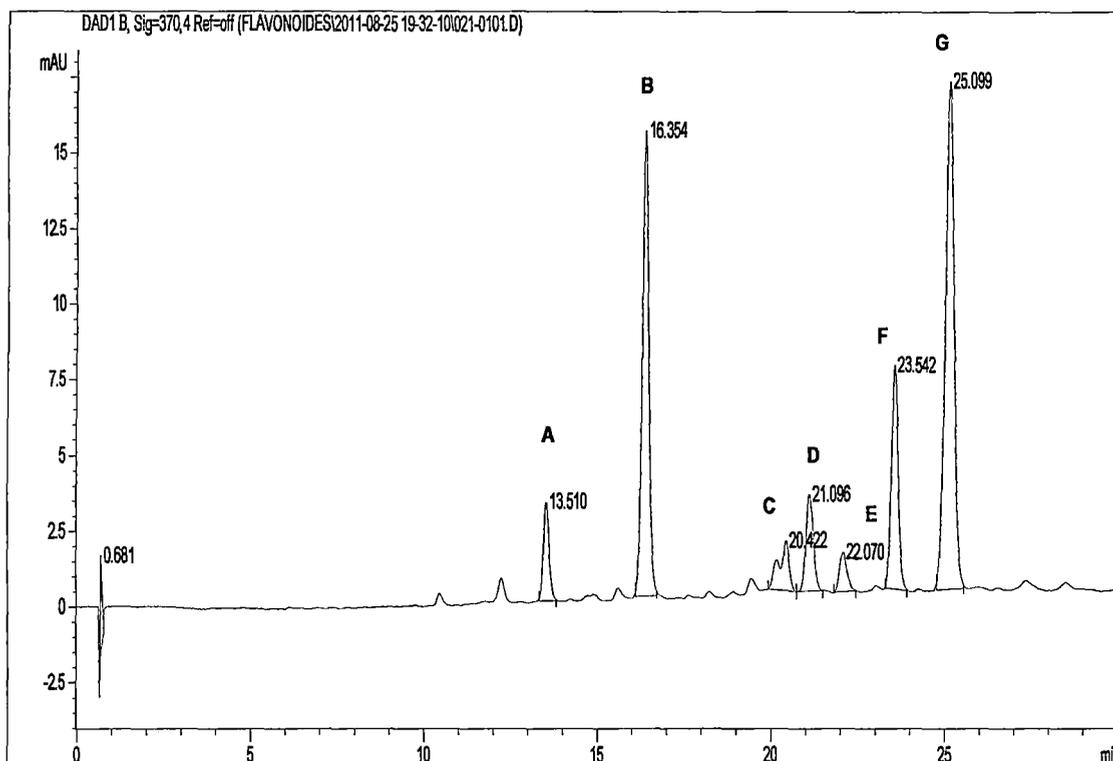
simples como metil, metoxi y grupos hidroxilos no disociados generan solo cambios menores en la posición de la absorción máxima.

Los espectros UV obtenidos de las fracciones 55-59 y 60- 79 presentan longitudes de onda a: 275 nm; 279 nm; 271 nm - 329 nm y 270 nm – 331 nm respectivamente.

Por lo tanto de acuerdo a lo antes mencionado y a los antecedentes farmacológicos que poseen los flavonoides; se podría decir que los compuestos presentes en *Medicago lupulina* L. responsables de la actividad inhibitoria de XO, son flavonoides.

4.9 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) DEL EXTRACTO METANÓLICO HIDROLIZADO DE *Medicago lupulina* L.(TRÉBOL)

GRÁFICO N° 2:



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

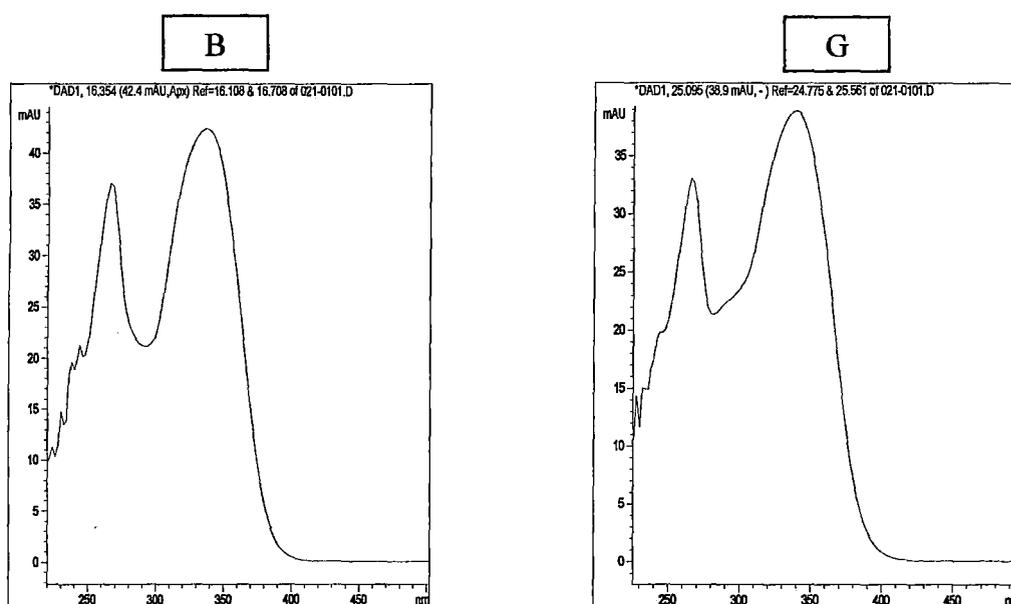
Del cromatograma obtenido del extracto hidrolizado de *Medicago lupulina* L.; se obtuvieron 07 picos, que corresponderían a 07 flavonoides diferentes. Los cuales presentan los siguientes tiempos de retención:

- A. Tr = 13.51min
- B. Tr = 16.35min
- C. Tr = 20.42min
- D. Tr = 21.09min
- E. Tr = 22.07min
- F. Tr = 23.54min
- G. Tr = 25.09min

Siendo A y B los compuestos que presentan mayor polaridad por presentar tiempos de retención menores, y F es el compuesto más apolar. Basado en el sistema de solventes utilizados en la fase móvil.

De los siete picos obtenidos dos se encuentran en mayor abundancia, B y G, los que se consideran más importantes. Estos presentan los siguientes espectros UV:

**GRÁFICO Nº 3:
ESPECTROS UV DE LOS PICOS DE MAYOR INTENSIDAD OBTENIDOS
DEL CROMATOGRAMA POR HPLC.**

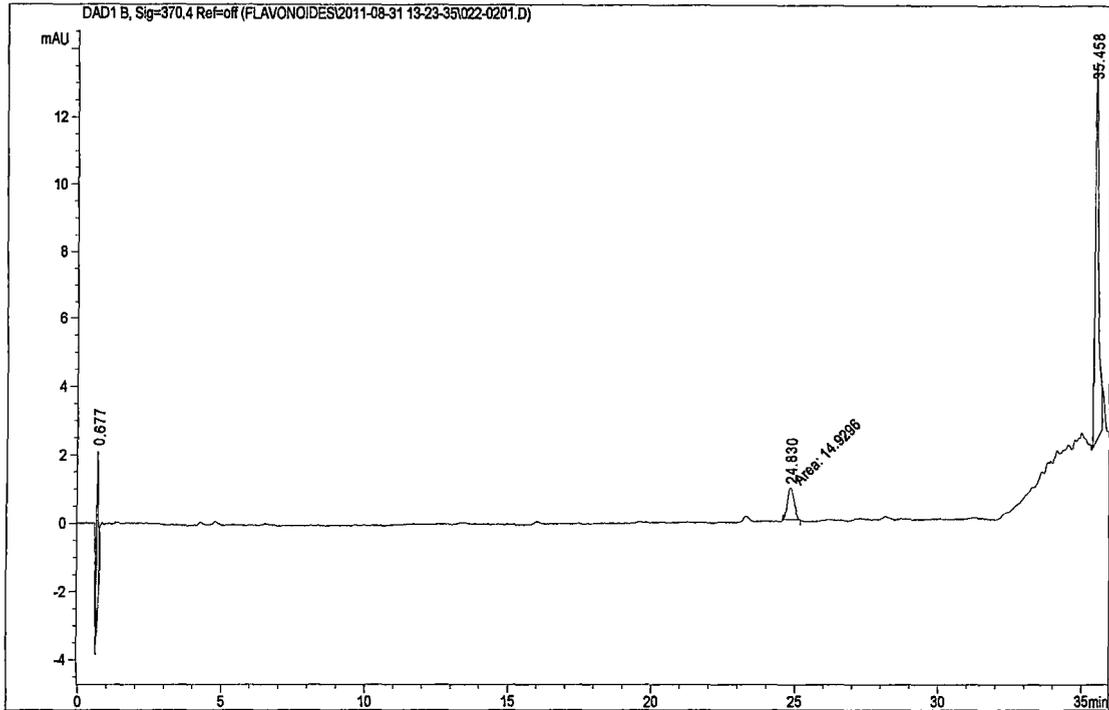


De los espectros obtenidos, se tiene en el pico B longitudes de onda máxima de 266 nm (banda II) y 337 nm (banda I) y en el pico G longitudes de onda máxima a 270 nm (banda II) y 340 nm (banda I).

