

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Efecto hipotensor del extracto acuoso de *Calceolaria
myriophylla kraenz* en ratas hipertensas inducidas por
L-NAME**

TESIS

para optar al grado académico de Magíster en Farmacología con Mención
en Farmacología Experimental

AUTOR

Yovani Martin Condorhuamán Figueroa

Lima-Perú

2009

INDICE

Resumen

Summary

I.	Introducción	1
II.	Generalidades o Marco Teórico	3
III.	Material y Métodos	12
IV.	Resultados	20
V.	Discusión	40
VI.	Conclusiones	47
VII.	Referencias Bibliográficas	48
VIII.	Anexo	54

RESUMEN

El objetivo de este estudio experimental ha sido evaluar el posible efecto hipotensor, diurético y tóxico del extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla).

Material y Métodos: se utilizó ratas albinas machos de raza Holtzmann para la determinación de los efectos, a quienes después de una semana de adaptación se les midió la presión arterial basal sistólica, diastólica y media. Para la determinación del efecto hipotensor se realizó la inducción con la administración de N-Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) a dosis de 40 mg/kg/día por vía oral durante 05 días y nuevamente se les midió la presión arterial postinducción, se dividió en 06 grupos de 08 animales; grupo control positivo (L-NAME) y control negativo (agua destilada), grupos experimentales a dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg y enalapril a dosis de 25 mg/kg. El tratamiento fue durante 30 días midiéndose la presión arterial cada 5 días. El efecto diurético se evaluó utilizando ratas normotensas distribuidas en 05 grupos de 09 animales; grupo control (agua destilada), grupos a dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg y furosemida a dosis de 10 mg/kg. La evaluación de la actividad antioxidante se realizó a los grupos determinados en el efecto hipotensor. El estudio del efecto tóxico se determinó en el ensayo a dosis repetidas por 60 días a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico en ratas normotensas distribuidas en 03 grupos de 06 animales; utilizando dosis de 100 mg/kg, 200 mg/kg y un grupo control (agua destilada). **Resultados:** El extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz presentó efecto hipotensor y diurético a las dosis indicadas por vía oral. El extracto acuoso elevó los niveles séricos de óxido nítrico y disminuyó los niveles séricos de malondialdehído. No presentó efecto tóxico en el ensayo a dosis repetidas por 60 días. **Conclusiones:** Se demostró que el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz presenta efecto hipotensor, diurético y antioxidante sin efectos tóxicos.

Palabras clave: *Calceolaria myriophylla*, hipotensor, diurético y antioxidante.

SUMMARY

The objective of this experimental study has been to evaluate the possible hypotensive, diuretic and toxic effect of aqueous extract of *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla).

Material and Methods: used albino rats male Holtzmann race for the determination of the effects, after one week of adaptation was measured basal systolic, diastolic and mean pressure. For the determination of the hypotensive effect the induction was realised with the administration of N-nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) to doses of 40 mg/kg/día by oral route during 05 days and again the arterial pressure was measured postinduction, was divided in 06 groups of 08 animal; group positive control (L-NAME) and negative control (distilled water), experimental groups to 50 doses of mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg and enalapril to 25 doses of mg/kg. The treatment was during 30 days being measured the arterial pressure every 5 days. The diuretic effect was evaluated using rats normotensas distributed in 05 groups of 09 animals; group control (distilled water), groups to 50 doses of mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg and furosemda to 10 doses of mg/kg. The evaluation of the antioxidant activity was realised to the groups determined in the hypotensor effect. The study of the toxic effect was determined in the test to doses repeated by 60 days at hematological, biochemical and anatomopatológico level in normotensas rats distributed in 03 groups of 06 animal; using 100 doses of mg/kg, 200 mg/kg and a group control (distilled water). **Results:** The aqueous extract of *Calceolaria myriophylla* Kraenz induced hypotensive and diuretic effects to the doses indicated by oral route. The aqueous extract increased the serum levels nitric oxide and decreased serum levels of malondialdehido. No toxic effect in the test to doses repeated by 60 days. **Conclusions:** These results suggest that oral administration of aqueous extract of *Calceolaria myriophylla* Kraenz exhibited hypotensive, diuretic, antioxidant actions without toxic effects.

Keywords: *Calceolaria myriophylla*, hypotensive, diuretic and antioxidant.

I. INTRODUCCION

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular y causa directa de gran parte de la mortalidad y de la morbilidad en los países desarrollados. La HTA está implicada en la enfermedad isquémica cardíaca (directamente, e indirectamente por las alteraciones hipertróficas del músculo cardíaco), en la insuficiencia cardíaca, en la enfermedad vascular cerebral, en las nefropatías y en un sinnúmero de alteraciones orgánicas y funcionales originadas por las lesiones microvasculares que provoca.⁽¹⁾

La hipertensión arterial es una enfermedad que afecta la salud de las personas en todas partes del mundo y, por lo tanto, quizás una de las más costosas para el individuo, la familia y el país.⁽²⁾ Por lo tanto el tratamiento hipotensor constituye la prevención de complicaciones cardiovasculares, cerebrovasculares y daño renal. El tratamiento debe incluir el control de los factores de riesgo y de enfermedades asociadas que generen mayor riesgo.⁽³⁾ En la actualidad existe una diversidad de esquemas de tratamiento pero la mayor parte presentan efectos(s) secundario(s) y los costes del tratamiento determinan que el paciente generalmente no continúe con su terapia.⁽⁴⁾

A nivel mundial se investigan y reportan numerosos estudios de plantas medicinales con actividad farmacológica⁽⁵⁾, como a la especie vegetal *Calceolaria myriophylla* Kraenz utilizada en la medicina tradicional de la Región Cusco a la que atribuyen propiedades “curativas” en diversas enfermedades como reumatismo⁽⁶⁾, regulador menstrual⁽⁶⁾, infecciones⁽⁶⁾, úlceras gástricas^(6,7), dolores estomacales^(6,7) y enfermedades renales^(6,7). La presente investigación farmacológica tiene el interés de validar sus efectos hipotensor y diurético para su posible uso como terapia alternativa al tratamiento de la hipertensión arterial, así mismo evaluar sus posibles efectos tóxicos durante la administración por vía oral en forma continua, debido a que en la actualidad no se reportan estudios farmacológicos ni toxicológicos de la mencionada especie vegetal.

Por lo expuesto, para la presente investigación farmacológica, se plantearon los siguientes objetivos: 1) Determinar el efecto hipotensor del extracto acuoso administrado por vía oral de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratas albinas

hipertensas inducidas por L-NAME; 2) Determinar los constituyentes químicos del extracto acuoso en el análisis fitoquímico cualitativo; 3) Determinar el efecto diurético del extracto acuoso administrado por vía oral de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratas albinas normotensas; 4) Determinar los niveles de óxido nítrico y malondialdehído en ratas con hipertensión inducida por L-NAME; 5) Evaluar los efectos tóxicos del extracto acuoso por vía oral en el ensayo a dosis repetidas por 60 días en ratas normotensas.

II. GENERALIDADES

2.1 FISIOLÓGÍA DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La presión sanguínea es el producto del gasto cardiaco y la resistencia vascular periférica que ejerce la sangre sobre las paredes de los vasos sanguíneos cuando es impulsada por el corazón ⁽⁸⁾. El mantenimiento de la presión arterial normal se debe a un sistema de control complejo y multifactorial, que involucra en forma integrada, al sistema nervioso central y periférico autónomo, al corazón, al riñón, a la glándula suprarrenal y al propio vaso sanguíneo entre otros de tal manera que las anomalías de la presión arterial ocurren por una alteración funcional de la integración de múltiples vías ⁽⁹⁾.

2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La Hipertensión Arterial (HTA) es uno de los factores de riesgo modificable de mayor prevalencia en el mundo ⁽¹⁰⁾ y es una causa común de visita a los consultorios médicos. En Estados Unidos se estima que un cuarto de su población presenta hipertensión arterial (60 millones). ⁽¹¹⁾ En España entre el 20 y el 25% de los adultos de más de 18 años presentan cifras de presión arterial superiores a 140/90 mmHg ⁽¹²⁾ y entre 60% y 70% de las personas en la séptima década de la vida ⁽¹³⁾. En nuestro medio la Sociedad Peruana de Cardiología (2005), revela la prevalencia de 27,3% en la costa, 22,1% en la sierra alta y 22,7% en la selva ⁽¹⁴⁾. Es importante tener presente que cuando la HTA es diagnosticada entre los 30 a 50 años la presentación más común es el aumento de la presión arterial diastólica con una presión arterial sistólica normal o un aumento de ambas presiones. Después de los 60 años, se presenta con mayor frecuencia la hipertensión sistólica aislada (presiones >140/90 mmHg) ⁽¹⁵⁾. Antes de los 50 años, la prevalencia de la hipertensión es menor en mujeres que en varones, después de la menopausia la prevalencia de hipertensión incrementa rápidamente en mujeres. Así mismo la raza es un factor de prevalencia de la enfermedad, en Estados Unidos uno de cada tres Afroamericanos presenta hipertensión comparado con uno de cada cuatro o cinco personas de raza blanca americana o mexicano-americano. Sin embargo en Europa la prevalencia es mayor en la población de raza blanca de muchos países europeos (Finlandia, Alemania y España) que en los afroamericanos ⁽¹¹⁾.

2.3 ETIOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La HTA es una enfermedad muy prevalente donde un 90% de su etiología es desconocida denominándose hipertensión arterial esencial y en un 5 a 10% esta la denominada hipertensión secundaria que se debe a causas conocidas ⁽¹⁶⁾. La hipertensión es de origen multifactorial, la resistencia vascular periférica aumentada es el mecanismo patogénico fundamental de la HTA esencial, esta claro que en la hipertensión hay cambios vasculares y estas alteraciones aseguran que no haya una hiperperfusión tisular aunque, al mismo tiempo, contribuyen a la elevación de la presión arterial ⁽¹⁷⁾. El hallazgo tiende a aparecer con carácter familiar más que individual y es representativo de una colección de enfermedades o síndromes, basados genéticamente en anormalidades dependientes de una interacción ambiente genotipo, y en consecuencia con diferentes severidades y tiempos de aparición ⁽¹⁸⁾.

2.4 FISIOPATOLOGÍA DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Muchos mecanismos fisiológicos están implicados en el mantenimiento de la presión arterial y su alteración juega un rol muy importante en el desarrollo de la hipertensión esencial. Existe un gran número de factores que han sido muy estudiados como la relación del aumento de la presión arterial por la ingesta de sal, obesidad, resistencia a la insulina; alteración del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) y el Sistema Nervioso Simpático (SNS) ⁽¹⁹⁾. El nuevo concepto de que las anormalidades funcionales y estructurales, incluyendo la disfunción endotelial, el incremento del estrés oxidativo, la deficiencia de vasodilatadores, tales como la Prostaciclina, el Óxido Nítrico (NO); la remodelación vascular y la reducción de la complacencia, pueden anteceder a la hipertensión y contribuir a su patogénesis que ha ganado soporte en los últimos años y parece evidente que la hipertensión arterial sería tal vez ‘la campana de alarma del síndrome’ ⁽¹⁸⁾. Existe un pequeño número de pacientes (entre 2% a 5%) que tiene una enfermedad renal o suprarrenal como causa del aumento de la presión arterial ⁽¹²⁾, es así que existe una frase que indica que “la hipertensión va con el riñón” ⁽²⁰⁾.

Ingesta de sal, obesidad y resistencia a la insulina: La ingesta excesiva de sodio produce aumento del volumen sanguíneo por retención renal de sodio y agua, que como consecuencia incrementa la precarga y produce la elevación de la presión arterial ⁽²¹⁾. En la obesidad el mecanismo de producción de la hipertensión es complejo e involucra a múltiples sistemas, como incremento del SRAA, aumento del SNS y resistencia a la

insulina. En suma la obesidad esta asociada con un incremento de la reabsorción de sodio y expansión del volumen plasmático ⁽²²⁾. La insulina favorece la retención renal de sodio por tanto aumento del volumen intravascular, incrementa la actividad del SNS aumentando las resistencias periféricas y el gasto cardíaco ⁽²¹⁾.

Reactividad vascular y estrés: El estrés intermitente se puede traducir en hipertensión sostenida. La adrenalina secretada en la médula suprarrenal induce cambios mucho más importantes estimula los nervios simpáticos y además actúa sobre el receptor beta 2 presináptico, para facilitar la liberación de más noradrenalina (NA). Además puede haber una alteración en la recaptación neuronal de NA en individuos con hipertensión esencial que dejaría expuestas las células vulnerables a niveles más elevados de NA ⁽²¹⁾.

Remodelamiento vascular y endurecimiento arterial: La remodelación vascular es un proceso de cambios estructurales que involucra alteraciones en el proceso celular incluyendo crecimiento, apoptosis, migración, inflamación y producción de matriz extracelular, resultando en un incremento del tono arteriolar, engrosamiento de la intima e hiperplasia de la media ⁽²³⁾. Fisiológicamente la remodelación es un cambio de respuesta adaptativa que ocurre en respuesta a cambios hemodinámicos y envejecimiento. Estos cambios estructurales pueden incrementar la reactividad vascular, con un aumento de la resistencia vascular periférica que es característico de la hipertensión ⁽²⁴⁾.

Angiotensina II y estrés oxidativo: El rol de la Angiotensina II y el mecanismo de estrés en la generación de especies reactivas de oxígeno se inicia en las paredes de los vasos sanguíneos en pacientes con hipertensión; para el inicio de este mecanismo la NADPH oxidasa es activada por varios estímulos fisiopatológicos, incluyendo a la Angiotensina II y la hipertensión para producir radicales de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno, conduciendo así a la formación de peroxinitros y otros oxidantes; que puede conducir a la destrucción del óxido nítrico a nivel de células endoteliales y del músculo liso vascular por causa de una oxidación del cofactor tetrahydrobiopterina. Las consecuencias del estrés oxidativo incluye disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio, respuesta inflamatoria y perpetuación de la hipertensión arterial. Últimamente estos procesos que se activa en la hipertensión, confieren una predisposición a la aterosclerosis ⁽²⁵⁾.

Endotelina: La endotelina (ET) es el vasoconstrictor endógeno más potente conocido a la fecha y posee acción fisiológica prolongada. Existe una familia de tres isopéptidos similares de endotelina-1 (ET-1, -2 y -3), cada uno codificado por genes distintos en los

cromosomas 6, 1 y 20, respectivamente. La ET-1 es producida en las células endoteliales y en las células musculares lisas vasculares. La ET-2 es producida predominantemente en el riñón y en el intestino. La secreción de ET-1 ocurre en minutos luego de la exposición a estímulos inductores tales como catecolaminas, angiotensina II, glucocorticoides, citoquinas, radicales libres e hipoxia. Las células vasculares pueden así, rápidamente, ajustar la producción de ET para regular el tono vascular⁽²⁷⁾. Los niveles elevados de ET parecen elevar la presión arterial, como ocurre en pacientes que presentan tumores secretores de endotelina.⁽²¹⁾

Óxido nítrico: Es un radical libre gaseoso con múltiples acciones biológicas; entre las mejores definidas se encuentran la regulación del tono vascular, la regulación de la neurotransmisión y la participación en la inmunidad no específica⁽⁹⁾. El óxido nítrico es un radical libre fisiológico producido por el endotelio vascular como un factor de relajación, tiene efectos citoprotectores, es débilmente reactivo, pero bajo ciertas circunstancias genera productos tóxicos fuertemente oxidantes como el peroxinitrito⁽²⁷⁾. El ON es enzimáticamente sintetizado a partir de la L-arginina, un proceso que puede ser inhibido por componentes análogos de la L-arginina como la N-Nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) quien compite por la ON Sintasa (ONS). La inhibición de la ONS disminuye la producción de ON ocasionando vasoconstricción, aumento de la liberación de renina e hipertensión arterial⁽²⁸⁾.

Radicales libres: Los radicales libres son compuestos de existencia independiente que contienen uno o más electrones impares. Estos radicales libres son extremadamente reactivos, es decir, fuertemente oxidantes que pueden causar daño oxidativo a macromoléculas biológicas, producir daño a la membrana celular y lipoproteínas por un proceso denominado peroxidación lipídica que produce la formación de ciertos productos de degradación tales como aldehídos, entre los cuales está el malondialdehído, que constituye un marcador de la oxidación lipídica⁽²⁷⁾.

2.5 TRATAMIENTO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

Las normas para la clasificación clínica de la hipertensión arterial publicadas recientemente y casi conjuntamente por el NIH americano (Joint National Committee VII) y las Sociedades Europeas de Hipertensión Arterial y Cardiología (SEH-C) coinciden en considerar como hipertensión arterial al promedio de dos o tres mediciones consecutivas iguales o superiores a 140/90 mmHg, en posición sentada. La presión normal es

definida por el JNC VII como inferior a 120/80 mmHg, siendo considerados los valores intermedios como estadio prehipertensivo ⁽²⁹⁾.

El objetivo primordial del tratamiento del paciente hipertenso debe ser lograr la máxima reducción en el riesgo global de morbilidad y mortalidad cardiovasculares, según indica el Protocolo de Tratamiento de la Hipertensión de la OMS-Sociedad Internacional de Hipertensión ⁽⁴⁾. El mejor cumplimiento con medicamentos antihipertensivos lleva a un menor riesgo de hospitalización, y está demostrado en diversos estudios que los pacientes con un alto cumplimiento tienen mayor probabilidad de lograr la presión arterial objetivo. Además, los principales efectos benéficos del tratamiento antihipertensivo se deben a la reducción de la presión arterial en sí y son independientes de los fármacos utilizados ⁽²⁹⁾.

Todos los pacientes, bien sean prehipertensos o hipertensos (VII JNC), deben adoptar modificaciones de estilo de vida: suspender el tabaquismo, disminuir de peso, mantener un Índice de Masa Corporal (IMC) entre 18,5 y 24,9; seguir la dieta DASH rica en potasio, calcio, frutas, vegetales, baja en sodio y con bajo porcentaje de grasas saturadas; reducir la ingestión de sal a 6 g por día, realizar actividad física regular aeróbica como caminar 30 minutos al día la mayoría de los días de la semana y, por último, disminuir la ingestión de alcohol a máximo 30 mL de etanol (24 onzas de cerveza, 10 onzas de vino o 3 onzas de whisky). Estas modificaciones en el estilo de vida aumentan la eficacia del tratamiento hipotensor y disminuyen el riesgo cardiovascular. El manejo farmacológico se inicia en los estadios 1 y 2 de HTA según se describe a continuación: en el estadio 1 se recomienda iniciar con diuréticos tiazídicos ⁽³⁰⁾, los diuréticos aumentan la eficacia antihipertensiva de múltiples regímenes, que pueden ser usados para conseguir el control de presión arterial, y son más asequibles que otros agentes terapéuticos ⁽³⁰⁾ y si no hay control adecuado, adicionar Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA), Antagonistas de los Receptores de Angiotensina II (ARA II), Beta Bloqueadores (BB) o Calcio Antagonistas (CA), según criterio del médico tratante. En el estadio 2 se debe utilizar la combinación de dos o más medicamentos antihipertensivos para la mayoría de los pacientes, usualmente tiazidas e IECA, ARA II, BB o CA ^(3, 30). El antihipertensivo ideal debe: tener un buen perfil hemodinámico, evitar el daño del órgano blanco, tener pocos efectos adversos, ser eficaz en monoterapia, tener índice pico-valle mayor de 0.5, permitir buena adherencia al tratamiento, bajo costo e idealmente duración mayor de 24

horas, que mantenga al paciente protegido si olvida tomar una dosis ^(3,30). En un estudio realizado en un hospital nacional se reportó que la monoterapia era utilizada en 55%; dos fármacos, en 38% y tres o más fármacos, en 7%. El fármaco más prescrito en monoterapia fue enalapril (62%); la combinación de dos fármacos más frecuente fue IECA con calcio antagonistas (32%) seguido de IECA con diurético tiazidico (18%); y en tres o más fármacos la combinación más frecuente fue IECA con Calcio Antagonista y diurético tiazidico. Una reciente publicación nacional pone de manifiesto que 45% de los pacientes que reciben fármacos antihipertensivos se encuentran compensados y que el fármaco más utilizado es el enalapril (82%) seguido de calcio antagonista (12%) ⁽⁴⁾. Los hipertensos que presentan ciertas patologías asociadas requieren de tratamiento especial que además de controlar la HTA, disminuya el riesgo cardiovascular, cerebrovascular y detenga la aparición o progresión de la enfermedad renal crónica, entre otras. El VII JNC hace algunas recomendaciones mandatorias o imperativas con base en estudios realizados en los últimos años, con fármacos específicos según la enfermedad asociada ⁽³⁾.