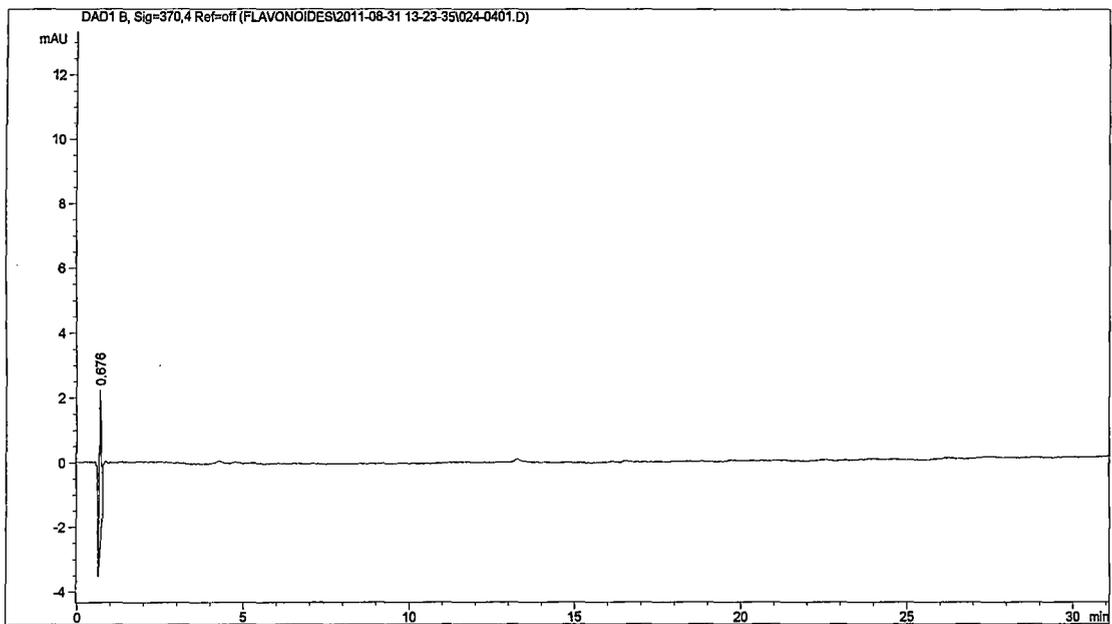
Para poder determinar la correspondencia entre las fracciones obtenidas por CC del extracto acuoso y los picos obtenidos en el cromatograma por HPLC, se realizó también una corrida por HPLC de las fracciones.

GRÁFICO Nº 4:
CROMATOGRAMA Y ESPECTROS UV DE LAS FRACCIONES
OBTENIDAS POR HPLC.

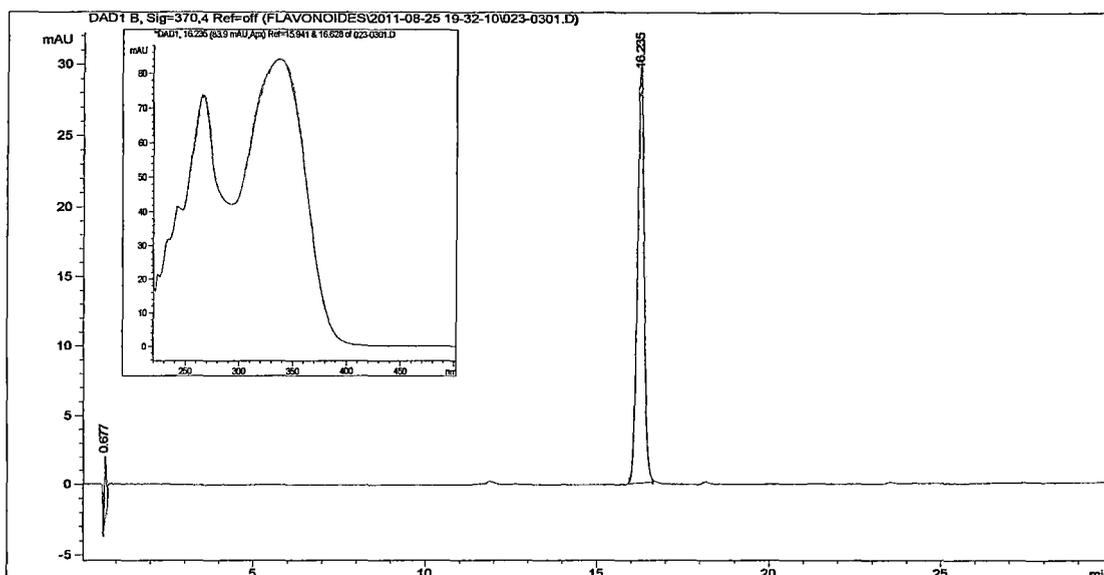
FRACCIÓN 1 - 23



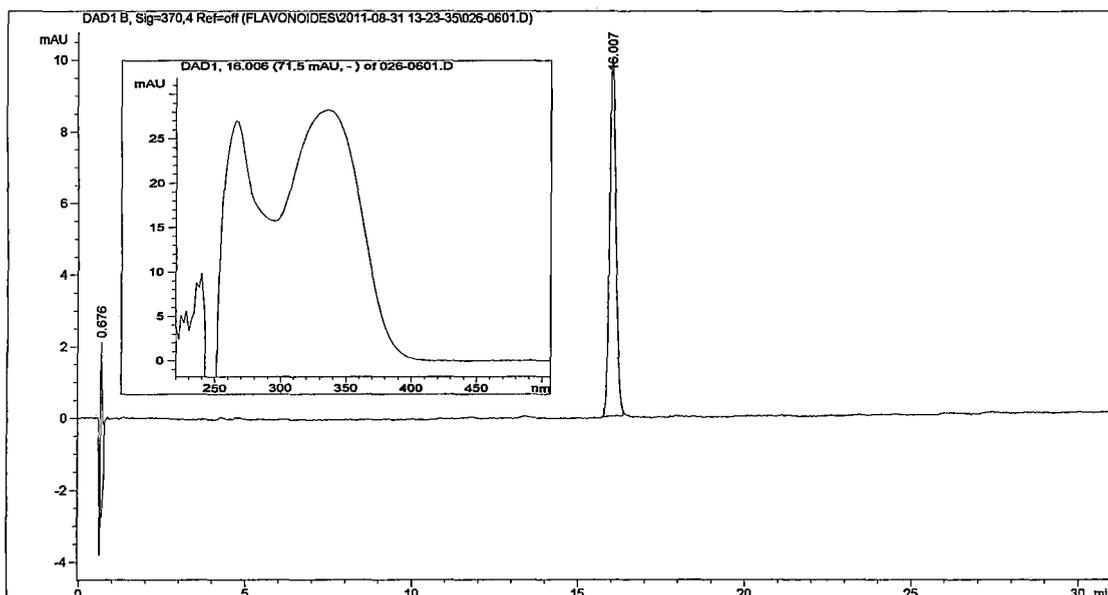
FRACCIÓN 35 - 37



FRACCIÓN 55 – 59



FRACCIÓN 60 - 79



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

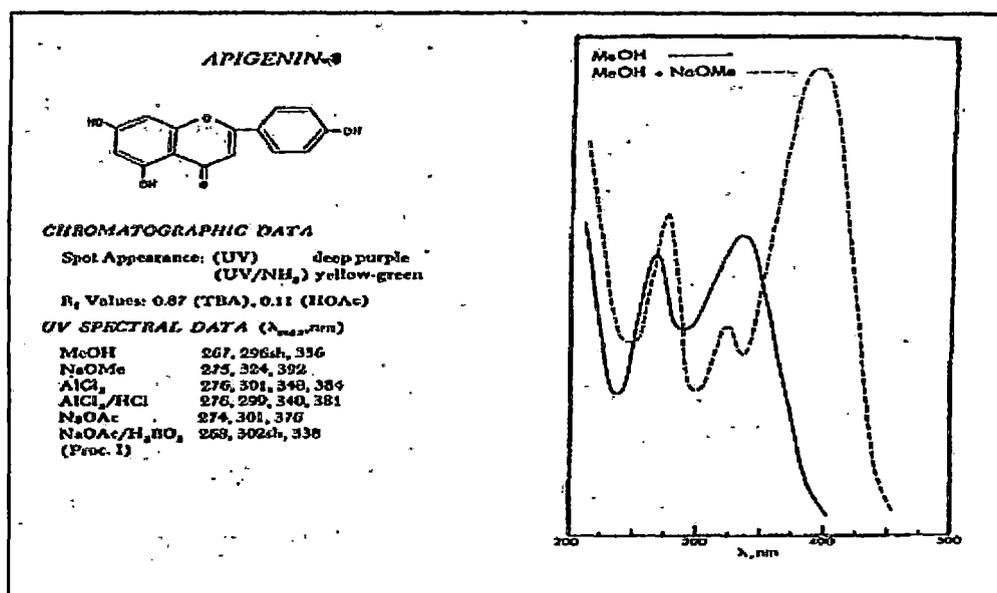
De los cromatogramas obtenidos de las cuatro fracciones del extracto acuoso, se observa la presencia de un mismo pico con mayor abundancia en dos de las fracciones (55-59, 60-79) con un mismo $T_r = 16$ min; que muestran un espectro UV similar entre sí. En las otras dos fracciones: 1-23 se puede observar que presenta un pico con un $T_r = 24$ min, el cual no presenta espectro UV; y en la fracción 35-37 no se observa ningún pico.

Por lo tanto, estas dos fracciones no contienen los metabolitos secundarios a los cuales atribuimos la actividad inhibitoria de xantina oxidasa.

De acuerdo a la bibliografía consultada (45) el espectro que se observa en el compuesto B y en dos de las fracciones ($\lambda = 266 \text{ nm}$, 337 nm) posee una gran similitud en sus longitudes de onda a la flavona APIGENINA (267 nm , 336 nm) (Fig. N° 13)

Estudios relacionados con la actividad inhibitoria de xantina oxidasa reportaron que los flavonoides: Apigenina y Luteolina son fuertes inhibidores de esta enzima (32).

FIGURA N°13
ESPECTRO UV DE APIGENINA



La diferencia que se observa al inicio de la banda II en el espectro del compuesto B y dos de las fracciones, con el de apigenina, podría deberse a los solventes utilizados en la corrida cromatográfica del compuesto B y fracciones (ácido fórmico al 5%- acetonitrilo) y al solvente utilizado para la obtención del espectro de apigenina (metanol).

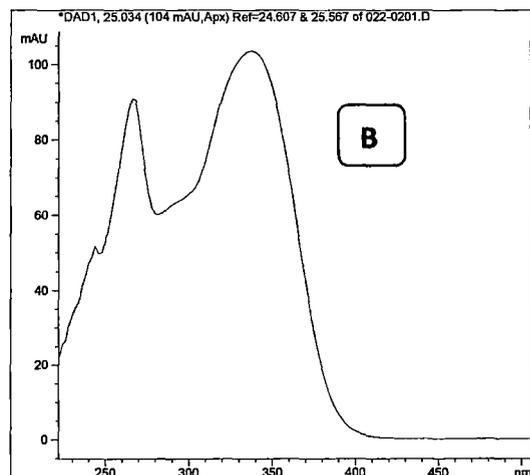
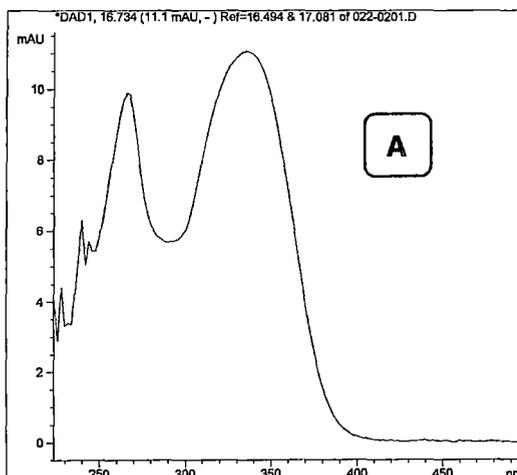
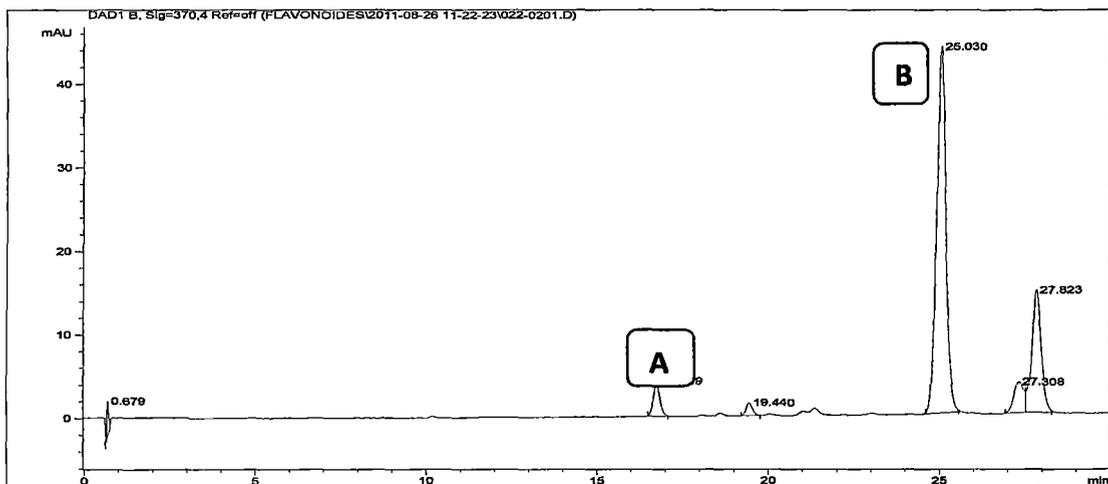
Según antecedentes bibliográficos, en la especie *Medicago lupulina* L. se reportaron los siguientes compuestos: laricitrina, vestitol (46); quercetina, kaemferol, kaemferol 8-O-metyl éter, luteolina (47); genistin (48). Como se puede observar no existe ningún estudio que muestre la presencia de apigenina en *Medicago lupulina* L., lo cual podría deberse a variables climáticas que no solo afectan al crecimiento y desarrollo de las plantas, sino

que inciden notablemente en la biosíntesis de sus principios activos. Se ha comprobado como las mismas plantas, cuando son cultivadas en zonas de diferente climatología, presenta distinta composición química, tanto en calidad como en cantidad (49).

Por no contar con patrones de flavonoides, para poder realizar la comparación de la corrida de las muestras por HPLC; se decidió utilizar una especie vegetal de referencia (*Petroselinum sativum*, PEREJIL), el cual de acuerdo a la bibliografía consultada esta confirmada la presencia de la flavona apigenina en su composición(50).

Para lo cual se realizó el análisis por HPLC de esta especie, en las mismas condiciones de extracción y corrida, para poder realizar las comparaciones correspondientes.

GRÁFICO N° 5:
CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO METANÓLICO HIDROLIZADO Y
ESPECTROS UV DE LA ESPECIE VEGETAL *Petroselinum sativum*
(PEREJIL)



Del cromatograma obtenido se observa similitud entre los picos A y B de la especie vegetal *Petroselinum sativum* (PEREJIL) y los picos B y G de la especie *Medicago lupulina* L. (TRÉBOL), en sus $T_r = 16\text{min}$ y 25min y en sus espectros UV. Por lo cual se podría afirmar que se trata de los mismos compuestos. De acuerdo al espectro UV y al $T_r = 16\text{min}$; el pico A correspondería a la flavona APIGENINA, compuesto que está demostrado que existe en la especie *Petroselinum sativum* (PEREJIL).