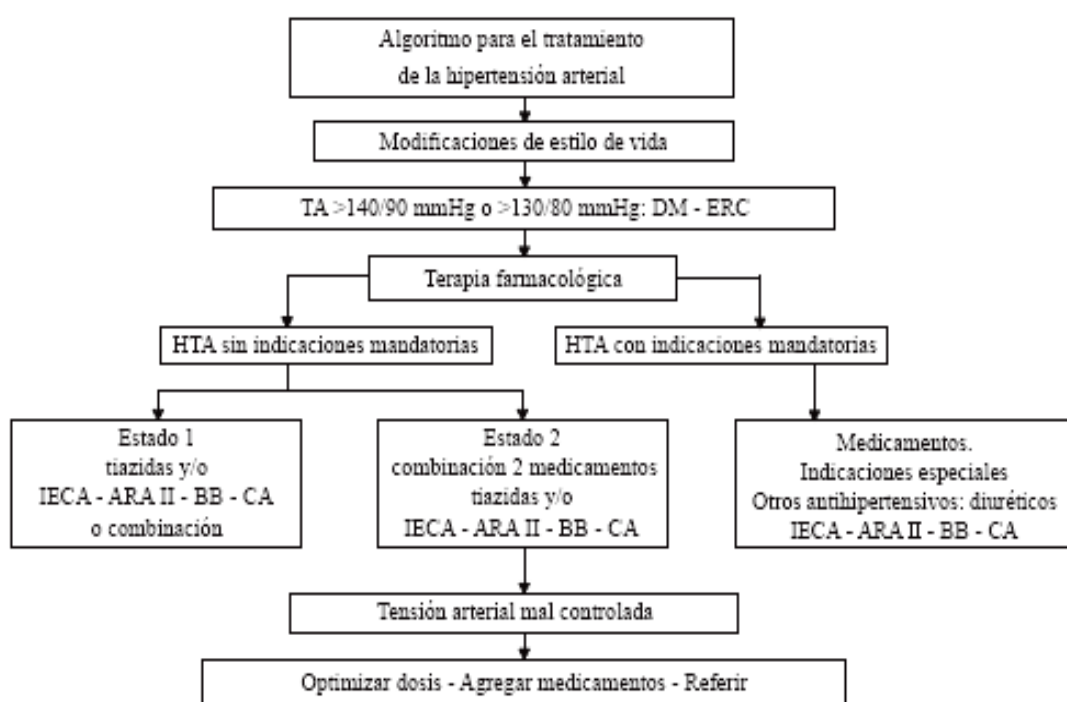


Figura 1. Algoritmo para el tratamiento de la hipertensión arterial modificado del VII JNC. DM: Diabetes Mellitus, ERC: Enfermedad Renal Crónica

Tomado de García P, Urrego J, D'Achiardi R, Delgado V. Hipertensión arterial: diagnóstico y manejo. 2004 ⁽³⁾.

2.6 ASPECTOS BOTANICOS Y ETNOBOTANICOS DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz.

La *Calceolaria myriophylla* Kraenz es una hierba anual de 20 a 30 cm. de altura, cuyas flores amarillas son parecidas a los zapatos, de ahí su nombre; de hojas pequeñas. Se encuentra en laderas y cercos de piedra hasta los 4000 m.s.n.m. ⁽⁶⁾. Las flores tiene corola bilabiada, cuya parte inferior está hinchada y tiene forma de zapato, la inflorescencia 3 – 10 flores, las ramas son blancas, las hojas son pequeñas, elípticas a ovaladas ⁽⁷⁾.

De acuerdo al sistema de clasificación de Judd, Campbel, Kellogg y Stevens (1999), la especie en estudio pertenece a la siguiente clasificación taxonómica.

División	: Magnoliphyta (=Angiospermas)
Clase	: Magnoliopsida (=Dicotiledoneas)
Subclase	: Asteridae
Orden	: Labiales
Familia	: Scrophulariaceae
Genero	: Calceolaria
Especies	: <i>Calceolaria myriophylla</i> Kraenz
Nombre común:	“Zapatilla”, “Ayac Zapatilla”.



Figura 2. *Calceolaria myriophylla* Kraenz: “Zapatilla”, “Ayac Zapatilla”.

Alrededor de 200 géneros pertenecen a la familia Scrofulariaceae y alrededor de 4900 especies están distribuidas a nivel mundial, especialmente en las regiones de temperatura templada. Sólo la tercera parte de este género estudiados químicamente presentan iridoides, fenilpropanoides, saponinas, heterósidos cardiotónicos, flavonoides, alcaloides y terpenos han sido aislados. Muchos de estos compuestos tienen actividades biológicas interesantes ⁽³¹⁾.

La familia Scrofulariaceae es reconocida en el Perú por presentar dos géneros y 121 especies, principalmente arbustos y hierbas. Los taxones endémicos se encuentran principalmente en las regiones mesoandina, puna húmeda y seca y páramo, entre los 300 y 4500 m de altitud. La *Calceolaria myriophylla* Kraenz se conoce en más de 10 localidades en el centro-sur del país, es localmente común y podría estar representada en los Santuarios Machu Picchu y Ampay ⁽³²⁾.

Dentro de los antecedentes reportados se mencionan estudios realizados con *Calceolaria myriophylla* Kraenz y otras especies del género *Calceolaria*: Se evaluó la actividad insecticida de dos naftoquinonas extraído de la *Calceolaria andina* en donde se concluye que son altamente efectivos para las especies de Homóptera y Acari. Además demostraron la baja toxicidad oral y dérmica en mamíferos ⁽³³⁾. Se reporto la presencia de flavonoides comunes en algunas especies de la familia Scrophulariaceae como son la luteolina, crysoeriol y apigenina 7-glucosido ⁽³⁴⁾. Se describe que esta planta es muy buscada por sus flores muy amarillas, color canario, tienen la forma de zapato. Es una de las plantas más útiles en la medicina casera. Con el cocimiento de unas cuantas ramitas y flores, una cucharada de garbanzo tostado y molido, una regular porción de cola de caballo y otra de estigmas de maíz, se obtiene la curación de todas las enfermedades de las vías urinarias ⁽³⁵⁾. Sus hojas y flores son utilizadas como antivenéreo, descensos vaginales, diurético, afecciones uterinas y manchas de rostro ⁽³⁶⁾. Roersch concluye que todas las especies de *Calceolaria* existentes en la zona sur andina del Perú tiene una preferencia clara en afecciones renales, uterinas, vaginales y post parto ⁽⁷⁾. Reportes etnobotánicos describen el uso como anticonceptivo, colerina, tos, dolor de estomago, para los riñones, post parto y úlceras gástricas ⁽⁶⁾. En el Distrito de Colquepata – Paucartambo se reporta su uso contra las afecciones renales reposando los tallos, hojas y flores; igualmente es utilizado contra las úlceras gástricas y dolor de estomago ⁽³⁷⁾. Lastra K, demostró el efecto gastroprotector sobre lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratas al utilizar el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria myriophylla*. También determinó la presencia de constituyentes químicos

como azúcares reductores, heterósidos, flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, saponinas y cumarinas⁽³⁸⁾ y también se ha demostrado que el extracto acuoso de *Calceolaria tripartita* mejora la función hepática en ratas con inducción de hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono al reducir los niveles de TGO y TGP en condiciones experimentales⁽³⁹⁾.

Finalmente existen múltiples reportes etnobotánicos de las propiedades terapéuticas de *Calceolaria myriophylla* Kraenz, entre las que destacan el tratamiento de afecciones renales y vías urinarias, así como reumatismos, regulaciones menstruales, infecciones, úlceras gástricas y dolores estomacales; sin embargo no existen estudios científicos que validen estas aplicaciones terapéuticas. (6, 7, 35 - 38, 40 - 45)

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Material Botánico

Se empleó muestra seca pulverizada de la planta entera sin raíz de *Calceolaria myriophylla* Kraenz.

Animales de experimentación

Se utilizó ratas albinas machos de raza Holtzmann de 2 meses de edad con peso que fluctuó entre 180 a 200 gramos, obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Salud ubicado en el Distrito de Chorrillos de la Ciudad de Lima.

3.1.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

MATERIALES DE LABORATORIO

- Vaso de precipitado
- Tubo de ensayo
- Matraz aforado
- Bagueta
- Pipeta Pasteur
- Embudo de vidrio
- Frasco de color ámbar
- Placas petri
- Sonda orogástrica
- Cepo para ratas
- Gradilla
- Goteros
- Jaula para diuresis

EQUIPOS DE LABORATORIO

- Molino de cuchilla (Willey Hill St. Modell 3)
- Estufa de aire circulante (Memmert PO VL 40 – 220 °C)
- Balanza analítica con sensibilidad de 0,1g (Mettler)
- Medidor de presión incruenta (LETICA Model 5002 - PANLAB)

- Estufa con termostato adaptado (Mettler)
- Espectrofotómetro (Spectronic. Genesys Z)
- Centrífuga (International Portable Refrigerated. Model PR – 2)
- Cocina eléctrica General Electric

FÁRMACOS Y REACTIVOS

- | | |
|--|--------------------------------------|
| • Agua destilada | • Acido tiobarbitúrico (Merck) |
| • L-NAME (Sigma) | • Acido clorhídrico (Merck) |
| • Furosemida (Lasix – Aventis Pharma) | • Hidróxido de sodio (Merck) |
| • Enalapril (Lotrial - Roemmers) | • Acido sulfanílico (Merck) |
| • Cloruro de sodio (Merck) | • N-1-Naftiletildiamina 0,1% (Sigma) |
| • Fosfato monosódico H_2NaPO_4 (Merck) | • Reactivo de Mayer |
| • Fosfato disódico HNa_2PO_4 (Merck) | • Reactivo de Lieberman-Burchard |
| • Acido tricloroacético (Merck) | • Ninhidrina 1% |
| | • Reactivo de Fehling A,B |

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 RECOLECCIÓN, TAXONOMÍA, PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO.

La planta en estudio fue recolectada en el Distrito de Q'orao (3500 m.s.n.m.), Provincia del Cusco, Departamento del Cusco, Perú, en el mes de Marzo del año 2007. Se recolectó la planta entera en su estado silvestre (hojas, tallos y flores) sin raíz. La identificación taxonómica de la planta fue realizada en el Herbario Vargas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

La planta entera recolectada se sometió a secado natural en un área sombreada, ventilada y temperatura ambiente en tendales de papel bond que se fue cambiando constantemente. Se seleccionó la muestra seca y se realizó la molienda en un molino eléctrico hasta obtener una pulverización uniformizada, teniendo cuidado del sobrecalentamiento del molino para evitar la descomposición de algunos constituyentes químicos. Finalmente se procedió al pesado de la muestra obtenida.

Para la preparación del extracto acuoso se utilizó la muestra seca pulverizada en una proporción del 20% (P/V) ⁽⁴⁶⁾ para lo cual se procedió a la infusión de dicha muestra tal como es usada tradicionalmente. El solvente de la infusión se evaporó a una temperatura constante de 40 °C hasta obtener un residuo de peso constante, el extracto acuoso seco fue conservado a una temperatura de 4 a 8 °C en un frasco ámbar herméticamente cerrado ⁽⁴⁷⁾.

El análisis fitoquímico cualitativo se realizó mediante pruebas fisicoquímicas de caracterización según Lock de Ugaz ⁽⁴⁸⁾, mediante cambios de coloración o formación de precipitados (tabla 1). Este análisis se realizó en el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

Tabla 1. Ensayos del análisis fitoquímico cualitativo

REACTIVOS	METABOLITOS PRIMARIOS Y/O SECUNDARIOS
Tricloruro de aluminio	Flavonoides
Magnesio + HCl (Shinoda)	Flavonoides
Tricloruro férrico 1%	Compuestos Fenólicos
Benedict	Carbohidratos
Gelatina – sal 1%	Taninos
Dragendorff	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Lieberman – Burchard	Esteroides
Fehling A, B	Azúcares reductores
Ninhidrina 1%	Aminoácidos
Prueba de la espuma	Saponinas

Fuente: Elaboración propia

3.2.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOTENSOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz EN RATAS.

INDUCCIÓN DE LA HIPERTENSIÓN

La inducción de la hipertensión en las ratas se realizó por el método descrito por Sharifi⁽²⁸⁾ Ramírez⁽⁴⁹⁾ que consiste en la administración de N-nitro-L-Arginina Metil Ester (L-NAME) a dosis de 40 mg/kg/día por vía oral. Este periodo de inducción de la hipertensión se realizó por 5 días.

MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Para la medición de la presión arterial se utilizó el medidor de presión arterial incruenta LETICA Model 5002 - PANLAB, un instrumento con memoria basado en un microprocesador específico diseñado para realizar la medición indirecta de la presión sanguínea en animales de experimentación y que permite obtener valores de presión arterial sistólica (PS), presión arterial diastólica (PD) y presión arterial media (PAM).

Para el inicio de la medida de la presión arterial todos los animales de experimentación fueron acondicionados al ambiente de laboratorio por una semana con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura de aproximadamente 23 a 25 °C, de igual manera recibieron su alimento balanceado procedente del Instituto Nacional de Salud y agua ad libitum. La medición se realizó colocando al animal de experimentación en un cepo para ratas (previo acondicionamiento del animal en el cepo por una semana más), la temperatura del ambiente oscilaba entre 30 a 35 °C en forma constante para poder producir la dilatación de la cola del animal; se colocó el sensor que presenta el instrumento de medición de presión arterial incruenta en el tercio medio de la cola del animal y se realizó 5 mediciones y el promedio de estas fue el resultado de la medición de cada animal de experimentación. Los datos de presión sistólica, presión diastólica y presión arterial media fueron expresados en mmHg.

PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOTENSOR DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz⁽⁴⁹⁾.

Para la determinación del efecto hipotensor se empezó privando de alimentos 12 horas antes del experimento. Se utilizó 48 ratas que fueron marcados y distribuidos al azar en 06 grupos de 08 animales (tabla 2) a quienes se les midió la presión arterial antes y después de la inducción con L-NAME, iniciando la medición a una misma hora (10:00 a.m.). El tratamiento se inicio al sexto día post-inducción durante 30 días consecutivos a una misma hora, midiendo la presión arterial cada 5 días.

Tabla 2. Distribución de grupos para la determinación del efecto hipotensor

Grupo	Nº de Animales	Tratamiento	Dosis	Vía de Administración
1*	08	Agua destilada	2 ml/Kg ⁽⁵⁰⁾	Oral
2**	08	Agua destilada	2 ml/Kg ⁽⁵⁰⁾	Oral
3	08	Extracto acuoso seco	50 mg/kg	Oral
4	08	Extracto acuoso seco	100 mg/kg	Oral
5	08	Extracto acuoso seco	200 mg/kg	Oral
6	08	Enalapril	25 mg/kg ⁽⁴⁹⁾	Oral

* Grupo control sin L-NAME, ** Grupo control con L-NAME.

3.2.3 PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO DIURETICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Calceolaria myriophylla* Kraenz.

Método de Lipschitz ^(50, 51)

Para el inicio del experimento se utilizó ratas normotensas, todos los animales de experimentación fueron acondicionados al ambiente de laboratorio por una semana con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura de aproximadamente 23 a 25 °C, de igual manera recibieron alimento balanceado procedente del Instituto Nacional de Salud y agua ad libitum.

Para la determinación del efecto diurético se inició privando de agua y alimentos 18 horas antes del experimento. Se utilizó 45 ratas que fueron marcados y distribuidos al azar en 05 grupos de 09 animales (tabla 3) a quienes se tomó el volumen de excreción urinaria basal antes de la hidratación con solución fisiológica al 0.9% a razón de 25 ml/kg por vía intraperitoneal ^(51, 52). A todos los animales de experimentación se administró un mismo volumen total.

Tabla 3. Distribución de grupos para la determinación del efecto diurético

Grupo	Nº de Animales	Tratamiento	Dosis	Vía de Administración
1	09	Agua destilada	2 ml/Kg ⁽⁵⁰⁾	Oral
2	09	Extracto acuoso seco	50 mg/kg	Oral
3	09	Extracto acuoso seco	100 mg/kg	Oral
4	09	Extracto acuoso seco	200 mg/kg	Oral
5	09	Furosemida ⁽⁴⁸⁾	10 mg/kg ⁽⁵¹⁾	Oral

Se colocó a todos los grupos en sus respectivas jaulas de diuresis (03 ratas por jaula) durante un tiempo de 6 horas determinado por el ensayo piloto. Se midió el volumen de excreción urinaria por método convencional (tubo calibrado en mililitros) hora por hora hasta la culminación del ensayo experimental. Se calculó el Porcentaje de Diuresis Relativa (% DR) ⁽⁵⁰⁾ según la definición para cada grupo de trabajo con la siguiente expresión:

$$\%DR = \frac{\text{Volumen de orina excretado}}{\text{Volumen total de líquido administrado}} \times 100$$

3.2.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE ÓXIDO NÍTRICO Y DE MALONDIALDEHIDO (MDA) (Chávez et al, 2003) ⁽²⁷⁾

La determinación del óxido nítrico y de malondialdehido se realizó en el día 30 a todos los grupos de animales que se usaron para la determinación del efecto hipotensor.

DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico se determinó a través de su producto de degradación, los nitritos mediante diazotización. El suero fue homogeneizado con HCL 2N, luego centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos con ácido sulfanílico 1% para la desproteización, se agregó N-1-naftil-etilendiamina 0,1% y se incubó durante 30 minutos más. La absorbancia fue medida a 548 nm por espectrofotometría.

DETERMINACIÓN DEL MALODIALDEHIDO (MDA)

La determinación del MDA (producto final de lipoperoxidación) ⁽⁵³⁾ fue a través de la formación de derivados del ácido tiobarbitúrico. Se realizó la precipitación de las proteínas séricas con ácido tricloroacético al 20% para la liberación del MDA unido a las proteínas, se añadió el ácido tiobarbitúrico 0,67% para producir el complejo MDA-acido tiobarbitúrico y la absorbancia fue medida a 535 nm por espectrofotometría.

3.2.5 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS EN EL ENSAYO A DOSIS REPETIDAS POR 60 DÍAS.

Se utilizaron ratas normotensas; para el inicio del experimento todos los animales de experimentación fueron acondicionados al ambiente de laboratorio por una semana con un ciclo de luz - oscuridad de 12 horas a una temperatura de aproximadamente 23 a 25 °C, de igual manera recibieron alimento balanceado procedente del Instituto Nacional de Salud y agua ad libitum.

Los animales fueron marcados y pesados periódicamente hasta la culminación del ensayo experimental. Se administró las dosis determinadas en la tabla 4 a todos los grupos diariamente por 60 días. Los animales de experimentación fueron distribuidos en los siguientes grupos:

Tabla 4. Distribución de grupos para la determinación de efectos tóxicos

Grupo	Nº de Animales	Tratamiento	Dosis	Vía de Administración
1	06	Agua destilada	2 ml/Kg ⁽⁵⁰⁾	Oral
2	06	Extracto acuoso seco	100 mg/kg	Oral
3	06	Extracto acuoso seco	200 mg/kg	Oral

Concluido el ensayo de toxicidad se procedió a la obtención de sangre por punción cardiaca para la realización de los siguientes análisis:

Hematológico: Hemograma completo

Bioquímicos: glucosa, urea, creatinina, transaminasas, fosfatasa alcalina, colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos.