De acuerdo a los estudios encontrados sobre *Petroselinum sativum* (PEREJIL), la apigenina se encuentra presente en abundante concentración (51). Sin embargo, en el cromatograma obtenido se observa que la presencia de este compuesto no corresponde al pico más abundante, lo cual podría deberse a la variación que existe en el tiempo y estadio de recolección de la planta, dato que no es reportado en la bibliografía consultada. Así también una variación importante es la zona de crecimiento, suelo y clima.

En cuanto a la identificación del pico B, sólo se podría concluir que se trata de un flavonoide, por la longitud de onda (370nm) utilizada en la corrida de HPLC, longitud comúnmente utilizada para la detección de flavonoides. Así como también, las longitudes de onda máxima presentes en este compuesto, que se encuentran dentro del rango de longitudes de onda que muestran los flavonoides. Sin embargo, la identificación final de este compuesto no es posible, ya que en la bibliografía consultada, no existe un flavonoide que presente estas mismas características, por lo que es necesario realizar estudios más específicos como RMN y otros.

CONCLUSIONES

1. Los extractos etanólicos secos al 70 % de las plantas usadas tradicionalmente para el tratamiento de gota poseen actividad inhibitoria de xantina oxidasa y los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal con mayor porcentaje de inhibición de xantina oxidasa son de tipo flavonoides.

2. Se obtuvieron los extractos etanólicos liofilizados de las especies: *Schinus molle* L. (molle), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Baccharis chilco* H.B.K. (chilca), *Taraxacum officinale* Wiggers. (diente de león), *Ephedra americana* H. & B. (pinco-pinco), *Ambrosia arborescens* Mill. (marcju), *Urtica urens* L. (ortiga), *Caioophora rosulata* (Weddel) Urban & Gilg. (madre kisa), *Acanthoxanthium spinosum* (L) (alkkho kiska), *Medicago lupulina* L. (trébol), por el método de maceración y posterior liofilización, siendo el extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), el que presentó un mayor porcentaje de rendimiento (39.01%).

3. De la determinación de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa de las especies en estudio y el fármaco patrón (alopurinol), el extracto de *Medicago lupulina* L. (Trébol) presentó el mayor porcentaje de inhibición de 61.03%. Sin embargo, este resultado es inferior en comparación al porcentaje de inhibición que presentó el fármaco patrón (alopurinol) 94.10 % por tratarse de un inhibidor específico de xantina oxidasa.

4. Del proceso de extracción fraccionada de *Medicago lupulina* L. (Trébol), con solventes de diferente grado de polaridad: hexano, diclorometano, cloroformo, cloroformo-metanol (4:1), metanol y agua. Los extractos metanólico y acuoso presentaron mayores porcentajes de rendimiento 6.68 % y 10.03%, respectivamente. Por lo tanto, los metabolitos secundarios presentes en esta especie vegetal son de naturaleza polar.

5. De la determinación de la actividad inhibitoria de xantina oxidasa por los extractos obtenidos de *Medicago lupulina* L. (trébol) con solventes de diferente polaridad, el extracto metanólico presentó el mayor porcentaje de inhibición de xantina oxidasa 64.65 %.
6. La composición fitoquímica cualitativa del extracto metanólico de *Medicago lupulina* L. (trébol), mostró la presencia de: azúcares reductores, glicósidos, aminoácidos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y saponinas.
7. Del proceso de purificación y separación por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna del extracto metanólico de *Medicago lupulina* L. (trébol), se obtuvo cuatro fracciones acuosas puras: fracción 1-23 ($R_f = 0.75\text{cm}$), fracción 35-37 ($R_f = 0.63\text{cm}$), fracción 55 – 59 ($R_f = 0.54\text{cm}$) y la fracción 60 – 79 ($R_f = 0.50\text{cm}$). Por lo tanto los metabolitos secundarios presentes en las fracciones 55-59 y 60-79 podrían ser los mismos.
8. Las longitudes de onda de los espectros UV y los cromatogramas obtenidos por HPLC del extracto metanólico hidrolizado de *Medicago lupulina* L. (trébol) y sus fracciones muestran la presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoides y de acuerdo a comparaciones realizadas con bibliografía consultada, uno de estos flavonoides, podría tratarse de una flavona, llamada APIGENINA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González Alfredo Andrés. Manejo de la Gota: Revisión. Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina - N° 131. México, 2003.
2. Flórez Jesús, Farmacología Humana. 3º Edición. Editorial Masson S.A, Barcelona, 1997.
3. Govantes Betes J. Lorenzo Fernández P, Govantes Estesó C. Manual Normon. 7ª ed. Madrid: Laboratorios Normon, S. A; 1999.
4. Salaverry García O. La Complejidad de lo Simple: Plantas Medicinales Y Sociedad Moderna. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 2005; 22(4): 245-246.
5. Beyra Ángela, León María del Carmen, Iglesias Eldris, Ferrándiz Diana, Herrera Reinaldo, Volpato Gabriele, Godínez Daimy, Guimaraes Mayrene, Álvarez Raquel. Estudios Etnobotánicos Sobre Plantas Medicinales en la Provincia de Camagüey (Cuba). Vol. 61 N° 2: 185-203. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 2004.
6. Berkow Robert, Beers Mark H, Fietcher Andrew. Manual Merck De Información Medica General. Editorial Océano. Barcelona, 1999.
7. Chisholm-Burns Marie, Wells Barbara, Schwinghammer Terry, Malone Patrick, Kolesar Jill, Rotschafer John, Dipiro Josheph. Pharmacotherapy Principles & Practice. Editorial McGraw-Hill. USA, 2008.
8. Benyon Sarah, O'Neale Roach Jason. Lo esencial en Metabolismo y Nutrición. España: Elsevier España; 2003.
9. Industria Farmacéutica Catalogo de Plantas Medicinales. Universidad de Lima. Facultad de Ing. Industrial. Centro de Investigación de la Producción (CIPI), Lima, 1994.
10. Moscoso Castilla Mariano. Secretos Medicinales de la Flora Peruana y Guía de la Maternidad. 3ª ed. Cusco-Perú: Tipografía Americana; 1963.
11. Palacios Vaccaro Julio. Plantas Medicinales Nativas Del Perú. 1ª ed. Lima-Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYTEC. 1993.

12. Becerra Gallarda Roger, Sigüeñas Saavedra Manuel. Perú: Segundo Informe sobre el Estado de los Recursos Filogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, 2007.
13. Agapito T., Sung I. Fitomedicina 1100 Plantas Medicinales. Editorial Isabel. Lima, 2004.
14. Cuadros Juan Manuel. Folklore Botanico Medicinal Arequipeño. Editorial Tipografia Cuadros. Arequipa – Perú, 1940.
15. Fitoterapia. Vademécum De Prescripción 4ta edición. Editorial Masson, Barcelona, 2003.
16. Ibarra Sosa, Caffo Marruffo R, Ibarra Montecinos M. Flora Fanerogámica Del Distrito Héroes Albarricin- Tacna.[Trabajo De Investigación]. Tacna-Perú, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2003.
17. Salinas Adriana, De Ruiz Rosa E. L y Ruiz Sohar O. Esteroles, Flavonoides y Lactonas Sesquiterpénicas Aisladas de *Xanthium Spinosum* L. Cronquist (Asteraceae) Acta Farma. Bonaerense 1998; 17 (49): 297-300.
18. Alvarado Chávez Britt. Plantas Medicinales De La Cordillera Negra .Revista Academica Peru Salud 14(2), 2007.
19. Fitoica. Revista Científica año 4 n° 1 enero- abril 2009.
20. Ballús Puri. Editorial Lexus. Barcelona, 2005.
21. Pahlow. M. El Gran Libro de las Plantas Medicinales. 5ª Edición. Editorial Everest. España, 1985.
22. Congreso de Terapias Alternativas. Aporte de los Vegetales en la Etnomedicina. Universidad de Winner, LIMA - PERU, 2007.
23. Domínguez XA, Carmona JF, Venegas RB. Mexican Medicinal Plants. Anacardiaceae Lignoceric Acid and Other Compounds of *Schinus molle*. J. Phytochemistry. Vol 10, N° 7. Departamento de Química. Instituto Tecnológico Super Monterrey NL, México, 1971.
24. Khera S, Woldemichael GM, Singh MP, Suarez E, Timmermann BN. A Novel Antibacterial Iridoid and Triterpene from *Caiophora Coronata*., J Nat Prod.; 66(12):1628-31 Department of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy, University of Arizona.USA, 2003.

25. Kazuya Murata, Kikuyo Nakao, Noriko Hirata, Kensuke Namba, Takao Nomi, Yoshihisa Kitamura et al. Hidroxichavicol: A Potent Xanthine Oxidase Inhibitor Obtained From The Leaves Of Betel, *Piper betle*. J Nat Med 2009; 63: 355- 359.
26. L.D. Kong, Y. Cai, W.W. Huang, Christopher H.K. Cheng, R.X. Tan. Inhibition Of Xanthine Oxidase by Some Chinese Medicinal Plants Used To Treat Gout. Journal of Ethnopharmacology 2000; 73: 199–207.
27. González Antonio G, Bazzocchi Isabel L , Moujir Laila , Angel G. Ravelo, Mireya D. Correa , Mahabir P. Gupta .Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Some Panamanian Plants from Celastraceae and Lamiaceae. J. Ethnopharmacology, Vol 46 N° 1: 25-29. Centro de Productos Naturales Orgánicos Antonio Gonzáles, La Laguna Tenerife, Canary Islands, Spain, 1995.
28. Sweeney A.P., Wyllie S.G, Shalliker R.A., Markham J.L. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Selected Australian Native Plants. Journal of Ethnopharmacology 2001; 75: 273-277.
29. Owen Patrick L., Johns Timothy. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Northeastern North American Plant Remedies used for Gout. Journal of Ethnopharmacology 1999; 64: 149-160.
30. Ferraz Filha Z.S et al. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of *Lychnophora* Species from Brazil “Árnica”. J. Ethnopharmacology, vol 107: 79-82. Universidad Federal De Minas Gerais, Brazil, 2006.
31. Unno Tomonori, Sugimoto Akio, Kakuda Takami. Xanthine Oxidase Inhibitors from the Leaves of *Lagerstroemia speciosa* (L) Pers. Journal of Ethnopharmacology 2007; 109: 547-551.
32. Noro Tadataka, Oda Yasushi, Toshio Miyase, Akira Ueno, Seigo Fukushima. Inhibithors of Xanthine Oxidase from the Flowers and Buds of *Daphne genkwa*. Chem. Pharm. Bull 1983; 31 (11): 3984-3987.
33. Isaza José Hipólito, García Vivas Andrea, Londoño Andrea M, Francisco J, Jiménez G, Juan Carlos Sepúlveda, Luz Stella Ramírez A. Determinación Espectrofotométrica de la Actividad Inhibitoria de Xantina Oxidasa en Extractos de Algunas Plantas Melastomatáceas.

- Scientia Et Technica (Colombia) 2007; Año XIII N°33. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Universidad Autónoma de México. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx>. Revisado Febrero 15, 2010.
34. Muthuswamy Umamaheswari, Kuppusamy AsokKumar, Arumugam Somasundaram, Thirumalaisamy Sivashanmugam, Varadharajan Subhadradevi, Thenvungal Kochupapy Ravi. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Some Indian Medical Plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 109: 547 - 551.
 35. Iio Masayoshi, Moriyama Ayako, Matsumoto Yoshiko. Inhibition of Xanthine Oxidase by Flavonoids. *Agric. Biol. Chem.* 1985; 49(7): 2173-2176.
 36. Jung-Feng Hsieh, Shih-Hsiung Wu, Yu-Liang Yang, Kee-Fong Choong and Shui-Tein Chen. The Screening and Characterization of 6-Aminopurine-Based Xanthine Oxidase Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2007; 15:3450-3456.
 37. Ling Dong Kong, Chen Yang, Fei Ge, Hai Dong Wang, Yu Song Guo. A Chinese Herbal Medicine Ermiao Wan Reduces Serum Uric Acid Level And Inhibits Liver Xanthine Dehydrogenase and Xanthine Oxidase In Mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 93: 325-330.
 38. Schmeda-Hirschmann G, Zuñiga J. Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of Flavonoids and Tannins from *Hexachlamys edulis* (Mirtaceae). *Phytotherapy Research.* 1996; 10: 260-262.
 39. Díaz Rubio M, Espinos D. *Tratado De Medicina Interna*. 1° Edición. Editorial Panamericana. Madrid, 1994.
 40. *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas – PLM*. Editorial PLM, Lima Perú, 1999.
 41. Neira Gonzáles M. Adriana Qco. Aslamiento e identificación de los Compuestos con Actividad Antioxidante del Extracto de Cloroformo de la Orquidea comestible *Prosthechea michuacana* (Tesis). Instituto Politécnico Nacional. Escuela nacional de Ciencias Biológicas. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación. México D.F, 2009.

42. Andersen Øyvind M., Markham Kenneth R. Flavonoid Chemistry, Biochemistry And Applications. Editorial Taylor & Francis Group. USA, 2006.
43. Wade L.G. Química Orgánica. 5ª Edición. Editorial Pearson Educación, Madrid, 2004.
44. Waksmundzka-Hajnos Monika, Oniszczyk Anna, Hajnos Mieczyslaw and Oniszczyk Tomasz. High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Vol. 102, United States of America: Editorial Taylor and Francis Group, LLC; 2011.
45. Mabry T.J, Markham K.R, and Thomas M. B, the Systematic Identification of Flavonoids. United States of América: Springer-Verlag New York Inc. 1970.
46. Bertoli Alessandra, Ciccarelli Daniela, Garbari Fabio y Pistelli Luisa. Flavonoids Isolated From *Medicago Littoralis* Rhode (Fabaceae) Their Ecological and Chemosystematic Significance. Caryologia vol. 63 N° 1: 106 -114. University of Pisa, Italy 2010.
47. Aziz K., Husain S.Z y Jahan N. Chemotaxonomic Studies of the Genus *Medicago* L. (Papilionoideae) from Pakistan. J. Botánica .Vol 25 N°2: 111-117, Pakistan, 1993.
48. Hanganu Daniela, Vlase Laurian, Olah Neli. LC/MS Analysis of Isoflavones from Fabaceae Species Extracts. J. Farmacia, vol.58 N° 2. Department of Pharmacognosy - Phytoterapy Faculty of Pharmacy. University of Medicine and Pharmacy "Luliu Hatieganu" Cluj – Napoca, 121. Creangă str. Romania, 2010.
49. Villar del Fresno Ángel. Editor. Farmacognosia General. Madrid: Editorial Síntesis, S.A.; 1999.
50. Justensen Ulla y Knuthzen Pia. Composition of Flavonoids in Fresh Herbs and Calculation of Flavonoid Intake by Use of Herbs in Traditional Danish Dishes. Food Chemistry 2001; 73 (2): 245-250.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE FIGURAS

1. <http://www.wolf.mind.net>. Revisado Febrero 15, 2010.
2. http://www.wc.pima.edu/Bfiero/tucsonecology/plants/shrubs_sewi.htm.
Revisado Febrero 15, 2010.
3. <http://www.intranet.inc-cusco.gob.pe>. Revisado Febrero 15, 2010.
4. <http://www.Wikipedia.org/imágenes>. Revisado Febrero 15, 2010.
5. <http://www.S.Vogel>. Revisado Febrero 15, 2010.
6. <http://www.Nucleus Medical Media, Inc>. Revisado Febrero 15, 2010.
7. <http://www.ehu.es/imacris>. Revisado Febrero 15, 2010.

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS

- **A LA UNIVERSIDAD NACIONAL SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**
 - A las autoridades universitarias se sugiere un mayor apoyo económico para trabajos de investigación.

- **A LA CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**
 - A los docentes se sugiere, una mejor implementación de los laboratorios, en lo referente a equipos, reactivos y materiales de laboratorio.

 - Motivar a los estudiantes a realizar más trabajos de investigación en productos naturales, ya que existe una gran variedad de especies vegetales que aún no han sido completamente estudiadas.