Luego se sacrificaron a los animales de experimentación con pentobarbital a dosis de 100mg/kg ⁽⁴⁹⁾ según Normas internacionales del cuidado de animales de experimentación. Todos los órganos fueron conservados en formol al 10% para posteriormente realizar el examen anatomopatológico de dichos órganos para determinar la presencia de cambios histológicos, en relación al grupo control.

3.2.6 ANALISIS ESTADÍSTICO

La diferencia entre los grupos tratados fue determinada mediante el análisis de varianza ANOVA, test de Student y test de Duncan en el programa estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versión 15.0 en español, siendo considerado significativo un $p < 0,05$.

En los resultados del efecto hipotensor y efecto diurético se determinó la media y el error estándar de los valores individuales obtenidos para los animales de cada grupo. Se aplicó el análisis de varianza a los valores obtenidos tras los diversos tratamientos seguidos de un test de Student y test de Duncan.

En los resultados de las concentraciones de óxido nítrico y malondialdehído se calculó la media y el error estándar. Se aplicó el análisis de varianza, seguido de un test de Student.

IV. RESULTADOS

4.1 DE LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

El porcentaje de rendimiento del extracto acuoso seco (%EES) ⁽³⁸⁾ fue de 28,8%. Este resultado fue obtenido con la siguiente expresión:

$$\%EES = \frac{\text{Peso final del extracto seco}}{\text{Peso inicial de la muestra seca}} \times 100$$

4.2 DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ACUOSO

Los resultados del análisis fitoquímico cualitativo se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados del análisis fitoquímico cualitativo del extracto acuoso

REACTIVO	METABOLITO PRIMARIO/SECUNDARIO	REACCION
Fehling A y B	Azúcares reductores	++
Ninhidrina	Aminoácidos	+
Magnesio + HCl (Shinoda)	Flavonoides	+++
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
Hidróxido de sodio 5%	Quinonas	++
Gelatina – sal	Taninos	+
Lieberman - Burchard	Triterpenoides	+
Prueba de la espuma	Saponinas	+
Naftol + acido sulfúrico	Heterósidos	++

(+++++) muy abundante cantidad, (+++) abundante cantidad, (++) regular cantidad, (+) poca cantidad ⁽⁵⁴⁾

4.3 DE LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOTENSOR DEL EXTRACTO ACUOSO

Tabla 6. Efecto hipotensor sobre la presión arterial sistólica del extracto acuoso en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tratamiento	PB	PPI	PD1	PD5	PD10	PD15	PD20	PD25
Control sin L NAME	115.43 ± 7.60	124.40 ± 2.94	117.53 ± 4.02	116.73 ± 3.29	120.30 ± 2.75	120.62 ± 2.75	126.53 ± 2.49	120.33 ± 2.16
Control con L NAME	114.75 ± 3.05	212.75 ± 18.60	192.61 ± 15.36	190.38 ± 15.16	189.75 ± 14.24	180.48 ± 12.49	178.32 ± 10.86	168.59 ± 9.69
Extracto 50 mg/kg	120.53 ± 5.49	237.50 ± 11.21	172.20 ± 3.97	190.80 ± 6.07	146.50 ± 4.10 ^(*)	127.63 ± 4.31 ^(*)	125.17 ± 3.81 ^(*)	128.02 ± 2.92 ^(*)
Extracto 100 mg/kg	114.43 ± 7.70	231.97 ± 7.12	193.23 ± 2.53 ^(**)	161.27 ± 16.19	146.57 ± 3.49 ^(*)	149.00 ± 7.49 ^(*)	131.83 ± 4.34 ^(*)	130.98 ± 2.62 ^(*)
Extracto 200 mg/kg	120.03 ± 6.39	231.90 ± 6.30	184.77 ± 4.44	150.70 ± 5.83 ^(*)	151.80 ± 5.35 ^(*)	144.53 ± 3.97 ^(*)	133.20 ± 3.52 ^(*)	133.38 ± 3.91 ^(*)
Enalapril 25 mg/kg	118.13 ± 4.65	243.50 ± 9.96	177.70 ± 6.75	122.93 ± 7.47	150.27 ± 5.98 ^(*)	135.20 ± 3.05 ^(*)	128.97 ± 2.44 ^(*)	126.55 ± 2.75 ^(*)

Los valores son expresados como media ± error estándar de 5 mediciones. PB=Presión Basal, PPI=Presión Postinducción, PD=Presión según día de tratamiento (1, 5, 10, 15, 20, 25). ^(*) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control con L-NAME (p < 0.05). ^(**) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo de 50 mg/kg y enalapril (p < 0.05)..

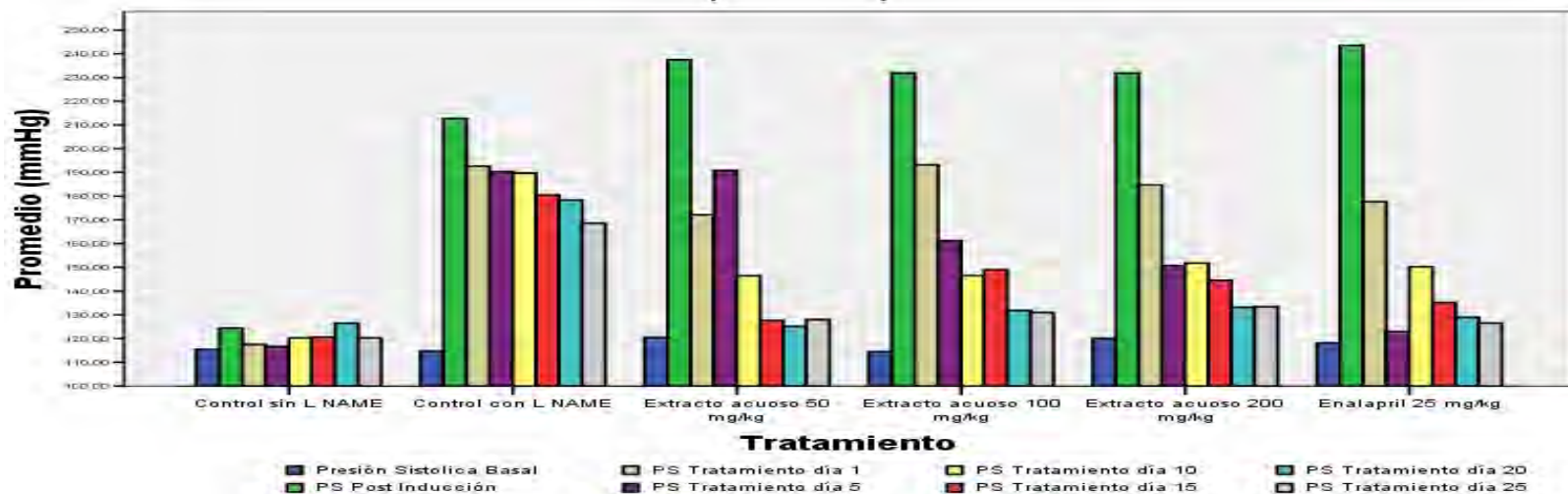


Figura 3. Efecto hipotensor sobre la presión arterial sistólica del extracto acuoso en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tabla 7. Efecto hipotensor sobre la presión arterial diastólica del extracto acuoso en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tratamiento	PB	PPI	PD1	PD5	PD10	PD15	PD20	PD25
Control sin L NAME	87.57 ± 6.52	91.20 ± 3.28	86.13 ± 2.29	85.13 ± 1.56	85.98 ± 2.47	85.91 ± 1.29	88.67 ± 1.07	86.60 ± 1.90
Control con L NAME	85.77 ± 2.93	173.97 ± 17.66	150.40 ± 15.00	149.73 ± 13.15	146.71 ± 15.06	132.72 ± 9.88	136.27 ± 10.70	137.59 ± 10.50
Extracto 50 mg/kg	88.17 ± 3.97	200.97 ± 10.08	139.23 ± 3.31	138.73 ± 9.28	104.60 ± 2.50 ^(*)	94.83 ± 5.39 ^(*)	91.77 ± 5.17 ^(*)	93.97 ± 3.31 ^(*)
Extracto 100 mg/kg	86.63 ± 6.68	194.63 ± 6.21	159.77 ± 4.47	123.63 ± 13.36	106.33 ± 7.08 ^(*)	110.57 ± 8.54 ^(*)	98.33 ± 4.43 ^(*)	92.22 ± 3.49 ^(*)
Extracto 200 mg/kg	92.97 ± 7.96	193.93 ± 7.59	139.90 ± 3.97	98.27 ± 5.84 ^(*)	106.73 ± 7.62 ^(*)	103.30 ± 2.92 ^(*)	103.17 ± 2.89 ^(*)	91.77 ± 2.37 ^(*)
Enalapril 25 mg/kg	85.87 ± 2.90	202.33 ± 11.41	132.47 ± 3.01	76.47 ± 2.33 ^(*)	105.50 ± 5.99 ^(*)	99.23 ± 5.41 ^(*)	96.57 ± 1.60 ^(*)	91.72 ± 2.87 ^(*)

Los valores son expresados como media ± error estándar de 5 mediciones. PB=Presión Basal, PPI=Presión Postinducción, PD=Presión según día de tratamiento (1, 5, 10, 15, 20, 25). ^(*) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control con L-NAME (p < 0.05).

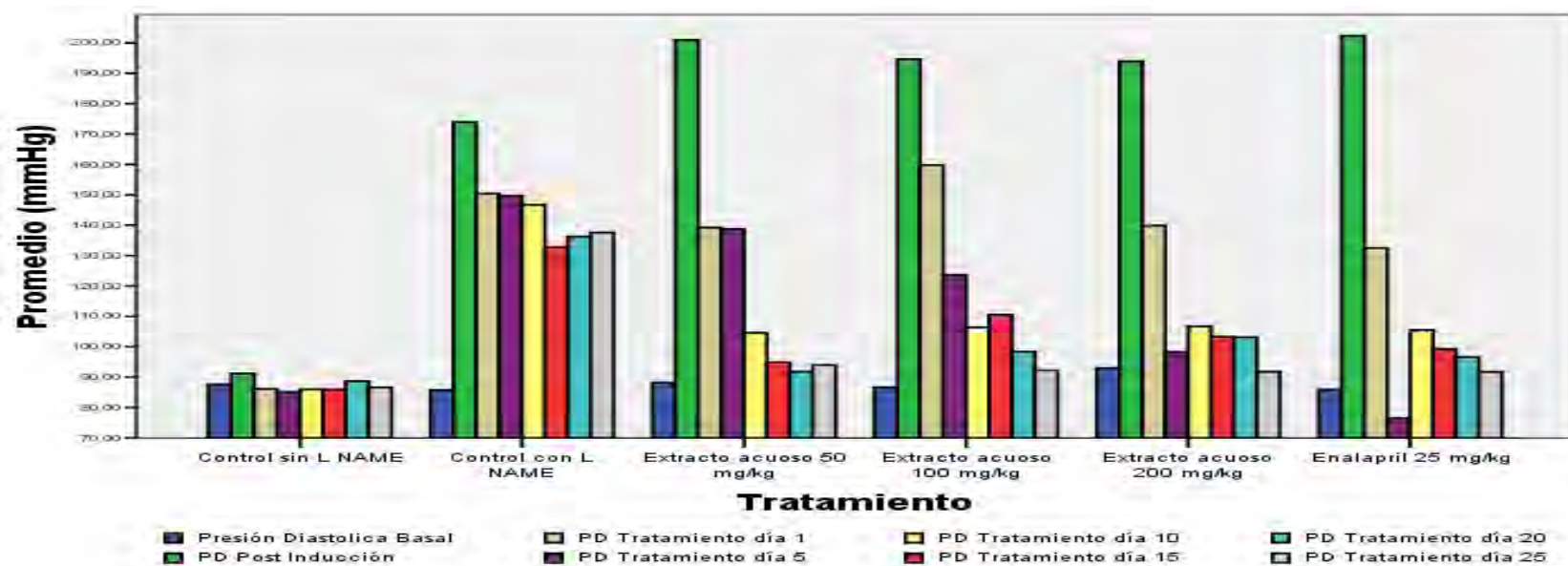


Figura 4. Efecto hipotensor sobre la presión arterial diastólica del extracto acuoso en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tabla 8. Efecto hipotensor sobre la presión arterial media del extracto acuoso en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tratamiento	PB	PPI	PD1	PD5	PD10	PD15	PD20	PD25
Control sin L NAME	96.43 ± 6.74	101.70 ± 3.05	96.43 ± 2.65	94.78 ± 2.41	96.43 ± 2.21	97.13 ± 1.50	100.87 ± 1.05	97.40 ± 1.59
Control con L NAME	95.17 ± 2.84	186.51 ± 17.95	164.10 ± 14.76	163.05 ± 13.94	162.25 ± 14.24	147.69 ± 10.78	150.10 ± 10.26	147.41 ± 10.13
Extracto 50 mg/kg	99.60 ± 4.14	212.40 ± 10.50	149.83 ± 3.26	155.77 ± 7.95	118.30 ± 2.63 ^(*)	107.03 ± 5.92 ^(*)	105.20 ± 6.05 ^(*)	105.30 ± 2.98 ^(*)
Extracto 100 mg/kg	95.57 ± 6.86	206.87 ± 6.33	170.53 ± 2.80	133.80 ± 14.34 ^(*)	118.77 ± 5.79 ^(*)	123.13 ± 8.12 ^(*)	108.63 ± 4.54 ^(*)	105.02 ± 2.78 ^(*)
Extracto 200 mg/kg	102.47 ± 7.17	206.07 ± 6.86	153.93 ± 3.33	115.57 ± 4.28 ^(*)	121.57 ± 6.76 ^(*)	116.90 ± 2.81 ^(*)	113.10 ± 3.06 ^(*)	105.55 ± 2.60 ^(*)
Enalapril 25 mg/kg	96.40 ± 3.42	215.40 ± 10.80	147.87 ± 4.30	92.10 ± 3.87 ^(*)	120.67 ± 5.68 ^(*)	108.93 ± 3.13 ^(*)	107.20 ± 1.76 ^(*)	103.37 ± 2.54 ^(*)

Los valores son expresados como media ± error estándar de 5 mediciones. PB=Presión Basal, PPI=Presión Postinducción, PD=Presión según día de tratamiento (1, 5, 10, 15, 20, 25). ^(*) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control con L-NAME (p < 0.05).

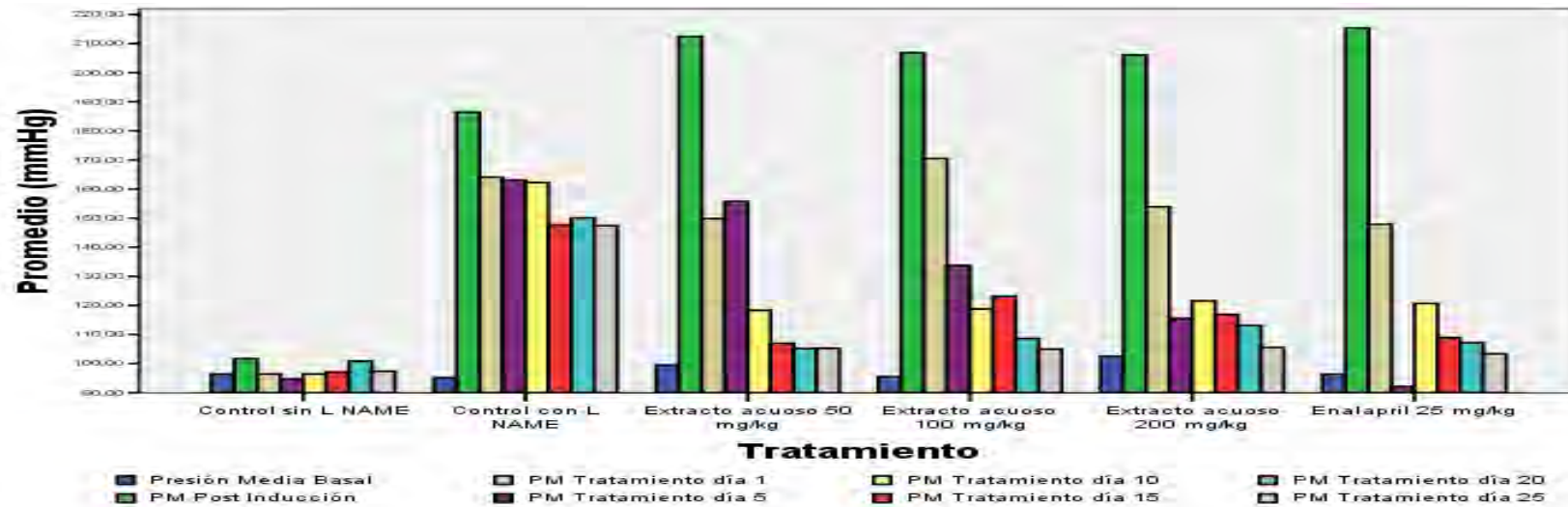


Figura 5. Efecto hipotensor sobre la presión arterial media del extracto acuoso en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tabla 9. Medias de los porcentajes de elevación de la presión arterial en ratas hipertensas antes del inicio del tratamiento (día 0)

Tratamiento	Presión arterial sistólica (%)	Presión arterial diastólica (%)	Presión arterial media (%)
Control con L NAME	98.89 ± 8.64	119.31 ± 10.16	111.33 ± 9.27
Extracto acuoso 50 mg/kg	100.14 ± 16.13	129.85 ± 14.42	115.37 ± 14.99
Extracto acuoso 100 mg/kg	95.53 ± 14.32	132.53 ± 21.36	116.53 ± 16.98
Extracto acuoso 200 mg/kg	95.05 ± 8.37	113.95 ± 14.90	104.54 ± 11.85
Enalapril 25 mg/kg	107.88 ± 11.51	136.92 ± 14.28	124.98 ± 13.18

Los porcentajes de elevación se obtuvieron con la siguiente expresión matemática:

$$\%EPA = \left[\frac{\text{Presión arterial postinducción}}{\text{Presión arterial basal}} \times 100 \right] - 100\%, \quad EPA = \text{Elevación presión arterial.}$$

Tabla 10. Medias de los porcentajes de reducción de la presión arterial en ratas hipertensas al final del tratamiento (día 30).