- **A LOS ESTUDIANTES**
 - Se les sugiere continuar con la investigación de la especie vegetal *Medicago lupulina* L. en lo que refiere a su actividad inhibitoria de xantina oxidasa a través de un modelo *in vivo*, para poder realizar las comparaciones del caso, así como determinar si pudiera presentar algún tipo de toxicidad.

 - Se les sugiere investigar más profundamente a cerca de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de *Medicago lupulina* L, para poder determinar qué clase de flavonoides están presentes, a través de estudios de RMN, etc.

 - Se les sugiere un mayor interés en la capacitación del manejo de equipos como: HPLC y GC importantes para la determinación de metabolitos secundarios y con los que cuenta nuestra universidad.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Inhibición enzimática:** Proceso por el cual se disminuye la actividad catalítica de las enzimas.
- **Xantina:** Base purínica formada como producto de la degradación de adenina y guanina, pero que no se encuentra en los ácidos nucleicos.
- **Xantina oxidasa:** Enzima oxidorreductasa que cataliza la reacción de formación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico.
- **Ácido úrico:** Producto del metabolismo proteico que se encuentra en la sangre y la orina, cuyo incremento da lugar a la hiperuricemia, que puede desembocar en una crisis de gota por depósito articular de cristales de urato monosódico, tofos, nefropatía o nefrolitiasis; 2, 6, 8-trioxipurina.
- **Gota:** Artritis por alta concentración de ácido úrico en la sangre. Alteración del metabolismo de las purinas, que afecta, predominantemente, a los varones de edad media.
- **Cromatografía:** Método de análisis que permite la separación de gases o líquidos o sólidos en disolución por adsorción selectiva, produciendo manchas diferentemente coloreadas en el medio adsorbente.
- **Cromatografía en capa fina:** Es una técnica cromatográfica. La fase estacionaria es una capa uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. Los requisitos son un absorbente (por ejemplo silica gel), placas, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de absorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.
- **Cromatografía en columna:** Se utilizan columnas de vidrio rellenas de Alúmina (Al_2O_3), Sílica u Oxido de Magnesio. La fase estacionaria está constituida por un sólido poroso, el cual queda soportado en el interior de una columna generalmente fabricada en plástico o vidrio. La fase móvil se encuentra formada por la solución que lentamente va atravesando la fase estacionaria.

- **Fase móvil:** Consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria.
- **Fase estacionaria:** Consiste en un sólido o líquido fijado en un sólido.
- **Cromatograma:** Es el resultado gráfico de la cromatografía. En el caso de separación óptima, los diferentes picos o manchas del cromatograma se corresponden a los componentes de la mezcla separada.
- **Metabolitos Secundarios:** Son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción del mismo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente.
- **Flavonoides:** Del latín flavus, "amarillo". Es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua.

ANEXOS

ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Se realizó la marcha fitoquímica, para la detección de metabolitos secundarios utilizando reactivos químicos de caracterización dando una reacción específica.

El extracto metanólico de hojas, tallos y raíz de *Medicago lupulina* L. (concentrados a sequedad) aproximadamente 0.5g del extracto fue diluido en 5ml de metanol, esta solución se utilizó para las siguientes pruebas.

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES:

❖ PRUEBA DE BENEDICT.-

A 0.5ml de extracto agregar 0.2ml de reactivo de Benedict, se somete a ebullición por 5 minutos y se deja enfriar. La formación de un precipitado rojo ladrillo indica prueba positiva.

❖ PRUEBA DE FEHLING.-

Tomar 0.5 ml de solución de FEHLING A con 1 ml de FEHLING B calentar a fuego directo con 0.5ml de solución problema, continuar el calentamiento, se observara un precipitado rojo ladrillo.

DETERMINACIÓN DE GLICÓSIDOS.-

A 0.005g de extracto, se le adiciona 0.05ml de ácido clorhídrico al 1% refluja por unos minutos, enfriar y neutralizar con hidróxido de sodio al 1%. Realizar la prueba de BENEDICT. La formación de un precipitado rojo ladrillo, indica prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE AMINOÁCIDOS.-

❖ PRUEBA DE NINHIDRINA.-

A 0.5 ml de extracto acidificado con ácido clorhídrico al 1%, agregar 2 a 3 gotas de la solución de ninhidrina al 1%, calentar por 5 minutos en baño de agua a ebullición. Coloraciones rojizas, violetas o amarillas indican prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.-

❖ CLORURO FÉRICO.-

A 0.5 ml de extracto agregar 1 a 2 gotas de cloruro férrico (FeCl_3 al 1%) en solución acuosa. La presencia de precipitado o coloraciones azul, verde o marrón, indican prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES.-

❖ REACCIÓN DE SHINODA.-

A 0.5 ml de extracto, agregar algunas limaduras de magnesio, más 2 a 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. El desarrollo de inmediata de coloración es indicativo de la presencia de: flavonas (amarillo a rojo), flavonoles (rojo a magenta), flavononas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavonas, chalconas y auronas no dan coloración.

❖ PRUEBA DE AMONIACO.-

En una tira de papel filtro se coloca una gota de solución alcohólica de la sustancia. Se seca y se expone a vapores de amoníaco. La formación de un determinado color depende del tipo de flavonoide. Amarillo (flavonas, flavonoles y xantonas), amarillo-rojo (chalconas y auronas), anaranjado (dihidroflavonoles), incoloro-anaranjado (dihidroflavononas), azul (antocianinas).

DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES.-

Para realizar las pruebas se utilizo 0.005g, solubilizado en ácido clorhídrico al 5%, se filtra y al filtrado se le realiza la determinación de alcaloides (excepto para la reacción de Mayer).

❖ REACCIÓN DE DRAGENDORF.-

A 0.5 ml de la solución de HCl al 5%, agregar 2 a 3 gotas de reactivo de Dragendorf de un precipitado naranja o marrón, indica prueba positiva.

❖ REACCIÓN DE MAYER.-

A 0.5 ml del extracto, agregar 2 a 3 gotas de reactivo de mayer, un precipitado blanco o amarillo, marrón indica prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE TANINOS.-

A 0.5 ml de extracto, agregar 3 a 5 gotas de la solución gelatina – NaCl al 1%. La formación de precipitado indica prueba positiva.

DETERMINACIÓN DE SAPONINAS.-

❖ PRUEBA DE LA ESPUMA.-

A un tubo de ensayo que contenga 2ml de extracto, diluir 2 veces su volumen en agua agitar vigorosamente por 5 minutos. La formación de espuma persistente por 15 minutos indica prueba positiva.

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ESPECIE VEGETAL :					% DE
TUBOS	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO	INHIBICION
1: MUESTRA					
2: BLANCO MUESTRA					
3: CONTROL					
4: BLANCO CONTROL					

ESPECIE VEGETAL :					% DE
TUBOS	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO	INHIBICION
1: MUESTRA					
2: BLANCO MUESTRA					
3: CONTROL					
4: BLANCO CONTROL					

ESPECIE VEGETAL :					% DE
TUBOS	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO	INHIBICION
1: MUESTRA					
2: BLANCO MUESTRA					
3: CONTROL					
4: BLANCO CONTROL					

ESPECIE VEGETAL :					% DE
TUBOS	ABSORBANCIA 1	ABSORBANCIA 2	ABSORBANCIA 3	PROMEDIO	INHIBICION
1: MUESTRA					
2: BLANCO MUESTRA					
3: CONTROL					
4: BLANCO CONTROL					

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- 1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS:** Para obtener una solución final de 100 µg/ml de cada especie vegetal, se pesó 1.4 mg de cada extracto y se disolvió en 2 ml de agua ultra pura. En caso de que el extracto no era soluble en agua, se utilizó un agente tensoactivo (dimetilsulfoxido) en una concentración que no exceda el 1% de la solución final.
- 2. PREPARACIÓN DEL PATRON (Alopurinol):** Para obtener una solución final de 25 µg/ml del patrón alopurinol, se pesó 0.5 mg de alopurinol y se disolvió en 3 ml de agua ultra pura. Luego se llevó a sonicar por 15 min para obtener una mejor disolución.
- 3. BUFFER FOSFATO (NaHPO₄ – K₂HPO₄):** Se pesó 0.48 gr de NaHPO₄ 70mM, se disolvió en agua ultra pura y se aforó en una fiola de 50 ml, luego se pesó 0.5 gr de K₂HPO₄ 70mM, se disolvió en agua ultra pura y se aforó a 50 ml. Posteriormente, se tituló en una bureta ambas soluciones hasta llegar a un pH de 7.5.
- 4. SOLUCIÓN DE HCl 1N:** Se aforó 8.3 ml de HCl concentrado a 100 ml con agua ultra pura.
- 5. SOLUCIÓN DEL SUSTRATO (XANTINA):** Para obtener una solución de 50 ml de xantina 150 µM, se disolvió 1.1 mg de xantina en 50 ml de agua ultra pura, luego se llevó a sonicar por 50 min. Posteriormente se utilizó HCl o NaOH para llegar a un pH final de la solución de 7.5. Mantener en refrigeración, duración máximo 2 días.
- 6. SOLUCIÓN DE LA ENZIMA (XANTINA OXIDASA):** Para una solución de 0.2 UI/µl de la enzima xantina oxidasa, se disolvió 5.08 µl de enzima en 604.92 µl de buffer fosfato, para obtener una solución final de 610 µl para 5 muestras. Se recomienda mantener la solución en baño de hielo, para evitar la degradación de la enzima y preparar la solución momento antes de realizar la parte experimental.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE XANTINA OXIDASA POR LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

ANOVA

% INHIBICION DE LA PLANTA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	20892,018	10	2089,202	401,055	,000
Intra-grupos	114,604	22	5,209		
Total	21006,622	32			

Leyenda:

gl: Grados de libertad

F: Distribución de Fisher (razón)

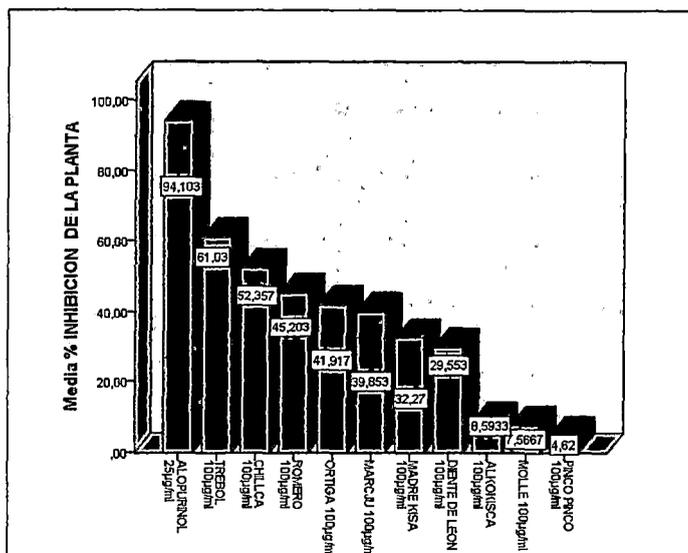
Sig: Significancia comparada

PRUEBA DE DUNCAN SOBRE EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE XANTINA OXIDASA POR LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

Duncan^a

MUESTRA	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
PINCO PINCO 100µg/ml	3	4,6200						
MOLLE 100µg/ml	3	7,5667						
ALKOKISCA 100µg/ml	3	8,5933						
DIENTE DE LEON 100µg/ml	3		29,5533					
MADRE KISA 100µg/ml	3		32,2700					
MARCJU 100µg/ml	3			39,8533				
ORTIGA 100µg/ml	3			41,9167	41,9167			
ROMERO 100µg/ml	3				45,2033			
CHILLCA 100µg/ml	3					52,3567		
TREBOL 100µg/ml	3						61,0300	
ALOPURINOL 25µg/ml	3							94,1033
Sig.		,055	,159	,280	,092	1,000	1,000	1,000

GRÁFICO: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE XANTINA OXIDASA POR LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS DIEZ ESPECIES VEGETALES



ANÁLISIS DE VARIANZA DE PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE XANTINA OXIDASA POR LOS EXTRACTOS DE *Medicago lupulina* L. (TRÉBOL) OBTENIDOS CON LOS DIFERENTES SOLVENTES

ANOVA

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE TREBOL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	13862,204	6	2310,367	2705,197	,000
Intra-grupos	11,957	14	,854		
Total	13874,161	20			

Leyenda:

gl: Grados de libertad

F: Distribución de Fisher (razón)

Sig: Significancia comparada

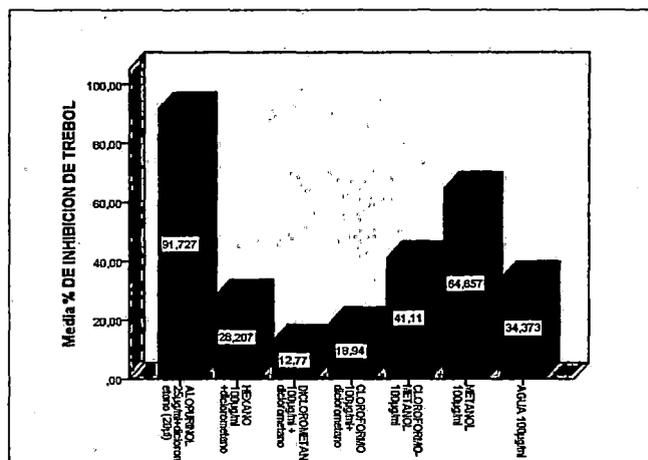
PRUEBA DE DUNCAN SOBRE EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE XANTINA OXIDASA POR LOS EXTRACTOS DE *Medicago lupulina* L. (TRÉBOL) OBTENIDOS CON LOS DIFERENTES SOLVENTES

PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE TREBOL

Duncan^a

MUESTRA	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
DICLOROMETANO 100µg/ml+ DMSO	3	12,7700						
CLOROFORMO 100µg/ml+ DMSO	3		18,9400					
HEXANO 100µg/ml +DMSO	3			28,2067				
AGUA 100µg/ml	3				34,3733			
CLOROFORMO-METANOL 100µg/ml	3					41,1100		
METANOL 100µg/ml	3						64,6567	
ALOPURINOL 25µg/ml+DMSO (20µl)	3							91,7267
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

GRÁFICO: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE XANTINA OXIDASA POR LOS EXTRACTOS DE *Medicago lupulina* L. (TRÉBOL) OBTENIDOS CON LOS DIFERENTES SOLVENTES





UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS, MATEMÁTICAS,
FARMACIA e INFORMÁTICA
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD - ÁREA DE CROMATOGRAFÍA

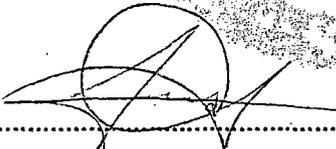
CONSTANCIA

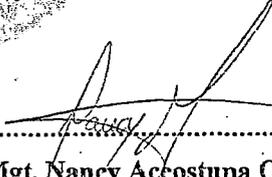
Los que suscriben, Responsables del Laboratorio de cromatografía de la Facultad De Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, dejan Constancia.

Que las Bachilleres: **ISABEL DEL PILAR GUTIERREZ GONGORA Y LUZ MARINA MAMANI HUITTOCCOLLO** de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, han presentado al Laboratorio de Cromatografía un extracto seco metanólico de la especie vegetal *Medicago lupulina* L. (trébol) para la caracterización e identificación de flavonoides. Dicho material ha sido caracterizado utilizando el Cromatógrafo líquido Agilent 1200 - acoplado a un detector de Arreglo de diodos y la identificación se basó en los picos del cromatograma en comparación con otra especie vegetal estudiada y usada como referencia.

Se expide la siguiente constancia a solicitud de las interesadas para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 20 de Agosto del 2011.


.....
Qco. Jorge Choquenaira Parí
Analista del Laboratorio de Cromatografía -
UNSAAC.