Tratamiento	Presión arterial sistólica (%)	Presión arterial diastólica (%)	Presión arterial media (%)
Control con L NAME	22.55 ± 1.79	21.97 ± 2.54	22.00 ± 2.12
Extracto acuoso 50 mg/kg	45.44 ± 30.7	52.66 ± 2.93	49.81 ± 2.95
Extracto acuoso 100 mg/kg	43.20 ± 2.45	52.58 ± 1.41	49.09 ± 1.60
Extracto acuoso 200 mg/kg	42.30 ± 2.14	52.29 ± 2.30	48.50 ± 20.6
Enalapril 25 mg/kg	47.47 ± 2.88	53.96 ± 2.82	51.36 ± 2.78

Los porcentajes de reducción se obtuvieron con la siguiente expresión matemática:

$$\%RPA = \frac{\text{Presión arterial día 30}}{\text{Presión arterial postinducción}} \times 100, \quad RPA = \text{Reducción presión arterial.}$$

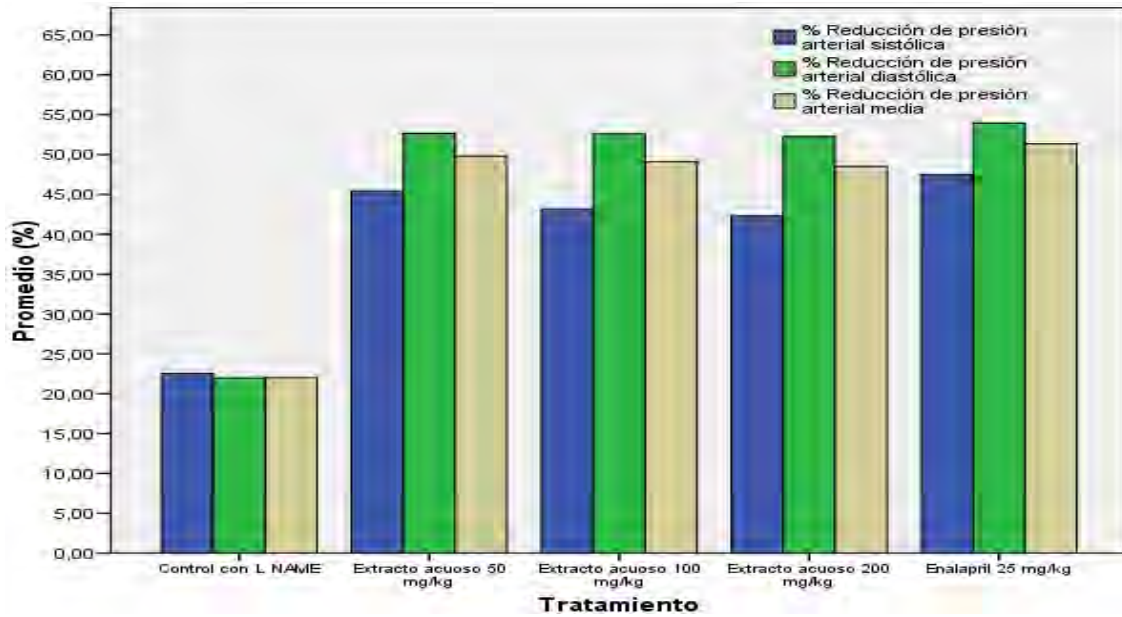


Figura 6. Nivel del porcentaje de reducción de la presión arterial en el día 30 en ratas hipertensas por L-NAME.

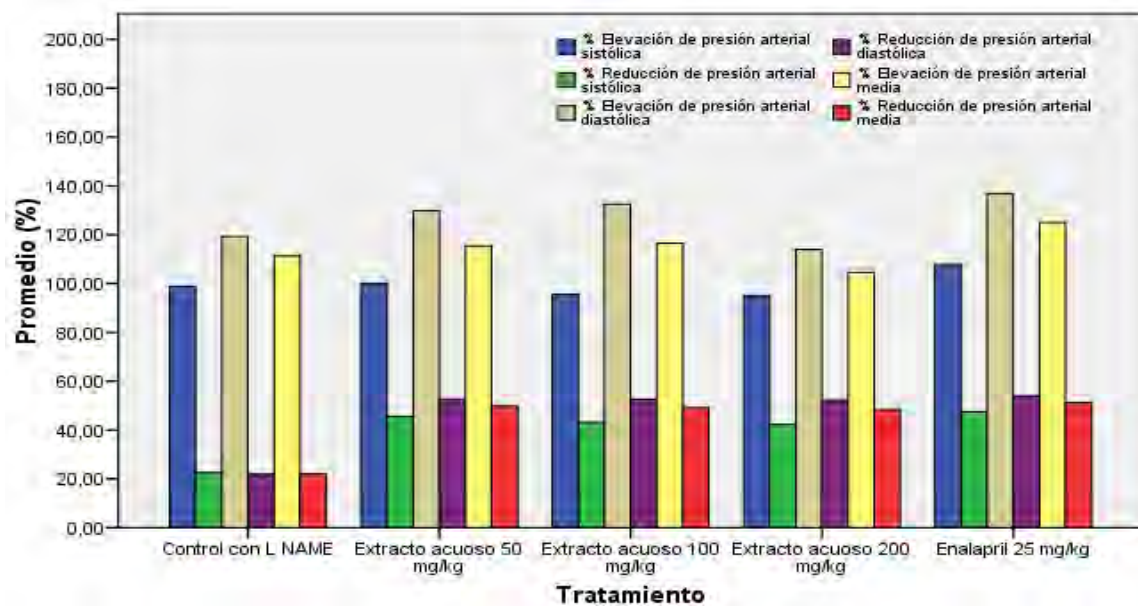


Figura 7. Comparaciones de los niveles de elevación (día 0) y reducción (día 30) de la presión arterial en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

4.4 DE LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO DIURÉTICO DEL EXTRACTO ACUOSO

Tabla 11. Efecto diurético al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratas normotensas.

Tratamiento	1 hora (mL)	2 hora (mL)	3 hora (mL)	4 hora (mL)	5 hora (mL)	6 hora (mL)
Control	3.23 ± 0.04	2.93 ± 0.09	2.35 ± 0.24	2.35 ± 0.07	1.72 ± 0.27	1.32 ± 0.22
Furosemida 10 mg/kg	12.35 ± 1.33 ^(**)	6.55 ± 0.74 ^(**)	3.68 ± 0.49	4.58 ± 0.73 ^(*)	2.43 ± 0.49	2.63 ± 0.75
Extracto 50 mg/kg	5.22 ± 0.43	3.27 ± 0.43	3.70 ± 0.69	5.02 ± 0.64 ^(*)	4.08 ± 0.62 ^(***)	4.60 ± 1.09 ^(***)
Extracto 100 mg/kg	6.02 ± 0.39 ^(*)	3.07 ± 0.19	3.40 ± 0.32	5.38 ± 0.82 ^(*)	4.05 ± 0.43 ^(***)	3.98 ± 0.75 ^(***)
Extracto 200 mg/kg	4.93 ± 0.45	5.28 ± 0.46 ^(*)	5.10 ± 0.44 ^(*)	7.35 ± 1.03 ^(**)	4.58 ± 0.57 ^(***)	4.25 ± 0.84 ^(***)

Los valores son expresados como media ± error estándar de los volúmenes de orina de cada una de las horas de evaluación. ^(*) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control, ^(**) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto a todos los grupos, ^(***) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto a Furosemida y al grupo control. (p < 0.05).

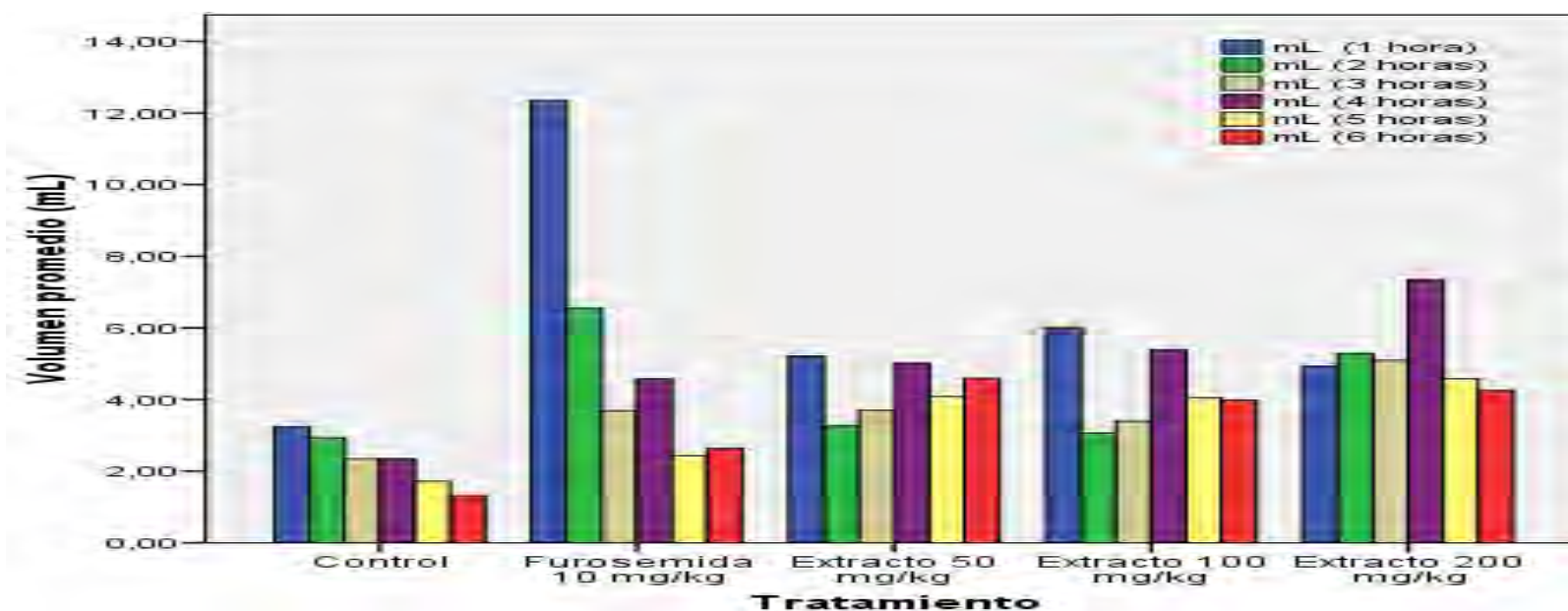


Figura 8. Efecto diurético al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratas normotensas.

Tabla 12. Porcentaje de Diuresis Relativa a la sexta hora al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratas normotensas.

Tratamiento	N	Media \pm Error estándar (%DR)	Mínimo	Máximo
Control	6	-9.68 \pm 2.65	-18.28	-2.15
Furosemida 10 mg/kg	6	73.30 \pm 15.26 ^(*) ^(**)	30.65	118.82
Extracto 50 mg/kg	6	39.16 \pm 8.58 ^(*)	11.29	69.89
Extracto 100 mg/kg	6	67.86 \pm 1.45 ^(*) ^(**)	63.25	72.36
Extracto 200 mg/kg	6	69.36 \pm 5.31 ^(*) ^(**)	55.38	91.4

Los valores son expresados como media \pm error estándar de los porcentajes de Diuresis relativa (%DR). ^(*) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control, ^(**) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo de 50 mg/kg y al grupo control. ($p < 0.05$).

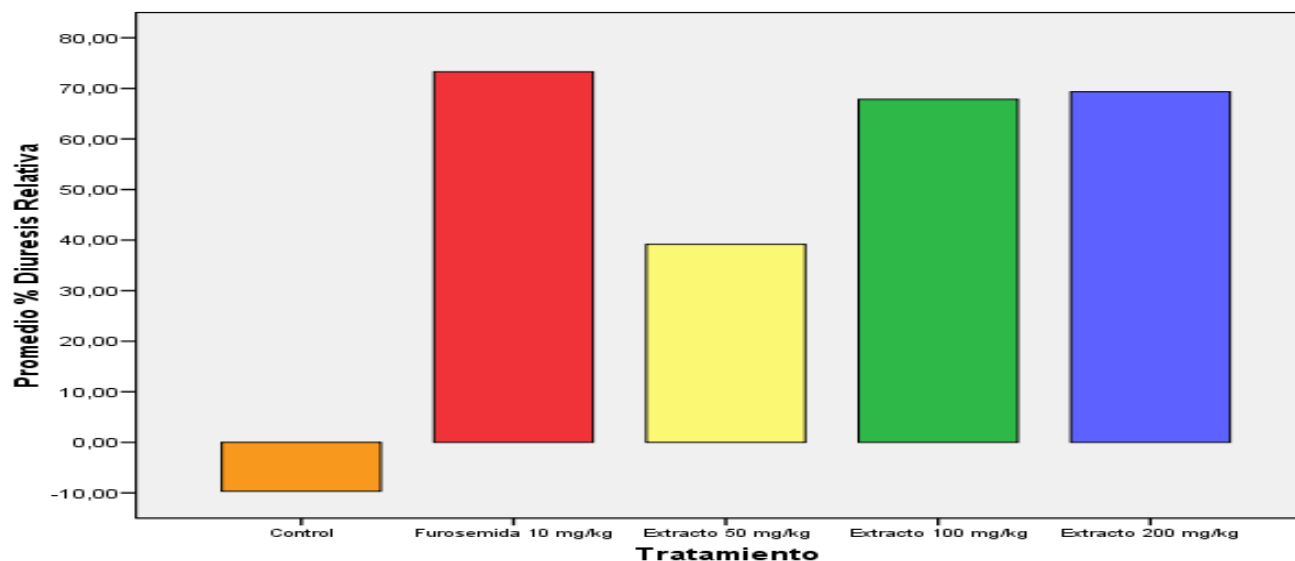


Figura 9. Porcentaje de Diuresis Relativa a la sexta hora al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratas normotensas.

4.5 DE LA EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO Y MALONDIALDEHIDO.

Tabla 13. Determinación de los niveles óxido nítrico (nmol/mL) al día 30 en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tratamiento	N	Media ± Error estándar	Mínimo	Máximo
Control sin L NAME	8	0.12467 ± 0.00084 ^(**)	0.121	0.127
Control con L NAME	8	0.12017 ± 0.00125	0.117	0.125
Extracto acuoso 50 mg/kg	8	0.12683 ± 0.00095 ^(*)	0.124	0.131
Extracto acuoso 100 mg/kg	8	0.13117 ± 0.00291 ^(*)	0.122	0.138
Extracto acuoso 200 mg/kg	8	0.12500 ± 0.00100 ^(*)	0.121	0.128
Enalapril 25 mg/kg	8	0.12400 ± 0.00157 ^(***)	0.12	0.129

^(*) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control con L-NAME. ^(**) Existe diferencia significativa entre la media con respecto a la dosis de 100 mg/kg. ^(***) Existe diferencia significativa entre la media con respecto a la dosis de 100 mg/kg. (p < 0.05).

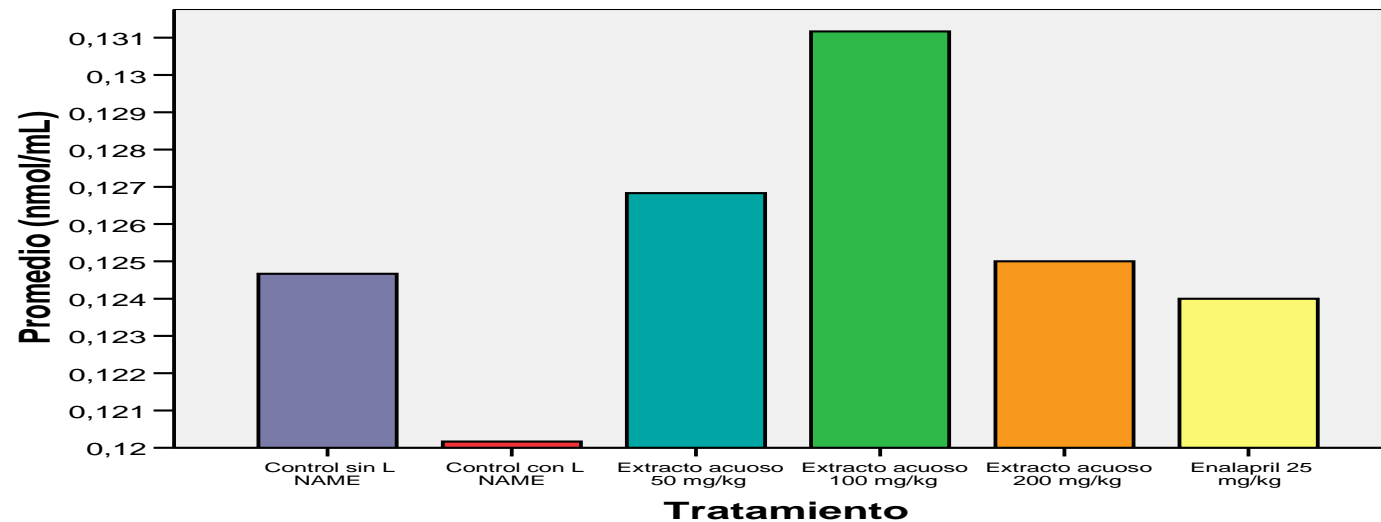


Figura 10. Niveles de óxido nítrico al día 30 al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tabla 14. Determinación de los niveles de malondialdehido (nmol/mL) al día 30 en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

Tratamiento	N	Media \pm Error estándar	Mínimo	Máximo
Control sin L NAME	8	0.14717 \pm 0.00493 ^(*)	0.125	0.16
Control con L NAME	8	0.21183 \pm 0.00686	0.188	0.237
Extracto acuoso 50 mg/kg	8	0.09017 \pm 0.00550 ^{(*) (**)}	0.069	0.109
Extracto acuoso 100 mg/kg	8	0.14167 \pm 0.00619 ^{(*) (***)}	0.113	0.158
Extracto acuoso 200 mg/kg	8	0.11517 \pm 0.00469 ^{(*) (***)}	0.100	0.130
Enalapril 25 mg/kg	8	0.18000 \pm 0.00528 ^(*)	0.159	0.197

^(*) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control con L-NAME. ^(**) Existe diferencia significativa entre la media con respecto a los grupos experimentales y enalapril. ($p < 0.05$). ^(***) No existe diferencia significativa entre la media de ambos tratamientos. ($p > 0.05$).

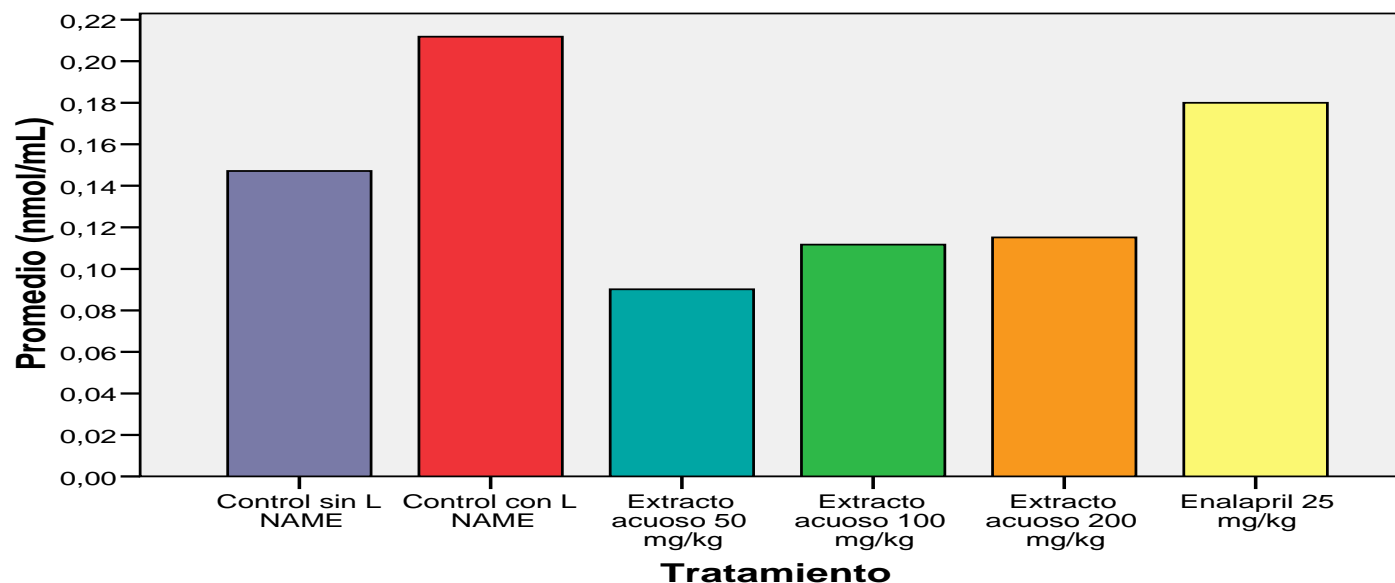


Figura 11. Niveles de malondialdehido al día 30 al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.

4.5 DE LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS EN EL ENSAYO A DOSIS REPETIDAS POR 60 DÍAS.

Tabla 15. Niveles de los datos hematológicos y bioquímicos al administrar el extracto acuosos a ratas normotensas por 60 días

Tratamiento	Hemoglobina (g/dl)	Hematocrito (%)	Leucocitos	Colesterol Total (mg/dl)	HDL-Colesterol (mg/dl)
Control	12.48 ± 0.08	38.17 ± 0.31	9066.67 ± 91.89	182.17 ± 1.45	52.33 ± 1.09
Extracto 100 mg/kg	12.35 ± 0.30	38.33 ± 0.49	7833.33 ± 470.22	122.50 ± 0.56(*)	53.67 ± 1.09(**)
Extracto 200 mg/kg	12.63 ± 0.51	38.83 ± 1.89	6616.67 ± 645.71(*)	163.33 ± 10.58	45.83 ± 1.78

Los valores son expresados como media ± error estándar. (*) Existe diferencia significativa entre las medias con respecto al grupo control. (**) Existe diferencia significativa entre la media con respecto al grupo de 200 mg/kg. (p < 0.05).

Tabla 16. Niveles de los datos bioquímicos al administrar el extracto acuosos a ratas normotensas por 60 días

Tratamiento	Triglicéridos (mg/dl)	Glucosa (mg/dl)	Urea (mg/dl)	TGP (UI/L)	Fosfatasa Alcalina (UI/L)
Control	171.67 ± 8.92	82.33 ± 3.22	21.67 ± 2.17	40.17 ± 0.65	149.00 ± 16.24
Extracto 100 mg/kg	186.67 ± 12.53	74.50 ± 4.40	22.50 ± 2.88	25.83 ± 0.95(*)	166.00 ± 30.28
Extracto 200 mg/kg	186.33 ± 15.84	87.67 ± 5.84	20.00 ± 3.28	21.83 ± 5.11(*)	155.33 ± 7.06

Los valores son expresados como media ± error estándar. (*) Existe diferencia significativa entre la media con respecto al grupo control. (p < 0.05).

4.5 DE LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS A NIVEL HEMATOLÓGICO Y BIOQUÍMICO.

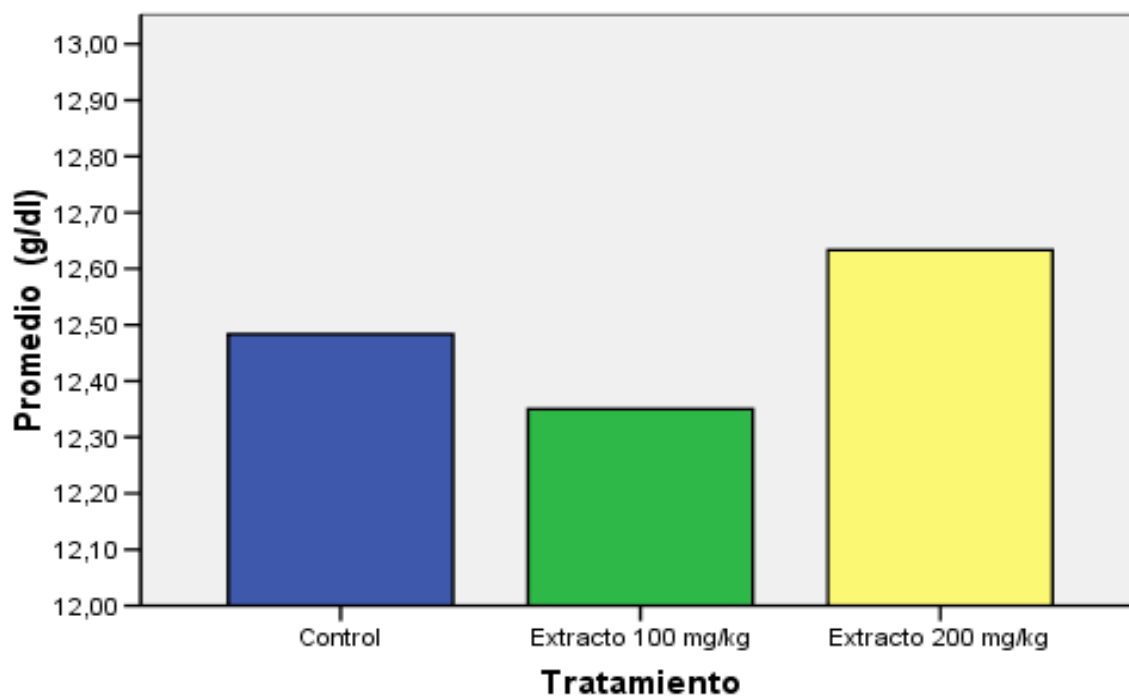


Figura 12. Nivel de hemoglobina al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 11.5 – 16.0)⁽⁵⁰⁾

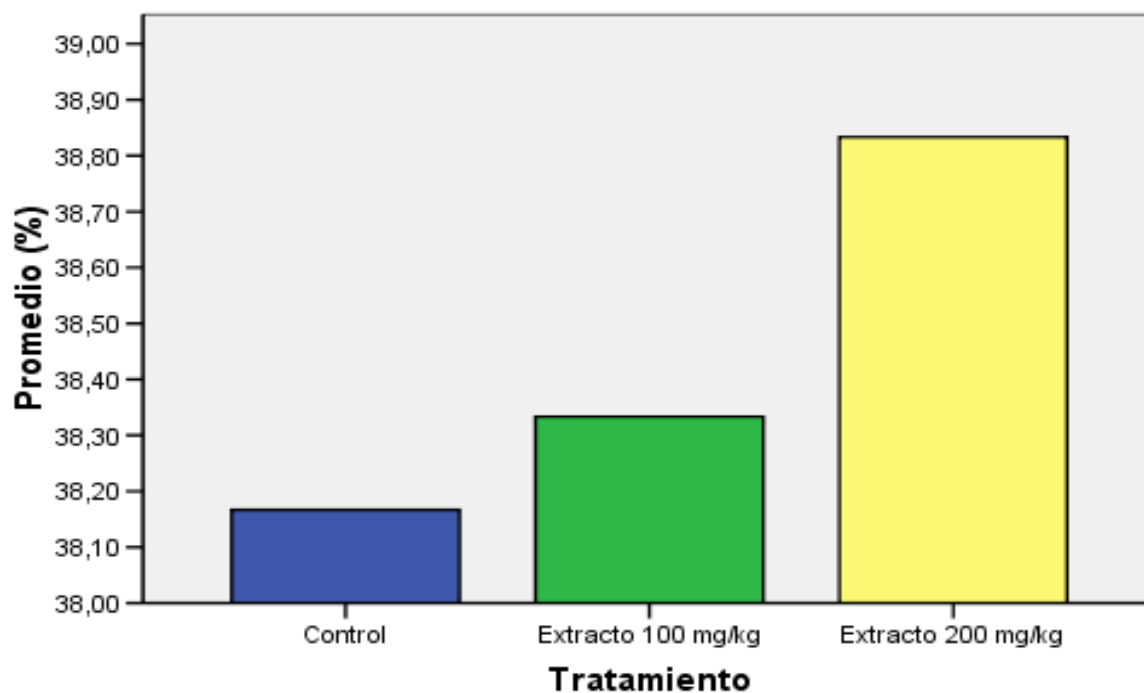


Figura 13. Nivel de hematocrito al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 35 – 48)⁽⁵⁰⁾

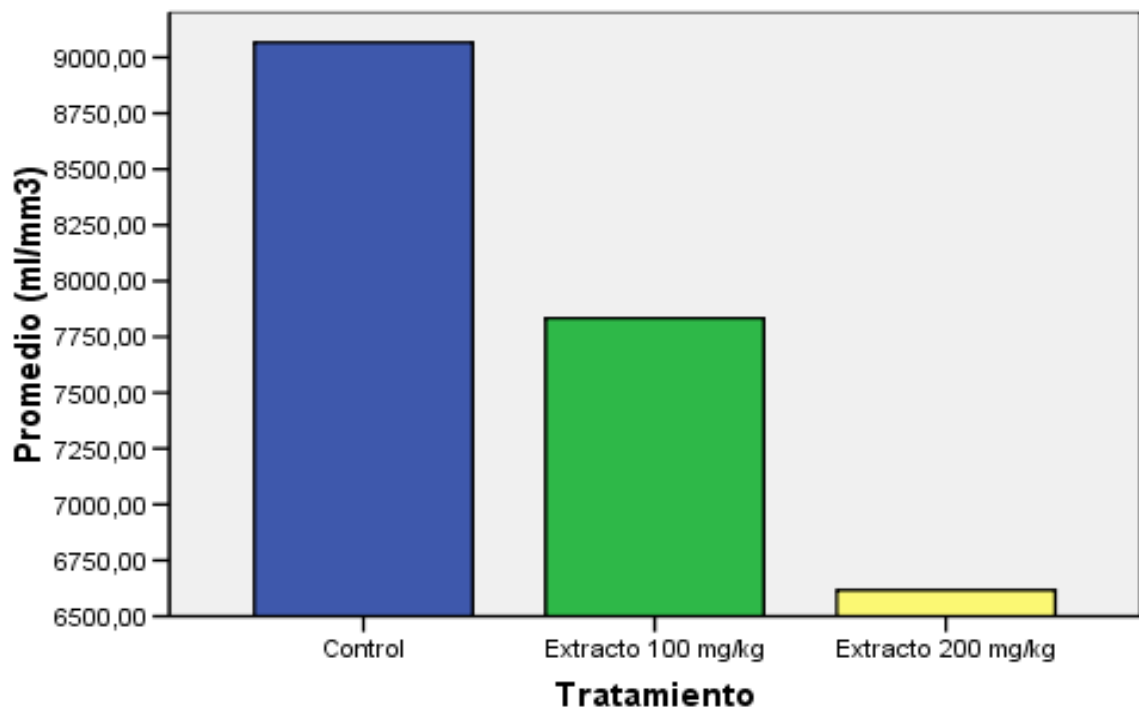


Figura 14. Nivel de leucocitos al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 4000 – 10200)⁽⁵⁰⁾

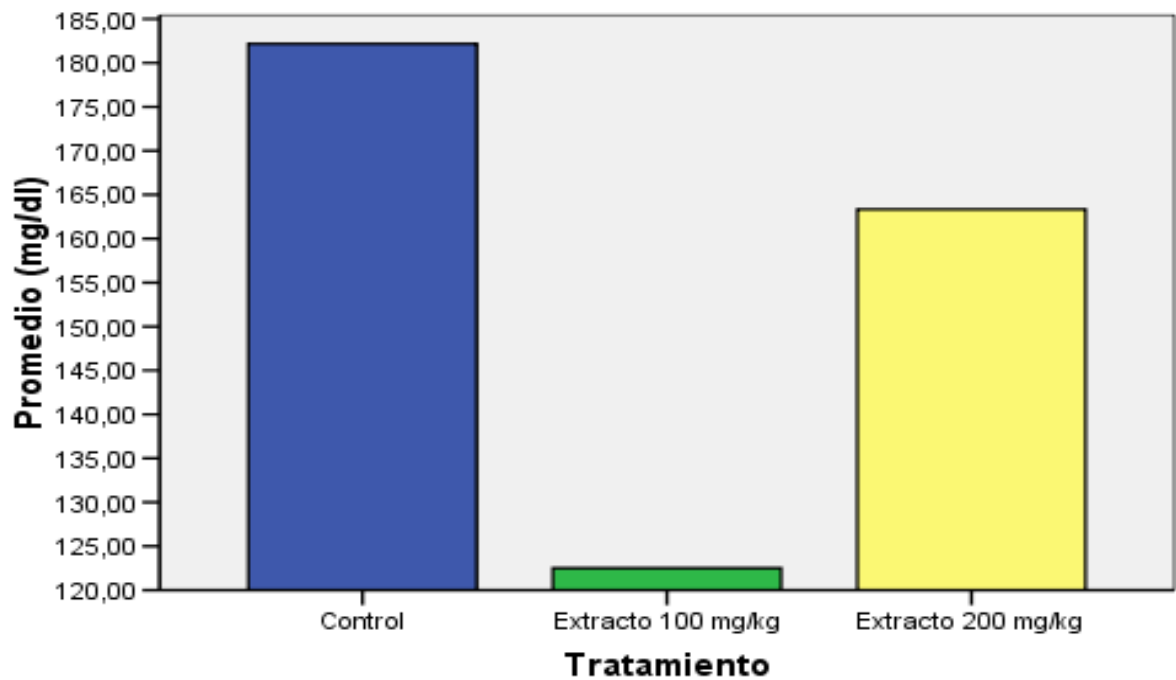


Figura 15. Nivel de colesterol total al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 46 – 92 mg/dl)⁽⁵⁰⁾

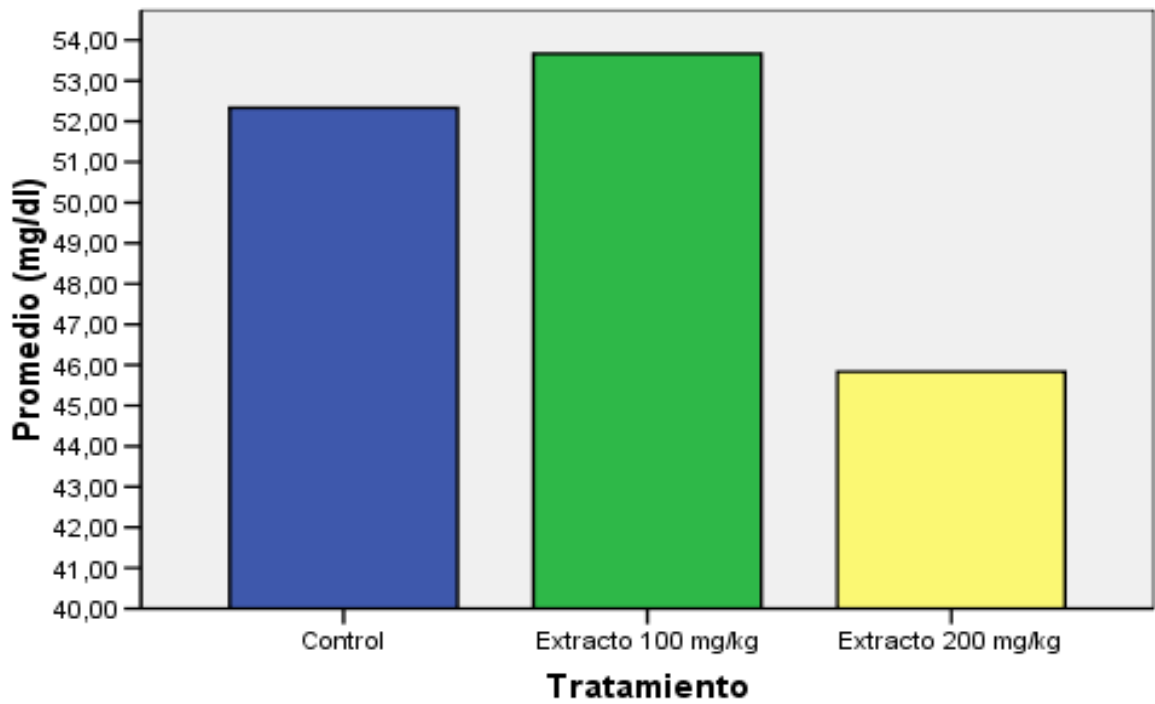


Figura 16. Nivel de HDL-colesterol al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días.

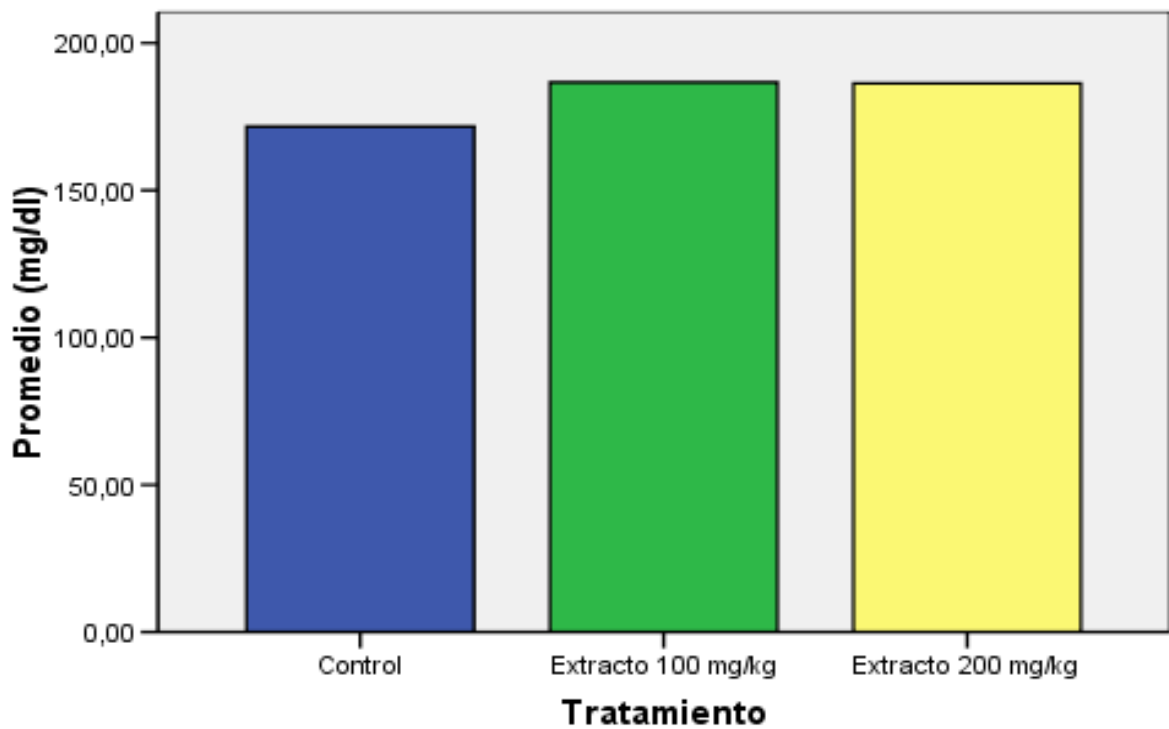


Figura 17. Nivel de triglicéridos al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días.

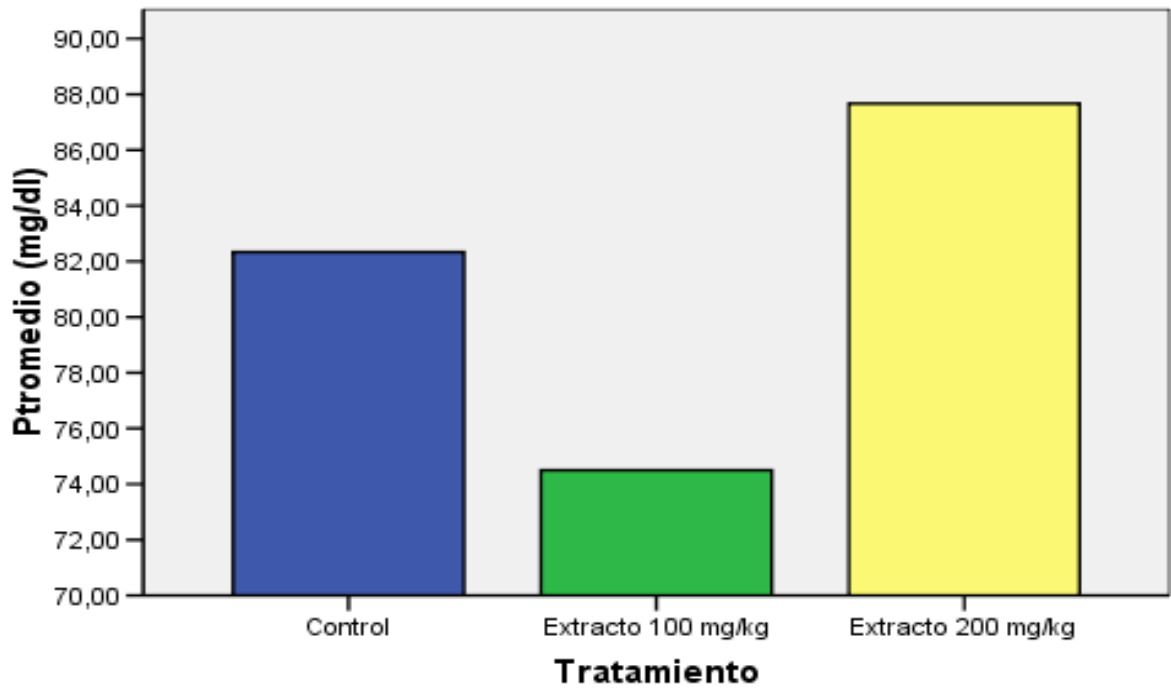


Figura 18. Nivel de glucosa al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 85 – 132)⁽⁵⁰⁾

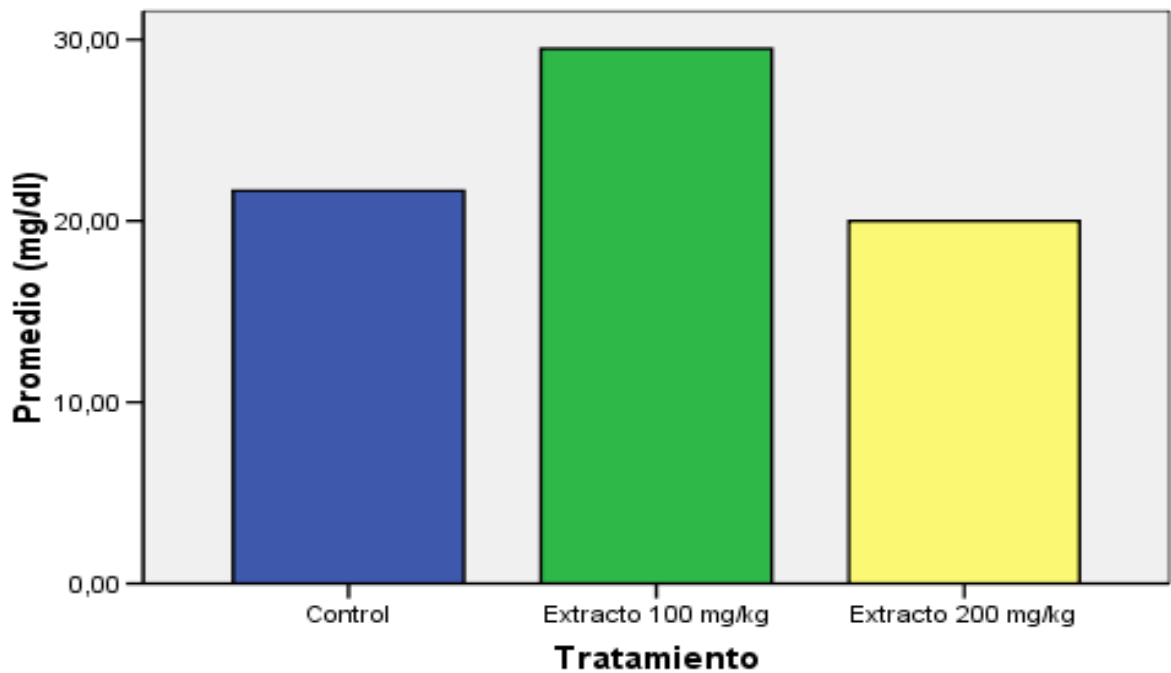


Figura 19. Nivel de urea al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 20 – 40)⁽⁵⁰⁾

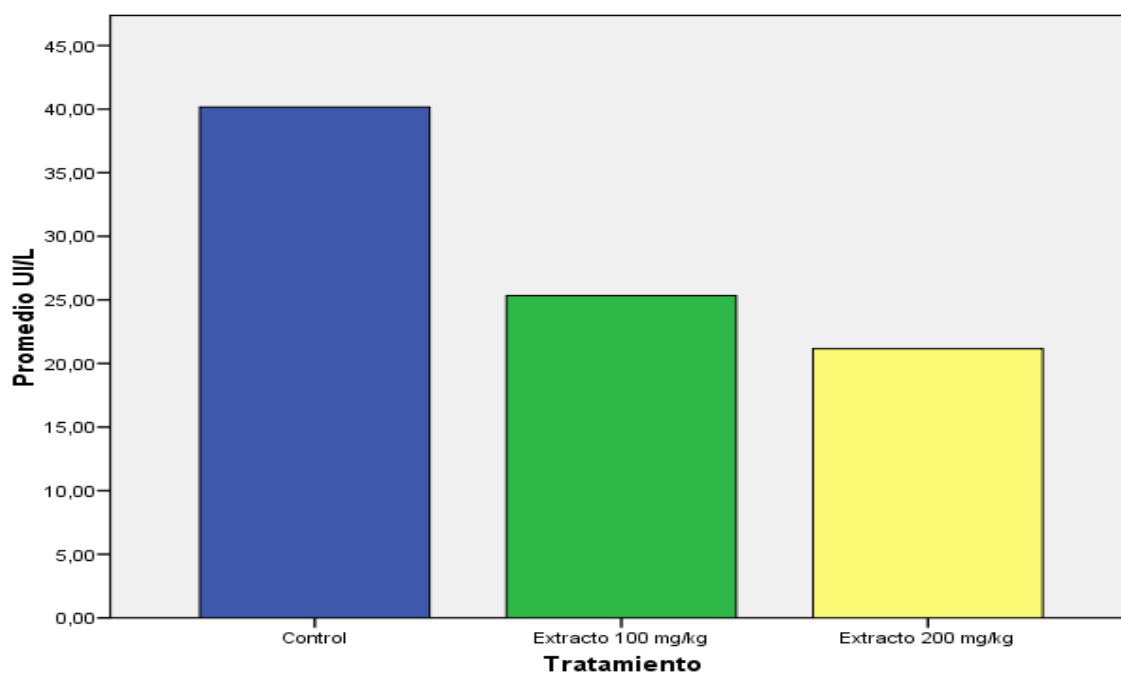


Figura 20. Nivel de TGP al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 17 – 50)⁽⁵⁰⁾

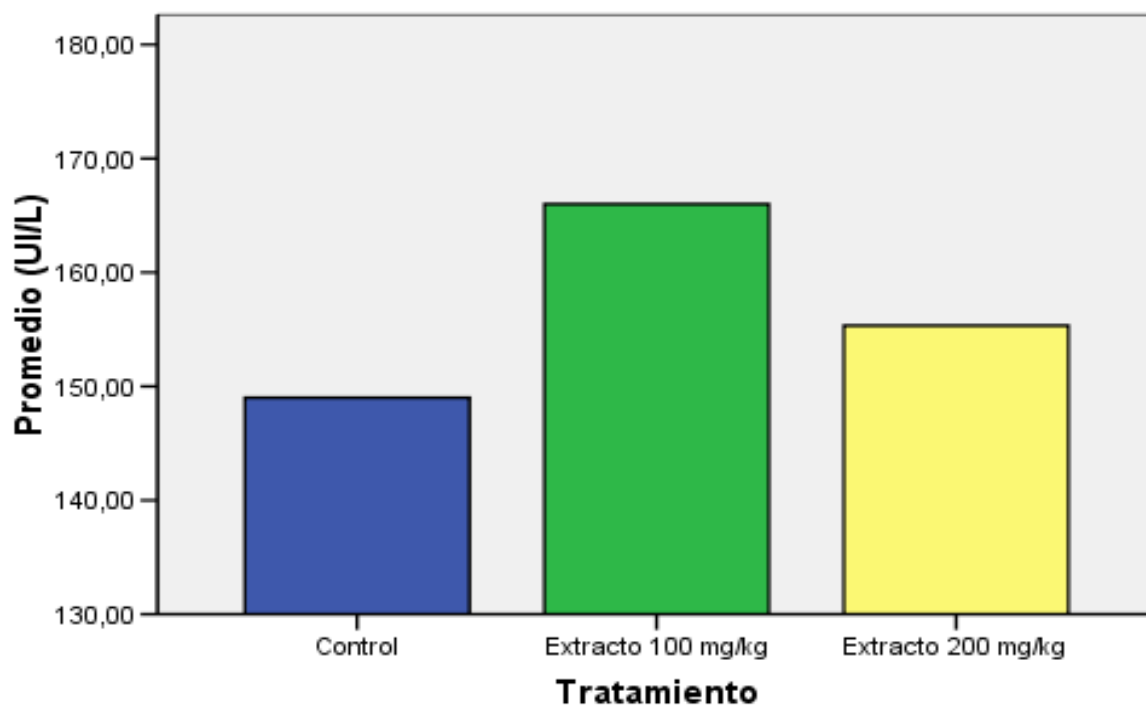


Figura 21. Nivel de fosfatasa alcalina al administrar el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz a ratas normotensas por 60 días. (Rango normal: 39 - 216)⁽⁵⁰⁾

4.6 DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO A NIVEL ANATOMOPATOLÓGICO.

CORAZÓN

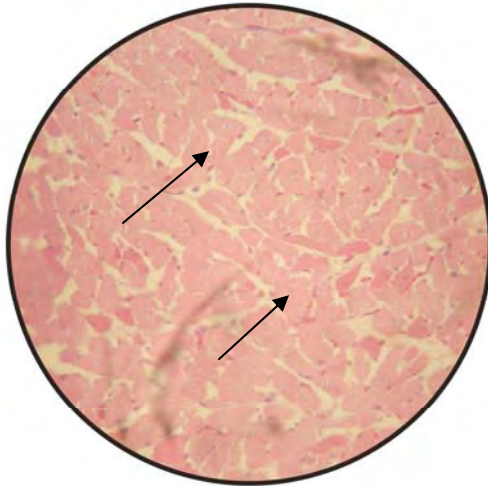


Figura 22. Grupo control, se observa tejido cardiaco sin alteración anatomopatológica. Coloración hematoxilina – eosina. X40.

Figura 23. Grupo a dosis de 100 mg/kg se observa tejido cardiaco (flechas) sin cambios anatomopatológicos. Coloración hematoxilina – eosina. X40.

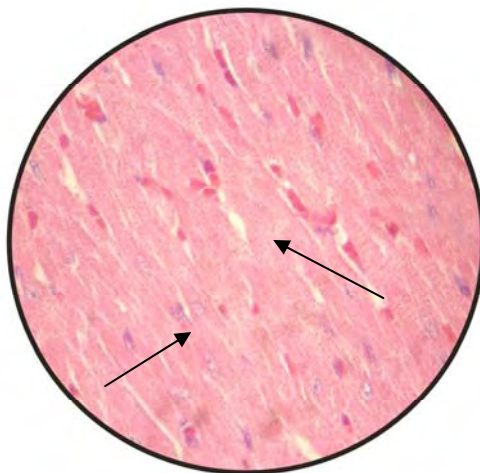
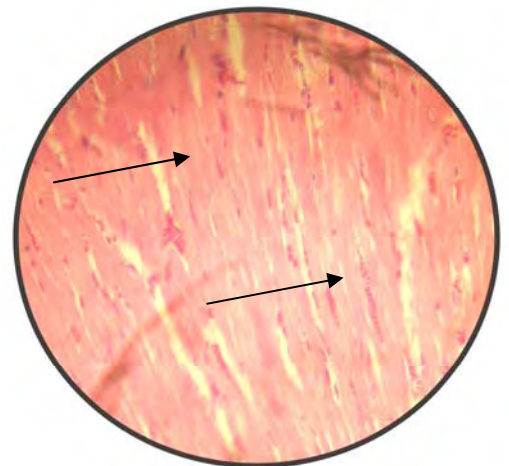


Figura 24. Grupo a dosis de 200 mg/kg se observa tejido cardiaco (flechas) sin cambios anatomopatológicos. Coloración hematoxilina – eosina. X40.

PULMÓN

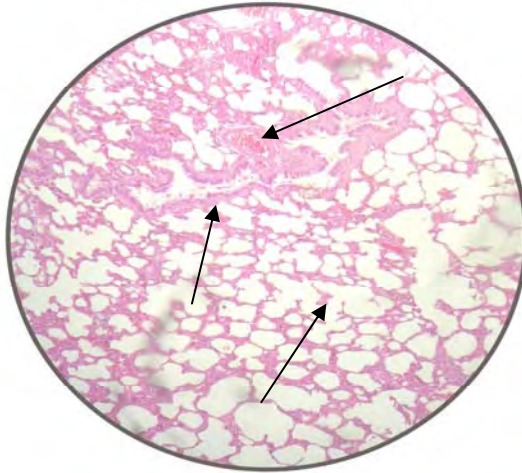


Figura 25. Grupo control se observa tejido pulmonar caracterizado por la presencia de conductos rodeados de un parénquima esponjoso. Se aprecia la vena, alveolos y bronquiolos de aspecto normal. Coloración hematoxilina – eosina. X10.

Figura 26. Grupo a dosis de 100 mg/kg se observa alveolos y bronquiolos de aspecto normal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X40.

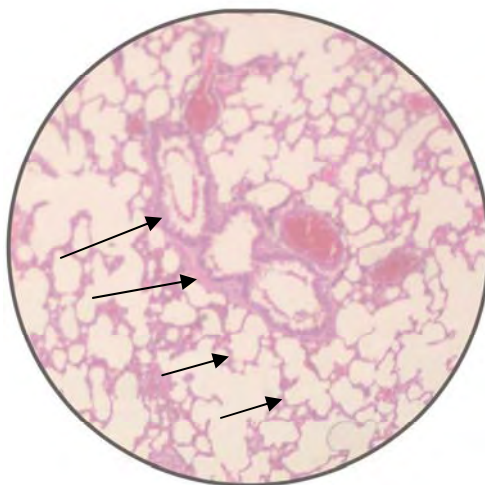
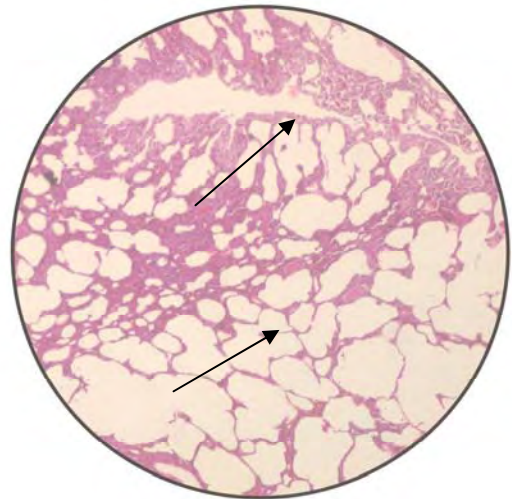


Figura 27. Grupo a dosis de 200 mg/kg se observa alveolos respiratorios, pared bronquial y alveolar sin alteraciones (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X40.

HÍGADO



Figura 28. Grupo control se observa tejido hepático en donde no hay alteración de los cordones de hepatocitos y vena centrolobulillar (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X40.

Figura 29. Grupo a dosis de 100 mg/kg se observa tejido hepático en donde no hay alteración de los cordones de hepatocitos y vena centrolobulillar (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X40.

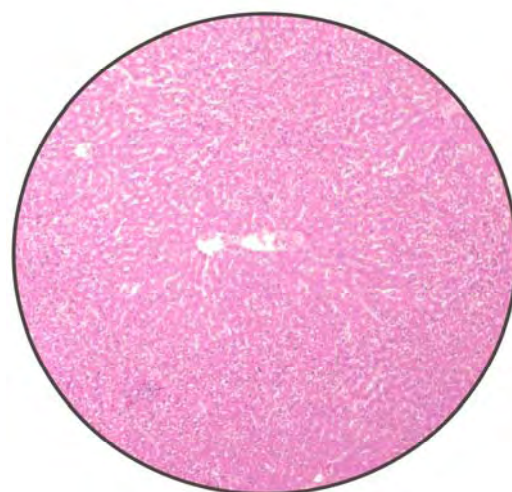
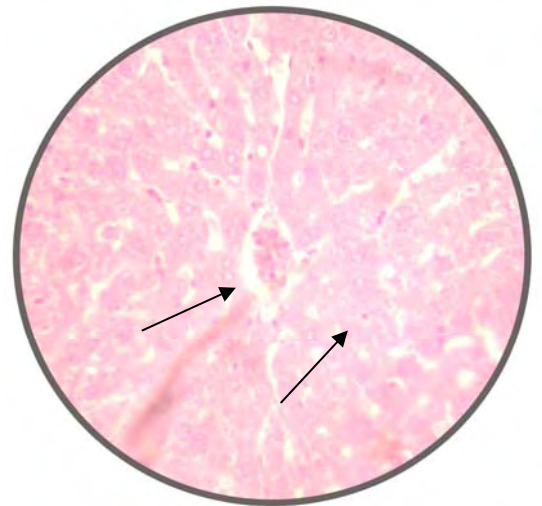


Figura 30. Grupo a dosis de 200 mg/kg se observa tejido hepático (parénquima hepático) donde no se observa alteración anatomopatológica del lobulillo hepático. Coloración hematoxilina – eosina. X10.

RIÑÓN

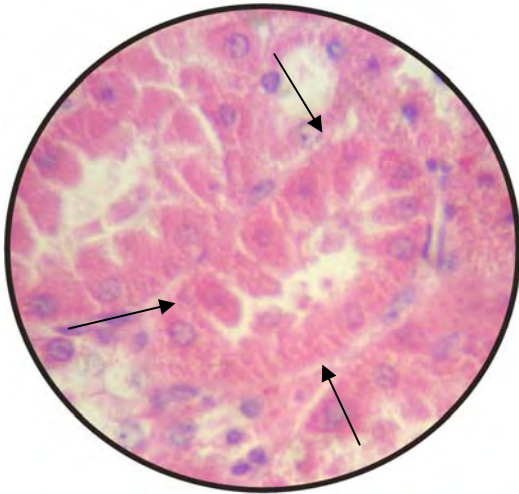


Figura 31. Grupo control se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológica del túbulo contorneado distal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

Figura 32. Grupo a dosis de 100 mg/kg se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológica del túbulo contorneado distal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

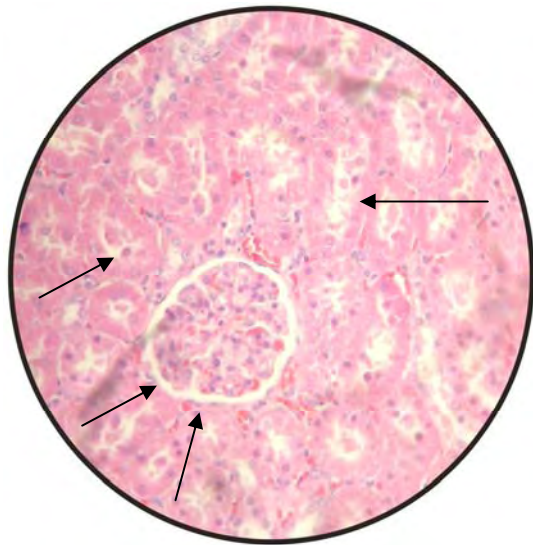
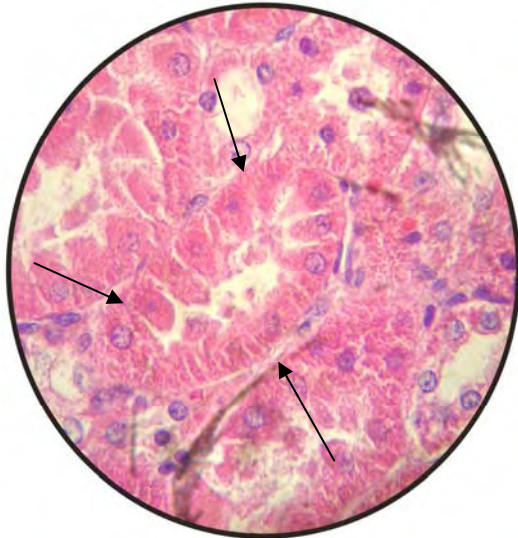


Figura 33. Grupo a dosis de 200 mg/kg se observa tejido renal en donde no hay alteración anatomopatológica del túbulo contorneado distal, túbulo contorneado proximal y glomérulo renal (flechas). Coloración hematoxilina – eosina. X100.

V. DISCUSIÓN

Los objetivos de este estudio fueron investigar si ratas hipertensas inducidas por L-NAME podrían reducir los niveles de presión arterial al recibir el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz; conocer su posible efecto diurético; determinar los niveles de óxido nítrico y malondialdehído; así como evaluar los efectos tóxicos a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico al administrar el extracto acuoso por vía oral durante 60 días en ratas normales. A continuación se busca explicar los hallazgos encontrados.

Es necesario resaltar que en la preparación del extracto se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 28,80% de rendimiento, este resultado es inferior al obtenido por Lastra y Yáñez ⁽³⁸⁾ quien obtuvo un rendimiento de 40,26% a partir de un extracto hidroalcohólico al 70%. Se debe señalar que el agua al ser un solvente polar ⁽⁵⁷⁾ haya obtenido en su extracción metabolitos secundarios de mayor polaridad; el solvente hidroalcohólico por presentar menor polaridad ⁽⁵⁷⁾ puede extraer metabolitos secundarios de tipo polar y apolar; ello estaría explicando la diferencia del rendimiento obtenido. La prueba de solubilidad en agua indicó que el residuo seco es muy poco soluble en agua, por lo que fue necesario usar un agente tensoactivo como el polisorbato 80 (Tween 80) para obtener una solubilidad completa y poder así administrarlo a los animales de experimentación ⁽³⁸⁾.

En el estudio fitoquímico cualitativo (tabla 5) el extracto acuoso mostró la presencia de abundante cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos, seguido de regular cantidad quinonas, heterósidos y en poca cantidad taninos, triterpenoides y saponinas. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Lastra y Yáñez ⁽³⁸⁾ en donde se determinó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas y taninos en el extracto seco hidroalcohólico de *Calceolaria myriophylla*. Asimismo en otra especie vegetal del mismo género, *Calceolaria tripartita*, Tomas et al ⁽³⁹⁾ determinó la presencia de diterpenos, cumarinas y alcaloides en un extracto acuoso, que concuerda en la presencia de alcaloides y triterpenoides. En una tesis realizada en el año 2006 ⁽⁵⁸⁾ se determinó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas en la *Calceolaria tripartita* concordando con la presencia de estos constituyentes químicos en el género *Calceolaria*. Se debe señalar que la especie vegetal del presente estudio pertenece a la familia de las

Scrofulariaceae y en esta misma familia se encuentra las especies vegetales de la *Digitalis lanata* y *Digitalis purpurea* que en su composición fitoquímica presentan heterósidos cardiotónicos ⁽⁵⁶⁾.

Se ha buscado validar el efecto hipotensor de *Calceolaria myriophylla* Kraenz, utilizando el método de inducción de hipertensión por N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) ^(28, 49), en donde se demuestra que la administración durante 05 días consecutivos de L-NAME por vía oral produce un aumento de la presión arterial ⁽²⁸⁾. El L-NAME es un inhibidor irreversible de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) encargada de la producción de óxido nítrico en el endotelio a partir de la L-arginina. La inhibición de la NOS disminuye la producción de óxido nítrico (NO) ocasiona vasoconstricción, aumento de la liberación de renina e hipertensión arterial ^(21, 60 -62).

Según los resultados de la presente investigación el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz en dosis de 50 mg/kg, 100 mg/kg y 200 mg/kg presentó efecto hipotensor a nivel de presión arterial sistólica, diastólica y media a lo largo del tratamiento durante 30 días, como se indica en la tabla 6, tabla 7, tabla 8 (figuras 3, 4 y 5). El efecto hipotensor se hizo sostenible a partir del día 10 de tratamiento a lo largo del experimento. Durante el tratamiento no hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales y el enalapril que es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II ⁽⁶³⁾, indicándonos que los animales expuestos a hipertensión reducirán sus cifras de presión arterial tanto al recibir enalapril o el extracto de la planta.

El porcentaje de elevación de la presión arterial en relación a la presión basal (tabla 9) se debe indicar que en promedio la presión sistólica se elevó en un 99.50 %, la presión diastólica en un 126.51 % y la presión arterial media en un 114.55 %. Estos resultados no son comparables según lo indicado por Ramírez ⁽⁴⁹⁾, quién señala que la presión sistólica y diastólica se eleva en un 20 a 40 %. Por otro lado Sharifi et al ⁽²⁸⁾, Rodríguez et al ⁽⁶⁴⁾, reportan elevaciones de la presión de arterial sistólica en un 90 a 100%. Así mismo Ramírez et al señala que el L-NAME produce un mayor aumento de la presión diastólica ⁽⁴⁹⁾.

El estudio de las plantas medicinales con efecto hipotensor desarrollado en modelos preclínicos y clínicos muestran constituyentes químicos responsables del efecto

hipotensor como son los flavonoides ^(57, 65) y compuestos fenólicos ^(57, 66, 67), saponinas esteroidales ⁽⁶⁸⁾ estos metabolitos secundarios se encuentran en abundante cantidad en la especie vegetal evaluada, determinado en el análisis fitoquímico cualitativo (tabla 5). El mecanismo de acción hipotensor de los 3 compuestos aludidos sería por un efecto vasodilatador ⁽⁶⁵⁾ e inhibición del sistema renina angiotensina ⁽⁶⁷⁾.

Los resultados del efecto diurético indicados en la tabla 11 y figura 8, se puede observar que la furosemida, un diurético cuyo mecanismo de acción es a nivel de la rama ascendente gruesa del asa de Henle que inhibe el sistema de transporte acoplado $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ⁽⁶³⁾, presenta un volumen de excreción urinaria superior en la primera hora que es estadísticamente significativa con relación a todos los grupos, pero en el transcurso del experimento (total 6 horas) se observa que los grupos experimentales (a partir de la quinta hora) presentan un volumen de excreción urinaria superior a la furosemida y al grupo control, siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$). También se indica que los grupos experimentales presentan un efecto diurético sostenido a partir de la 4ta hora del experimento. En cambio la furosemida presenta un buen efecto diurético en las tres primeras horas tal como describe Katzung ⁽⁶³⁾. Una información a observar en esta tabla es que a la dosis de 200 mg/kg presenta efecto diurético a partir de la segunda hora y es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) durante el experimento.

En la tabla 12 (figura 9) se indica los porcentajes de diuresis relativa (%DR), donde todos los grupos experimentales y el de la furosemida son estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con relación al grupo control; así mismo los grupos a las dosis de 100 mg/kg, 200 mg/kg y furosemida presentan diferencia estadística ($p < 0.05$) con relación al grupo de 50 mg/kg. Este porcentaje fue obtenido del volumen de excreción urinaria total recolectado durante las 6 horas del experimento.

El efecto diurético puede ser atribuido a la presencia de metabolitos secundarios como los flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas tal como lo reportan Kuklinski ⁽⁵⁷⁾, Maghrani ⁽⁶⁹⁾, Valencia ⁽⁷⁰⁾, Benjumea ⁽⁷¹⁾, Somova ⁽⁷²⁾, Lahlou ⁽⁷³⁾, los que explican que el efecto diurético se debería a la acción vasodilatadora, osmótica, inhibidores de la angiotensina aldosterona e inhibición de la reabsorción de sodio ⁽⁶⁹⁾, de acuerdo a lo señalado anteriormente, estos constituyentes químicos se encuentra en abundante

cantidad en la especie vegetal en estudio determinado en el análisis fitoquímico cualitativo (tabla 5).

Recientemente, se ha considerado que la hipertensión arterial esencial es un síndrome de anormalidades metabólicas y estructurales (genéticas y adquiridas); dentro de las alteraciones metabólicas han surgido evidencias que indican que las especies reactivas derivadas del oxígeno (EROs) juegan un papel fisiopatológico preponderante en el desarrollo de la hipertensión ⁽⁶¹⁾. Esto se debe al exceso de O_2^- y a la disminución de la liberación de óxido nítrico (ON) en la remodelación cardiovascular y en la vasculatura del riñón, mediado por los EROs ⁽⁷⁴⁾. Investigaciones recientes en pacientes con hipertensión esencial evidencian una situación de estrés oxidativo, con incremento de la concentración sanguínea de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicador de peroxidación lipídica ⁽⁵⁵⁾.

En la tabla 13 y figura 10 se observa que los niveles de óxido nítrico presentaron un aumento con respecto al grupo control con L-NAME que es estadísticamente significativa para todos los grupos experimentales incluyendo al grupo del enalapril, también se debe indicar que a la dosis de 100 mg/kg se obtuvieron mejores resultados siendo significativo ($p < 0.05$) con relación al grupo control sin L-NAME.

En la tabla 14 y figura 11 se observa que los niveles de malondialdehído presentan una disminución con relación al grupo control con L-NAME que es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) para todos los grupos experimentales incluyendo al grupo del enalapril.

De ambas tablas se indica que el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz presentó el aumento de los niveles séricos de óxido nítrico y la disminución de los niveles séricos de malondialdehído que va a favorecer su efecto hipotensor, que podría deberse a los constituyentes químicos presentes, principalmente a los compuestos fenólicos como los flavonoides y taninos ⁽⁷²⁾.

Los flavonoides y taninos principalmente presentan actividad antioxidante, pero principalmente a los flavonoides se les atribuye actividad antioxidante de acuerdo a reportes de Gorduza ⁽⁷⁵⁾, González ⁽⁷⁶⁾, Torok ⁽⁷⁷⁾ Ren ⁽⁷⁸⁾, Kuskoski ⁽⁷⁹⁾, Dragsted ⁽⁸⁰⁾,

Akdemir⁽⁸¹⁾, Silva⁽⁸²⁾ y Pérez⁽⁸³⁾. Estos flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, que les confiere una gran capacidad antioxidante, desempeñando un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tefectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis y el cáncer⁽⁶⁸⁾. Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son: presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones; Doble ligadura, en conjunción con la función 4-oxo del anillo C41-42; Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante. Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercitina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante^(74, 75, 77, 78, 83).

Durante el decenio pasado aumentó significativamente el empleo de plantas medicinales a consecuencia de las actividades de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la promoción de la medicina tradicional, los países han solicitado su ayuda en la identificación de medicamentos herbarios inocuos y eficaces para utilizarlos en los sistemas nacionales de asistencia sanitaria. En países desarrollados y en desarrollo, la población y el personal que lleva a cabo los servicios primarios de salud necesitan disponer de información actualizada y autorizada sobre las propiedades beneficiosas y los posibles efectos nocivos que conlleva el uso de todos los medicamentos de origen natural⁽⁸³⁾. En este trabajo se muestran los resultados de un estudio toxicológico realizado con la especie vegetal *Calceolaria myriophylla* Kraenz proveniente de la Región del Cusco que se utiliza en la medicina tradicional. El estudio brinda aspectos relacionados con las propiedades tóxicas que han sido poco estudiadas.

En la evaluación del efecto tóxico a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico que se evaluó en el ensayo a dosis repetidas por 60 días (tabla 15 y tabla 16), se ha determinado que el extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz administrado por vía oral durante 60 días consecutivos presentó una disminución en el número de leucocitos a dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg (siendo a estas dosis estadísticamente significativo $p < 0.05$); algunas drogas derivadas de plantas medicinales se utilizan por presentar efecto citotóxico, como la vinblastina y paclitaxel, que derivan

de *Catharanthus roseus* y *Taxus brevifolia*⁽⁸⁴⁾, también se han realizado ensayos sobre dos líneas celulares de leucemia humana (K562 y HL60); en dichos ensayos el extracto acuoso de *Uncaria tomentosa* suprimió la capacidad proliferativa de ambas líneas celulares, en mayor medida el tipo HL60⁽⁸⁵⁾. En un estudio preliminar, *Physalis peruviana* muestra ser una planta con mucho potencial en la búsqueda de sustancias con actividad antineoplásica⁽⁸⁴⁾. Pacientes con leucemia mieloide crónica y linfoma de Hodking fueron sensibles al acetato de longipilina y este estudio concordó con estudios publicados con sesquiterpenlactonas similares como acetato de ivalina que tiene una actividad antileucémica importante y baja toxicidad sobre células mononucleares de sangre periférica⁽⁸⁶⁾. En algunas especies vegetales se informa actividad citotóxica y antitumoral en compuestos de diterpenos y sulfolípidos⁽⁸⁷⁾, A nivel del colesterol sérico se presentó una disminución del colesterol total y un aumento del HDL-colesterol a dosis de 100 mg/kg, existen múltiples reportes sobre el estudio de las plantas medicinales sobre la dislipidemia, se debe señalar que el *Plantago ovata* (ispágula), *Allium sativum* (ajo) y *Cynara scolimus* (alcachofa) entre otros, son reportados por presentar efecto hipocolesterolemiantes⁽⁸⁸⁾; la actividad hipocolesterolemiantes de la hoja de alcachofa se atribuye a diferentes compuestos, como las lactonas sesquiterpénicas (cinaropicrina, grosheimina), y los flavonoides (luteolina, glucósidos de luteolina)⁽⁸⁹⁾. La administración del extracto acuoso de *Aloe vera* en conejos durante 6 semanas causó una disminución significativa de los lípidos en suero y un aumento del HDL-colesterol que es considerado como un efecto beneficioso asociado a la disminución de infarto⁽⁹⁰⁾. Se presentó una disminución de la TGP con relación al grupo control que es estadísticamente significativa a una dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg. La enzima TGP es muy sensible a las afectaciones hepáticas, tanto por procesos fisiopatológicos como por procesos tóxicos o iatrogénicos, siendo altamente específica para detectar lesiones celulares del parénquima hepático o trastornos de la permeabilidad de la pared celular por lo que los flavonoides juegan un rol importante como hepatoprotector así tenemos a la Silibina y Silandrina⁽⁹⁰⁾; la silimarina que es un flavonoide actúa protegiendo las células sanas del hígado por un mecanismo de fortalecimiento de la membrana celular y así dificulta la absorción de productos tóxicos por parte del hepatocito⁽⁹¹⁾. La cinaropicrina principio amargo que es una lactona sesquiterpénica, tiene acción colerética, colagoga y hepatoprotectora⁽⁹²⁾. Plantas del género *Hypericum* presenta también actividad hepatoprotectora⁽⁹³⁾. En los otros parámetros hematológicos y bioquímicos no hubo diferencias significativas a las dosis de 100 mg/kg y 200 mg/kg.

En la evaluación anatomopatológica del corazón, pulmón, hígado y riñón (figuras del 22 al 33) no se muestra evidencia de cambios histopatológicos con relación al grupo control durante todo el experimento, este dato indica un margen de seguridad pero debería ser confirmado con otros estudios de toxicidad, debido a que la hipertensión arterial es una enfermedad crónica y que la administración de medicamentos alopáticos o fitoterapéuticos son utilizados por tiempo indefinido.

La investigación permite recomendar la identificación y purificación del o los componentes responsables del efecto hipotensor y del efecto diurético; así mismo en profundizar en conocer su mecanismo de acción y ampliar los estudios de toxicidad aguda, genotoxicidad y mutagenicidad.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) contiene en abundante cantidad compuestos fenólicos y flavonoides.
- El extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) presentó efecto hipotensor sobre la presión arterial sistólica, diastólica y media en ratas hipertensas inducidas por L-NAME.
- El extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) evidenció efecto diurético en ratas normotensas.
- El extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) incrementó los niveles séricos de óxido nítrico y disminuyó los niveles séricos de malondialdehído.
- El extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* Kraenz (zapatilla) no ha inducido efecto tóxico a nivel hematológico, bioquímico y anatomopatológico.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vega T, Lozano J, Álamo R, Lleras S. Prevalencia de la hipertensión arterial en la población de Castilla y León. *Gaceta Sanitaria*. 2008; 22 (04): 330-336.
2. Llópiz S, Ávila Y, Kindelán O. Control de la hipertensión arterial con fitoterapia–Auriculoterapia en pacientes del consultorio médico Paraíso 1 durante julio–diciembre del 2001. *Medisan*. 2002; 6 (3): 8-13.
3. García P, Urrego J, D’Achiardi R, Delgado V. Hipertensión arterial: diagnóstico y manejo. *Universitas Médica*. 2004; 45 (2): 77 – 84.
4. Rivas J, Gutiérrez C, Rivas J. Tratamiento y costos farmacológicos de la hipertensión arterial no complicada. *Rev Soc Peru Med Interna* 2007; 20 (4): 139-144.
5. Lapa A, Monteiro de Lima T. Métodos farmacológicos para a validação de plantas medicinais. Sao Paulo – Brasil. Programa Iberoamericano de Ciencia e Tecnología para o Desenvolvimento. 1991.
6. Olazábal C, Mantillas J. Las Plantas Medicinales de Nuestra Tierra. Primera Edición. Cusco – Perú. Instituto de Ecología y Plantas Medicinales – IEPLAM. 2001. Pág. 23.
7. Roesrch C. Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú. Tomo 2. Cusco-Perú. Koeltz Scientific Books. Centro de Medicina Andina (CEMA). 1994. Pág. 1074 – 1077.
8. Ganong W. Fisiología Médica. 16a Edición. Ciudad de México. El Manual Moderno, SA. 1998. Pág. 358.
9. Rondón S, Cluet de Rodríguez I, Rossell M, Alvarez T. Niveles séricos de óxido nítrico en adolescentes con antecedentes hereditarios de hipertensión arterial sistémica. *Archivos venezolanos de puericultura y pediatría*. 2002; 65(4): 159-164.
10. Agusti R. Epidemiología de la hipertensión arterial en el Perú. *Acta Medica Peruana*. 2006; 23 (2): 69 – 75.
11. Goldman L, Ausiello D. Cecil Medicine. Twenty–Third Edition. Philadelphia. Elsevier. 2008.
12. Farreras P, Rozman C. Medicina Interna. Decimocuarta Edición. Tomo I. Madrid –España. Harcourt. 2000. Pág. 665- 691.
13. Ramírez J, Palacios M, Gutiérrez O. Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. *Colombia Médica*. Cali – Colombia. 2006; 37 (1): 53 – 60.
14. MINSA. Guía de Hipertensión Arterial. Ministerio de Salud del Perú. 2005. www.minsa.gob.pe/portal/03Estrategias-Nacionales/06ESN-NoTransmisibles/Archivos/Guía de HTA2005.pdf. 19 de Julio 2007.
15. Libby P, Bonow R, Mann D, Zipes D. Braunwald's heart disease : A textbook of cardiovascular medicine. Eighth Edition. Philadelphia. Elsevier. 2007.
16. Taler S. Secondary Causes of Hypertension. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2008; 35: 489-500.
17. Risler N, Miatello R, Cruzado M. La pared vascular en la hipertensión arterial. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología*. 2002; 31: 315 – 320.
18. Gamboa R. Fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Acta Medica Peruana*. 2006; 23 (2): 76-82.
19. Beevers G, Lip G, O'Brien E. ABC of hypertension. The pathophysiology of hypertension. *British Medical Journal*. 2001; 322: 912-916.

20. Haller C. The kidney and hypertension. *The New England Journal of Medicine*. 2005; 352 (22): 2362.
21. Maicas C, Lázaro E, Alcalá J, Hernández P, Rodríguez L. Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. *Monocardio*. 2003; V (3): 141-160.
22. Romayne L, Stas S, Lastra G, Manrique C, Sowers J. Hypertension in Obesity. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 2008; 37: 647–662.
23. Heilpern K. Pathophysiology of Hypertension. *Annals of Emergency Medicine*. 2008; 51 (3): S5-S6.
24. Touyz R. Vascular Remodeling, Retinal Arteries, and Hypertension. *Journal of the American hearth. Hypertension*. 2007; 50: 603-604.
25. Sowers j. Hypertension, Angiotensin II, and Oxidative Stress. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346 (25): 1999-2001.
26. Ouviaña S, Palmer L, Sasseti B. Endotelina-1, Óxido nítrico y Factor Von Willebrand en pacientes hipertensos diabéticos tipo 2. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2004; 38 (4): 471-476.
27. Chávez J, Suárez G, Gonzáles Z, Nuñez R, Socarras E, Amel A, et al. Determinación de Malondialdehído y Oxido Nítrico en Individuos Fumadores. *Sociedad Venezolana de Medicina Interna*. 2001; 17 (2): 1 – 7.
28. Sharifi A, Akbarloo N, Darabi R. Investigation of local ACE activity and structural alterations during development of L-NAME induced hypertension. *Pharmacological Research*. 2005; 52: 438 – 444.
29. Baglivo H. Clasificación de la hipertensión arterial en base a la definición del JNC VII y las guías de las Sociedades Europeas de Hipertensión Arterial y Cardiología 2003. *Revista Argentina de Anestesiología*. 2003; 61 (6): 341-345.
30. Molina R, Martí J. Traducción del Jonit National Committee - 7º Informe. Grupos de HTA de semFYC y SAMFyC. España. 2003.
31. Garbarino J, Fraga B, Hernandez M, Chamy M, Piovano M. Chemistry and biotransformations in the Scrophulariaceae family. *Pure Appl. Chem*. 2001; 73 (3): 579–582.
32. Salinas I, León B. Calceolariaceae endémicas del Perú. *Rev. peru. biol.* Número especial. 2006. 13 (2): 220s - 236s.
33. Khambay B, Batty D, Cahill M, Denholm I. Isolation, Characterization, and Biological Activity of Naphthoquinones from *Calceolaria andina* L. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1999; 47: 770 – 775.
34. Tomás F, Grayer R, Gil M, Harborne J. Distribution of 6-Hydroxi, 6-Methoxy and 8-Hydroxiflavone Glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and Related Families. *Phytochemistry*. 1988; 27 (8): 2631 -2645.
35. Luna G. Manual del Herbolario. Remedios Caseros. Tomo I. Centro Bartolomé de las Casas. Cusco – Perú. 1960. Pág. 245.
36. Muñiz M. Etnobotánica de la Flora Medicinal de la Provincia de Paruro. Tesis para Optar al Título Profesional de Biólogo. Cusco – Perú. Facultad de Biología. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 1992.
37. Ríos C. Evaluación de las Plantas de Interés Etnomedicinal en la Comunidad de Choccopía del Distrito de Colquepata – Paucartambo. Seminario Curricular. Cusco – Perú. Facultad de Biología. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2002.
38. Lastra Y, Yáñez B. Efecto Gastroprotector de *Gamochaeta americana* (Mill) Wedell (K'eto K'eto) y *Calceolaria myriophylla* Kraenz (Ayaq Zapatilla) sobre Lesiones Gástricas Inducidas por Indometacina en Ratas. Tesis para Optar al

- Título Profesional de Químico Farmacéutico. Cusco –Perú. Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2004.
39. Tomas G, Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J, Huamán J, Guerrero M, et al. Influencia de *Calceolaria tripartita* (sachaberros) sobre la Función Hepática en Ratas. Revista de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2004.
 40. Aldave A. Botánica Farmacéutica. Primera Edición. Perú. Editorial Libertad EIRL – CONCYTEC. 1988. Pág. 283 – 285.
 41. Alvarado E. Especies de la Flora Altoandina de la Provincia de Acomayo – Cusco. Tesis para optar al título de Biólogo. Cusco-Perú. Facultad de Biología – Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 1987. Pág. 68-71.
 42. De Lucca M.; Zalles J. Flora Medicinal Boliviana: Diccionario Enciclopédico. Primera Edición. Cochabamba – Bolivia. Editorial Las Amigas del Libro. 1992. Pág. 72-73.
 43. Durand A. Flora Medicinal del Distrito de Vilcabamba entre las localidades de Paltaybamba y Oyara Provincia de la Convención – Cusco. Cusco-Perú. Tesis para optar al Título de Biólogo. Facultad de Biología. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 1999. Pág. 58-59.
 44. Girault L. Curanderos itinerantes de los Andes. Investigaciones sobre plantas medicinales y mágicas. Primera Edición. La Paz-Bolivia. Editorial UNICEF – OPS – OMS. 1987. Pág. 402 – 405.
 45. Valdizan H, Maldonado A. La Medicina Popular Peruana. Lima-Perú. Imprenta Torres Aguirre. Tomo II. 1992. Pág. 325.
 46. Sharapin N. Fundamento de Tecnología de productos Fitoterapéuticos. Primera Edición. Santa Fe de Bogotá. Publicación del programa de Andrés Bello – Programa Iberoamericana de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. 2000.
 47. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y tecnología para el desarrollo. Proyecto X-1. Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región. 1995. Pág. 220.
 48. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica – Métodos en el estudio de Productos Naturales. Lima-Perú. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1988.
 49. Ramírez J, Palacios M, Gutiérrez O. Estudio del efecto antihipertensivo de la *Salvia scutellarioides* en un modelo de ratas hipertensas. Colombia Médica. Cali – Colombia. 2006; 37 (1): 53 – 60.
 50. Arroyo J, Rojas J, Chenguayen J. Manual de Modelos Experimentales de Farmacología. Primera Edición. Lima-Perú. Publicaciones ASDIMOR. 2004.
 51. León M, Tillan J, Hernández A, Cárdenas J, Calzada S. Efecto diurético y toxicidad aguda del *Orthosiphon aristatus* Blume (té de riñón). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1996; 1 (3): 26 – 30.
 52. Debenetti S, Miño J, Rojo A, Acevedo C. Ensayo del efecto diurético de los extractos acuosos de *Amaranthus muricatus* (Moquin) Gill. *Ex Hicken*, *Bauhinia Candicans* Benth. y *Smilax campestris* Griseb. Acta Farmacéutica Bonaerense. 2000; 19 (1): 17-20.
 53. Sandoval M, Ayala S, Oré R, Loli A, Huamán O, Valdivieso R, et al. Capacidad antioxidante de la sangre de grado (*Croton palanostigma*) sobre la mucosa gástrica, en animales de experimentación. An Fac Med. 2006; 67 (3): 199-205.

54. Arroyo J, Barreda A, Ráez E, Jurado B, Moral G, Martínez J, et al. El extracto etanólico de las flores de *Laccopetalum giganteum* (pacra-pacra) aumenta la fertilidad en ratas. *An Fac Med.* 2007; 68 (3): 238-243.
55. Oré R, Valdivieso R, Suárez S, Huerta D, Nuñez M, Durand J. Marcadores de estrés oxidativo en hipertensión arterial leve. *An Fac Med.* 2007; 68 (4): 351-355.
56. Tajer C, Doval H. Hipertensión arterial en debate. ¿Todos somos/seremos hipertensos?, ¿Las tiazidas son el primer tratamiento para la hipertensión arterial?. *Revista argentina de cardiología.* 2003; 71 (3): 161-163.
57. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Primera Edición. Barcelona – España. Editorial Omega S.A. 2003. Pág. 32-41.
58. Condorhuamán M, Laquihuanaco R. Efecto diurético y toxicidad de *Calceolaria tripartita* Ruiz & Pavón “zapatilla de agua”. Tesis para Optar al Título Profesional de Médico Cirujano. Cusco –Perú. Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2006.
59. Trearce F, Evans W, Cabo J. Farmacognosia. Decimotercera Edición. México. Mc Graw – Hill Interamericana. 1991. Pág. 231.
60. Hodge G, Ye V, Duggan K. Salt-sensitive hypertension resulting from nitric oxide synthase inhibition is associated with loss of regulation of angiotensin II in the rat. *Exp. Physiol.* 2009; 87 (1): 2322 – 2329.
61. Cosgrove T, Nwachukwu C, Olakanmi O. The nitric oxide inhibitor L-NAME prolongs synaptic facilitation. *Pioneering Neuroscience.* 2005; 6: 27-29.
62. Zhou X, Vaziri N, Wang X, Silva F, Laszik Z. Nitric Oxide Synthase Expression in Hypertension Induced by Inhibition of Glutathione Synthase. 2002; 300 (3): 762-767.
63. Katzung B. Farmacología básica y clínica. México. Editorial El Manual Moderno. 2001. Pág. 181 – 208.
64. Rodriguez I, Wangenstein R, Atucha N, O’Valle F, Del Moral R, García J, et al. Effects of Omapatrilat on blood pressure and renal injury in L-NAME and L-NAME plus DOCA-treated rats. 2003; 16: 33-38.
65. Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria* 2002; XVII (6): 271-278.
66. Rojas j, Ronceros S, Palomino R, Tomás G, Chenguayen J. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanólico de las hojas de *Pasiflora edulis* (maracuyá), en ratas. *An Fac Med.* 2006; 67 (3): 206-213.
67. Fatehi M, Saleh T, Fatehi Z, Farrokhfal K, Jafarzadeh M, Davodi S. A pharmacological study on *Berberis vulgaris* fruit extract. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005; 102: 46–52.
68. Phillips O, Mathewb C, Oriowo M. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2006; 104: 351–355.
69. Maghrani M, Zeggwagh A, Haloui M, Eddouks M. Acute diuretic effect of aqueous extract of *Retama raetam* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005; 99: 31-35.
70. Valencia C. Fundamentos de fitoquímica. Primera Edición. México. Editorial Trillas. 1995. Pág. 99 – 147.

71. Benjumea D, Abdala S, Hernández F, Pérez F, Martín D. Diuretic activity of *Artemisia thuscula*, an endemic canary species. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100: 205–209.
72. Somova L, Nadar A, Rammanan P, Shode F. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine*. 2003; 10 (2): 115-121.
73. Lahlou S, Tahraoui A, Israili Z, Lyoussi B. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 110: 458-463.
74. Fortuño A, San José G, Moreno M, Díez J, Zalba G. Oxidative stress and vascular remodeling. *Exp Physiol*. 2005; 90: 457-462.
75. Gorduza V, Tarabasanu C, Gorduza A, Cernatescu C, Rusu M. Structure-reactivity relationships of antioxidant flavonoides. *Ovidius University Annals of Chemistry*. 2000; 11 (1): 56-59.
76. González M, Soto M, Kite G. Flavonoides contenidos en tallos de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K. f. *Berlandieri* Schauer.) con propiedades antiinflamatorias. Instituto Politécnico Nacional. UK. 2003.
77. Torok J. Participation of Nitric Oxide in Different Models of Experimental Hypertension. *Physiol. Res*. 2008; 57: 813-825.
78. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Medicinal Research Reviews*. 2003. 23 (4): 519-534.
79. Kuskoski E, Asuero A, García C, Troncoso A, Fett R. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2004; 24 (4): 691-693.
80. Dragsted L. Antioxidant actions of polyphenols in humans. *Int J Vitam.Nutr.Res*. 2003; 73: 112-119.
81. Akdemir Z, Tatli C, Bed E, Khan I, Fabad J. Antioxidant Flavonoids from *Verbascum salviifolium* Boiss. *Pharm. Sci*. 2003; 28: 71-75.
82. Silva M, Santos M, Caroc A, Rocha R, Justino A, Mira L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A Re-examination. *Free Radical Research*. 2002; 36 (11): 1219–1227.
83. Pérez G. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*. 2003. 22 (1): 48-57.
84. Zavala D, Quispe A, Posso M, Rojas J, Vaisberg A. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. *An Fac Med*. 2006; 67(4): 283-289.
85. Carretero M. Alcaloides: derivados del triptófano y otros alcaloides (III). *Panorama Actual Med*. 2001; 25 (243): 442-449.
86. Jaimes G, De Castro, Ancizar F, Riveros T, Torrenegra R, Téllez A. Principio activo citotóxico de *Espeletia killipii* Cuatr sobre células tumorales y su toxicidad frente a células normales humanas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2006; 16(2): 140-145.
87. Colom Y, Azcue M, Pérez R, Respall M, Ruiz R, Quesada W. Actividad antitumoral de extractos de plantas de la flora cubana frente a la Leucemia Linfocítica P-388. 2005; 10 (2): 85-89.
88. López T. Plantas medicinales para el tratamiento de la hipercolesterolemia. *Fitoterapia*. 2002; 21 (6): 138-144.
89. Villar A, Abad M. Hojas de alcachofa: Indicaciones terapéuticas. *Farmacia Profesional*. 2004; 18 (11): 58-61.

90. Tedesco D, Tava A, Galletti S, Tameni M, Varisco G, Costa A, et al. Effects of Silymarin, a Natural Hepatoprotector, in Periparturient Dairy Cows. American Dairy Science Association. 2004; 87: 2239-2247.
91. Miranda M, Huacuja L, Lorena A, Panduro A. Fitoterapia molecular como parte de la medicina alternativa complementaria en las enfermedades del hígado. Investigación en salud. 2005; VII: 64-70.
92. Rodríguez G, Pérez J, Mc Cook L, Perdomo M, Matos O. Actividad hepatoprotectora de las tinturas de 2 especies vegetales del género *hypericum*. Rev Cubana Med Milit. 2001; 30(4): 241-244.
93. Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. Clin Chem. 1995; 41: 904-907.
94. Taskiran D, Kutay FZ, Sozmen E, Pöğün S. Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defence in rat brain. Neuroreport 1997; 8: 881-884.

ANEXOS

ANEXO 1

1. DETERMINACIÓN DEL MALONDIALDEHIDO

Se utilizó el método de Buege y Aust (1987) modificado, midiendo la producción de malondialdehido que al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) forma un complejo coloreado que se lee a 535 nm.

El procedimiento descrito es colocando en un tubo de ensayo 0,3 mL de suero y 0,6 mL de ácido tricloroacético al 20%. Tapar el tubo y mezclar. Llevar a baño maría hirviente por 30 minutos. Enfriar y añadir 0,9 mL de TBA al 0,67% en HCl 0,25 N, mezclar. Llevar a baño maría hirviente por 30 minutos, enfriar con agua helada y centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos; separar el sobrenadante con ayuda de una pipeta pasteur y leer el sobrenadante en el espectrofotómetro. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ del complejo coloreado formado por el malondialdehido⁽⁵⁰⁾.

2. DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

Los niveles de óxido nítrico se determinaron indirectamente por su conversión en nitritos y nitratos (NO_x), mediante el método de Griess, estandarizado. Las lecturas de absorbancia obtenidas fueron transformadas a concentración plasmática en nmol/mL, de acuerdo a las siguiente correlación: $R^2 = 0,999 \Rightarrow y = 0,044615x$; donde: x = concentración, y = absorbancia.

METODO DE GRIESS: Método de Griess-Espectrofotometría visible a 546 nm.

FUNDAMENTO: El óxido nítrico (NO) es un mensajero fisiológico y regulador molecular en muchos de los sistemas orgánicos como el inmunológico, neuronal y cardiovascular. Uno de los medios para investigar la formación de óxido nítrico, es la determinación de nitrito (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-), metabolitos solubles, los cuales son los dos principales productos finales de degradación del NO, in vivo, siendo los NO_2^- muy estables pues ya no sufren de modificaciones posteriores, que se utilizan como método indirecto para la valoración bioquímica de la producción de esa molécula en extractos de tejidos o en suero^(93, 94). El fundamento de este método descansa en una reacción de diazotización, quien fue descrita por vez primera por Griess en 1879. A través de los años esta técnica ha sufrido varias modificaciones. El reactivo de Griess usa sulfanilamida y dicloruro de N-naftiletildiamina bajo

condiciones ácidas (ácido fosfórico). Este sistema detecta al NO_2^- en una gran variedad de líquidos biológicos y experimentales tales como el plasma, suero y orina, y medios de cultivo celular, teniendo en cuenta que la sensibilidad a los nitritos dependerá básicamente del medio en que ésta se encuentre ^(93, 94).

Reactivo de Griess A: Ácido sulfanílico 1% en ácido fosfórico al 5%.

Reactivo de Griess B: N-1-Naftiletildiamina al 0,1% en agua destilada.

Reactivo de Griess A luego, de un reposo de 5 minutos, se le adiciona el Reactivo de Griess B y se dejó reposar por 10 minutos, hasta formar cromóforos magenta (ver figura), caracterizado por el color grisáceo y finalmente se procedió a la lectura en el espectrofotómetro, se usó una curva de calibración estándar y fue expresado en nmol/mL.

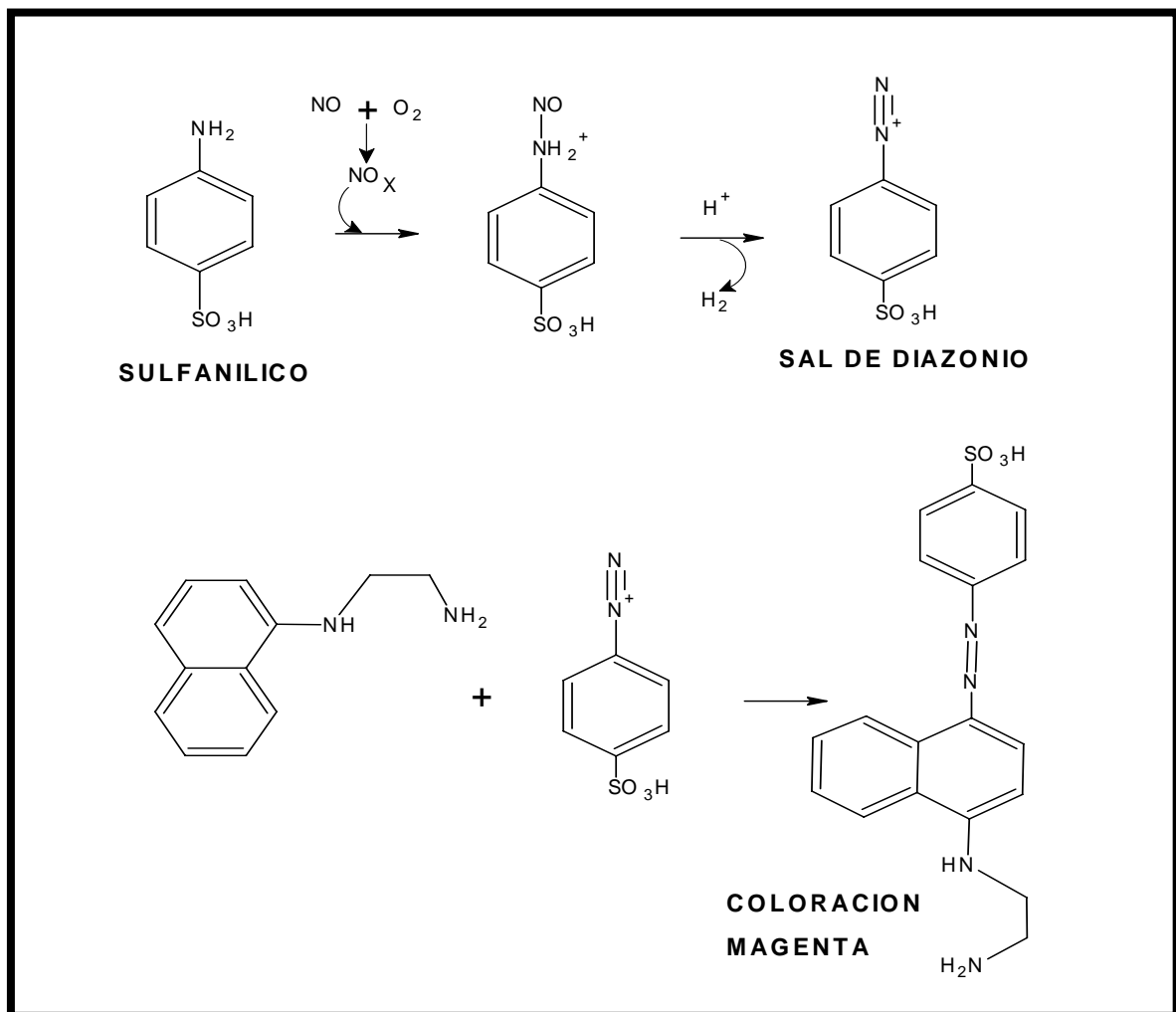


Figura 34. Reacción de Griess.

CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

concentración micromol/L	0	0.8	1.2	1.6	2	3.2
absorbancia	0	0.038	0.059	0.076	0.094	0.14