.....
Mgt. Nancy Accostupa Quispe
Analista del Laboratorio de Cromatografía -
UNSAAC.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- **APARTADO POSTAL**
N° 921 - Cusco - Perú
- **FAX:** 238156 - 238173 - 222512
- **RECTORADO**
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- **CIUDAD UNIVERSITARIA**
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- **CENTRAL TELEFÓNICA:** 232398 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- **LOCAL CENTRAL**
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- **MUSEO INKA**
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- **CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA**
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- **COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"**
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192



LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS (CUZ)

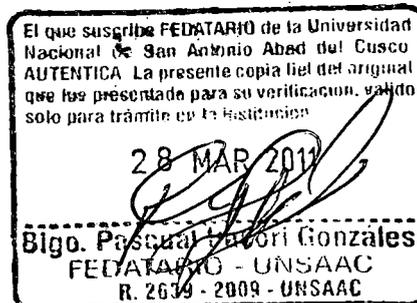
CERTIFICA

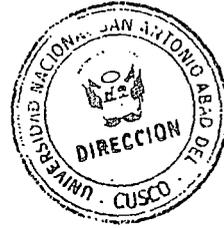
Que, las Bachilleres: **ISABEL DEL PILAR GUTIÉRREZ GÓNGORA** y **LUZ MARINA MAMANI HUITTOCCOLLO**, de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica; Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han presentado al Herbario Vargas (CUZ) muestras botánicas herborizadas para su identificación.

Dichos materiales han sido sometidos a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y en comparación con las muestras existentes en el herbario, de la que se desprenden que los materiales analizados corresponden a las siguientes especies: *Schinus molle* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Baccharis chilco* H.B.K., *Taraxacum officinale* Wiggers., *Ephedra americana* H. & B., *Ambrosia arborescens* Mill., *Urtica urens* L., *Caiophora rosulata* (Weddel.) Urban & Gilg., *Acanthoxanthium spinosum* (L.) Fourreau, *Medicago lupulina* L. Siendo la posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981)

Reino : Plantae
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Rosidae
Orden : Sapindales
Familia : Anacardiaceae
Género : *Schinus*
Especie : *Schinus molle* L.
N. vulgar : Molle

Reino : Plantae
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Lamiales
Familia : Lamiaceae
Género : *Rosmarinus*
Especie : *Rosmarinus officinalis* L.
N. vulgar : Romero



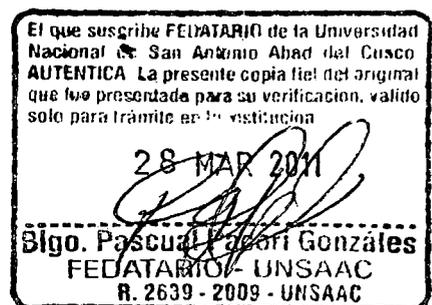


Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Ambrosia*
Especie : *Ambrosia arborescens* Mill
N. vulgar : Maraju, marcu, artemisa

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Baccharis*
Especie : *Baccharis chilco* H.B.KI
N. vulgar : Chillca

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Taraxacum*
Especie : *Taraxacum officinale* Wiggers
N. vulgar : Diente de león,

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Hamemeliadea
Orden : Urticales
Familia : Urticaceae
Género : *Urtica*
Especie : *Urtica urens* L.
N. vulgar : Ortiga, Ccoe quisa



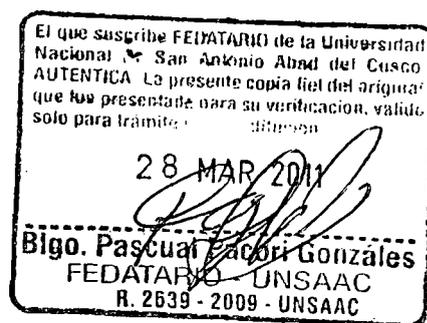


Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Acanthoxanthium*
Especie : *Acanthoxanthium spinosun* (L) Fourreau
N. vulgar : Allecco quisca

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Dilleniidae
Orden : Violales
Familia : Loasaceae
Género : *Caiophora*
Especie : *Caiophora rosulata* (Weddel.) Urban & Gilg.,
N. vulgar : Madre quisa

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Dilleniidae
Orden : Fabales
Familia : Fabaceae
Género : *Medicago*
Especie : *Medicago lupulina* L.
N. vulgar : Trébol

Reino : Vegetal
División : Gnetophyta
Clase : Gnetopsida
Orden : Ephedrales
Familia : Ephedraceae
Género : *Ephedra*
Especie : *Ephedra americana* H. & B.
N. vulgar : Pinco - pinco.

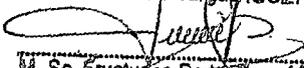


Se le expide, el presente certificado de identificación de las especies en estudio para los fines que vieran por conveniente

Cusco, 22 de Marzo de 2011



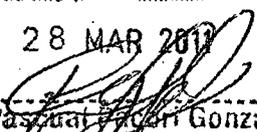
Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco
Herbario Vargas (CUZ)


M. Sc. Fructuosa De La Torre Mavonga
Directora

Arch/HV CUZ

El que suscribe FEDATARIO de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco AUTENTICA. La presente copia fiel del original que les presento para su verificación, valido solo para trámite en la institución

28 MAR 2011

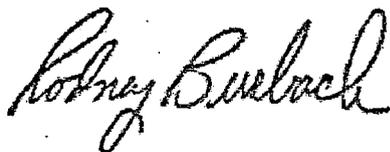

Blgo. Pascual Pachari Gonzales
FEDATARIO - UNSAAC
N. 2639 - 2009 - UNSAAC

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name Xanthine,
≥99%
Product Number X7375
Product Brand SIGMA
CAS Number 69-89-6
Molecular Formula $C_5H_4N_4O_2$
Molecular Weight 152.11

TEST	SPECIFICATION	LOT 030m0095 RESULTS
Appearance (Color)	White to Off-White	Off-White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Colorless to Yellow-Green	yellow-green
Solubility (Turbidity)	Clear to Slightly Hazy	Very Slightly Hazy
EmM	250 mg + 5.0 mL, 1 M NaOH 8.70 - 9.40 Lambda Max of 277-278 nm, 0.1 M Carbonate buffer at pH 10.0	9.17
Purity (HPLC)	≥99.0 %	99.4 %
Specification Date:		MAR 2010
Date of QC Release:		MAR 2010
Print Date:		MAR 19 2010



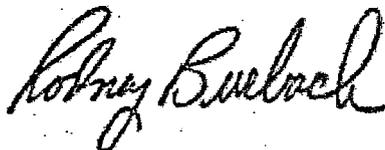
Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name Allopurinol
Product Number A8003
Product Brand SIGMA
CAS Number 315-30-0
Molecular Formula $C_5H_4N_4O$
Molecular Weight 136.11

TEST	SPECIFICATION	LOT 067k0753 RESULTS
APPEARANCE	WHITE TO OFF-WHITE POWDER CLEAR TO VERY SLIGHTLY HAZY COLORLESS TO FAINT YELLOW	OFF WHITE POWDER
SOLUBILITY	SOLUTION AT 50MG/ML IN 1M SODIUM HYDROXIDE	CLEAR VERY FAINT YELLOW
ELEMENTAL ANALYSIS	43.1 TO 45.3% CARBON 40.1 TO 42.1% NITROGEN	44.2% 41.1%
PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY	MINIMUM 99%	>99%
PRODUCT CROSS REFERENCE INFORMATION		REPLACEMENT FOR ALDRICH #H56806
QC RELEASE DATE		JULY 2007



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name Xanthine Oxidase from bovine milk,
Grade I, ammonium sulfate suspension, 0.4-1.0 units/mg protein
Product Number X1875
Product Brand SIGMA
CAS Number 9002-17-9
Storage Temp 2-8°C

TEST	SPECIFICATION	LOT 110m7015v RESULTS
Protein by Biuret	≥5.0 mg/ml	29.3 mg/ml
Enzymatic Activity	TCA precipitation 0.4 - 1.0 UN/mg One unit will convert 1.0 micromole of xanthine to uric acid per minute at pH 7.5 at 25 deg C.	0.8 UN/mg
Miscellaneous Supplier Data	≤0.5 One unit will convert 1.0 micromole of uric acid to allantoin per minute at pH 8.5 at 25 deg C.	0.0

Recommended Retest Period

1 Year

Specification Date:

DEC 2010

Date of QC Release:

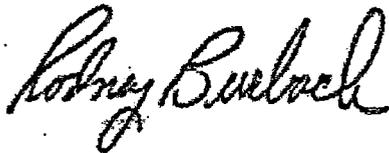
DEC 2010

Recommended Retest Date:

DEC 2011

Print Date:

DEC 10 2010



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA