Estudio Fitoquímico Farmacológico del Zea mays L. Amilaceae st (maíz morado)

Benjamin Castañeda Castañeda & Lucy Adelina Ibañez & Renán Marique Mejía

Resumen

En el presente trabajo, estudiamos el efecto antiinflamatorio, analgésico, antiulceroso y toxicológico del extracto atomizado de Zea mays L., Amilaceae st, "Maíz morado". Determinamos la Dosis Efectiva Media (DE50), antiinflamatoria media, utilizando modelos del CYTED (Modelo de Sedwick et al, de D'Amour y Smith, de Lee). En la evaluación del efecto antiinflamatorio, antiulceroso y toxicidad sub-crónica, utilizamos 155 ratas albinas cuyos pesos oscilaron entre 200 a 250 g, en ayuno de 12 horas y 86 ratones albinos para el estudio de la acción analgésica y toxicidad aguda. Los animales fueron distribuidos, aleatoriamente, en los diferentes grupos de trabajo.

Para el efecto antiinflamatorio, utilizamos 50 ratas albinas machos distribuidas aleatoriamente en cinco grupos de 10 animales cada uno, de los cuales uno es control negativo (Agua destilada, 3 ml/kg) y otro control positivo (Diclofenaco, 10mg/kg); como agente inflamatorio usamos carragenina al 1 %.. Al evaluar los datos por el Análisis de Varianza se observó resultados significativos siendo $p < 0.0001$.

Para evaluar el efecto antiulceroso seguimos la técnica de Lee (inducción de úlcera gástrica por Indometacina). Utilizamos 50 ratas albinas, de ambos sexos, distribuidas en cinco grupos de 10 animales a los que se administró suero fisiológico, Ranitidina y Maíz morado a las dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg, por vía oral, previo ayuno de 48 horas. Al final del experimento se realizó un estudio macro y microscópico de los estómagos para evaluar la presencia de úlceras.

En la evaluación del efecto analgésico utilizamos 50 ratones albinos y seguimos el método del foco calorífico de D'Amour y Smith (CYTED;1995), utilizando el Algesímetro MODEL 33, TAIL FLICK y ácido Acetil Salicílico como patrón de comparación.

Para evaluar la Dosis Letal Cincuenta (DL50) utilizamos 36 ratones, en ayuno de 12 horas, distribuidos en grupos de 6 animales y dosis crecientes de atomizado de maíz morado. Asimismo, utilizamos la Artemia salina para determinar la Concentración Letal Media (CL50); en ambos casos seguimos el método de los probits.

Nuestros resultados indican que el Maíz morado, estudiado, posee efecto antiinflamatorio y analgésico, dosis dependiente, equiparable a la del Diclofenaco y el ácido Acetil Salicílico respectivamente. A la dosis de 1000 mg/kg posee efecto antiulceroso superior al de la Ranitidina frente a las úlceras inducidas por Indometacina. Según los estudios de toxicidad aguda es prácticamente atóxico y no presentó evidencias de toxicidad subcrónica.

CONCLUSIÓN: El extracto atomizado de Zea mays L., Amilaceae st, "Maíz morado", presenta un buen efecto antiinflamatorio, analgésico, antiulceroso y no es tóxico,

Palabras claves: *Antiinflamatorio, antiulceroso, analgésico, Acido acetil salicílico, Indometacina, Carragenina, Diclofenaco, Zea mays L., Amilaceae st, "Maíz morado",*

Abstract

In this issue, we evaluated the anti-inflammatory, analgesic, toxicological and antiulcer activities of the atomized extract of Zea mays L. Amilaceae st, "Maíz morado". We found the Medium Effective Dose (DE50), using the CYTED models. In this work we used 155 albino rats whose weight ranged between 200 and 250 g, fasted during 12 hours. Besides we used 86 albino mice for evaluate the analgesic and toxicological effect.

In the evaluation of anti-inflammatory effect we used 50 albino male rats, distributed in random manner in 5 groups of 10 animals each one. One group was negative control (S.F 3 ml/kg), other was positive control (Diclofenac 10 mg/kg) and the others received atomized extract of Zea mays in different concentration. As inflammatory agent we used carrageenan to 1 %. The result was statistically significant ($P < 0,001$)

The antiulcer activity was evaluated with the Lee's technique, using 50 albino rats distributed in 5 groups of 10 animals each one in the random manner. The different groups were treated with: Saline solution (SF), Ranitidine and atomized extract of Zea mays to the doses of 250, 500 y 1000 mg/kg. The rats were fasted for 48 hours. At the end of the experiments we checked the gastric mucous to evaluate the gastric ulcers.

The analgesic effect was evaluated in 50 albino mice, using the TAIL FLICH technique, with algesimeter MODEL 33 and Acetil Salicilic acid as pattern of comparison.

The acute toxicity was evaluated in albino mice through the determination of the fifty Lethal Dose (DL50) and in Artemia salina determining the Medium Lethal Concentration (CL50); in both cases we used the Probits method.

According with our results we can concluded that the atomized extract of Zea mays has anti-inflammatory and analgesic effect like the Diclofenac and antiulcer effect like Ranitidine against the ulcerugenic effect of the Indometacin.

Key words: *Anti-inflammatory, analgesic, anti-ulcer activity, Actil Salicilic acid, Indometacin, Carrageenan, Diclofenac, Zea mays L, Amilaceae st. "maíz morado"*

Introducción

Los medicamentos (fármacos), según su origen pueden ser: naturales, semisintéticos o sintéticos, según se obtengan de los productos naturales (plantas, animales o minerales), sin modificación, por modificación parcial de la estructura natural o se sintetice completamente en el laboratorio. Definitivamente los primeros medicamentos fueron de origen natural, siendo las plantas la fuente más importante de los mismos, actualmente un gran número de sustancias empleadas en la medicina moderna incluyen en su formulación principios activos obtenidos de plantas utilizadas en la Medicina tradicional (10,13,16,25,27).

Las plantas y otros materiales naturales con propiedades y virtudes de todo tipo, han sido utilizadas desde la remota antigüedad para combatir la sintomatología producida por las diferentes enfermedades (25,27).

Los antocianos son pigmentos hidrosolubles responsables de las coloraciones: roja, rosa, azul o violeta de las flores y de los frutos, algunas veces de las hojas. De su función biológica y el interés terapéutico ligado a su actividad sobre la permeabilidad y la resistencia de los capilares; los antocianos constituyen colorantes atóxicos, utilizables en la industria del medicamento y del alimento. Los antocianos se encuentran siempre en forma de heterósidos, los antocianósidos, los cuales se consideran factores vitamínicos P y por tanto son utilizados como protectores capilares y venosos. Por otra parte, los antocianósidos inducen un aumento de la regeneración fisiológica del pigmento retiniano. Por electroretinografía se demuestra que aceleran la adaptación de la retina a la visión nocturna (3)

El Maíz morado, fruto sagrado de los Incas, ha sido encontrado en restos arqueológicos de culturas pre-Incas: Mochica, Nazca y Paracas, así como en diferentes lugares de la costa como Caral, apreciándolos reproducidos en cerámicas; esta variedad es cultivada en la Cordillera de los Andes Perú y Bolivia. Es llamado maíz amiláceo cuando el pericarpio, las glumas o brácteas y la tusa o coronta presentan el color morado, debido a la acumulación de pigmentos conocidos como antocianinas (14).

El Maíz morado es una planta con diversas variedades, que derivan de la raza «Kulli», a partir de la cual Hiromitsu, Auki aislaron seis antocianinas, identificadas por Fossen como: **CIANIDINA 3-*O-b*-GLUCÓSIDO**, responsable del 70% del tinte,

PELARGONIDINA (3 moléculas) y

PEONIDINA (2 moléculas) (14,24).

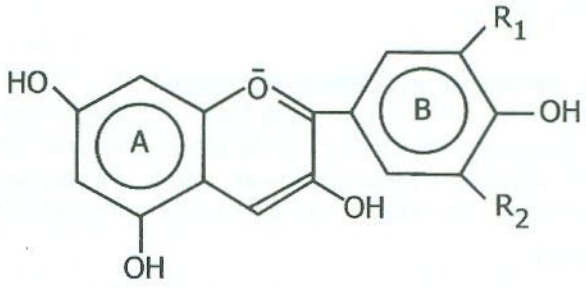
El Perú exporta maíz morado a 13 países de tres continentes, donde es usado etnofarmacologicamente por sus diferentes efectos: Alemania, México, EE.UU. y Vietnam; en China y Turquia, la vaina o cubierta de grano es utilizada para el tratamiento de diarreas y el grano entero en metrorragias; asimismo, es utilizado como antidiabético, hipotensor , digestivo. En Cuba y Haití, las semillas molidas, son utilizadas como cataplasmas para golpes, torceduras y fracturas; en Filipinas para el tratamiento de edemas de las embarazadas; en Taiwán para el tratamiento de la Hepatitis; en Trinidad y Tobago, las semillas son usadas como antidiarreicas, analgésicas antisépticas y diuréticas. En nuestro país, dentro de la medicina tradicional, es utilizado para problemas cardiacos y diuréticos (14). Noboyuki Ito, en Japón, realizó pruebas de laboratorio con ratas, a las cuales les administró una sustancia cancerígena, sintetizada químicamente. Las ratas que durante 32 semanas recibieron alimentación mezclada con el cancerígeno, 17 de 20 (85 %), desarrollaron cáncer del intestino grueso, frente a sólo ocho ratas (40 %) de las que tomaron la antocianina, además del cancerígeno. Según la International Agency for research on Cancer, IARC, la capacidad de las sustancias cancerígenas contenida en las zonas quemadas de los alimentos es suficiente para propiciar cáncer en las personas (15)

Tomoyuki, Shirai y Noboyuki, en el año 2001, han descrito efecto preventivo del maíz morado sobre el desarrollo de cáncer al colon (8); asimismo, se ha estudiado el efecto de las antocianinas sobre la agregación plaquetaria por Fuentes W.L e Iparraguirre H, 2002 (12). El efecto diurético fue estudiado por Lemery en 1712. Shauenberg F en 1972, quien emplea la tintura homeopática como diurético y en el tratamiento de la cistitis. Morton J. F, en 1977 y Sintes Pros J en 1976, realizan estudios para reducir el edema en enfermedades cardíacas.

Sintes Pros, J en 1976, utiliza cataplasma de harina de maíz en enfermedades de vejiga y riñones. Cecchini, T en 1978, describe su utilidad en el tratamiento de la ciática. White, A en 1985, estudia los estilos como diuréticos., Morton, J. F.en 1981 estudia la decocción de tusa tostada para controlar hemorragias menstruales y la decocción del tallo como diurético,

Planter, L en 1989, estudia el cocimiento de raíces, estilos y estigmas frescos o secos, en infecciones genitourinarias: cistitis, prostatitis, retención urinaria y uretritis, De Feo, V en 1992) realiza el estudio de la Tintura de semilla como anti-reumático y para evitar la caida de cabello, Huang, KC en 1993 estudia las propiedades cardiotónicas, colagogas, galactogogas e hipotensoras., Cáceres, A en 1996, en su libro Plantas de uso medicinal en Guatemala, menciona los estilos de maíz, por sus usos en afecciones genitourinarias. Tomoyuki Shirai, profesor de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nagoya

estableció que el pigmento del maíz morado peruano, la Cianidin 3-O-â glucósido, disminuía la carcinogénesis de colon en ratas, inducida por PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazol/ 4,5-b/ piridina); actualmente se han reportado estudios sobre antocianinas las cuales presentan un efecto antioxidante , antimutagénico e hipotensor (14).



R_1	R_2	Anthocyanidin
H	H	Pelargonidin
OH	H	Cyanidin
OH	OH	Delphinidin
OCH_3	H	Paonidin
OCH_3	OH	Petunidin
OCH_3	OCH_3	Malvidin

Figura 1
Antocianinas descubiertas en el Maíz Morado

Retuerto P.F estudió el efecto antimitótico en el 2003, mencionando que el extracto acuoso de *Zea mays* L. al 0.5% causó un descenso del índice mitótico, en forma notable, de 13.1 a 3.6 con 6h de tratamiento, activando los NOR normalmente inactivos (24).

En el presente trabajo, realizamos el estudio fitoquímico del maíz morado peruano, como parte del estudio sistemático de diferentes plantas medicinales, y como paso previo para la evaluación farmacológica, orientada a la validación de los efectos y bondades atribuidas por la

medicina tradicional, conociendo que la mayoría de efectos beneficiosos descritos están a nivel de testimonios y que, por ende, requieren de estudios científicos que validen los conocimientos de la medicina tradicional y que garanticen su seguridad e inocuidad para los diferentes usuarios.

MATERIAL Y MÉTODOS

- ***Zea mays L Amilacea st, «Maíz Morado»***
- ***Ratones (86),*** Mus musculus cepa Balb C53 de ambos sexos de dos meses de edad, de 20 a 25 g de peso corporal, promedio,
- ***Ratas (155)*** albinas consanguíneas cepa Holtzman, de ambos sexos, de 4 meses de edad, con 250g de peso corporal promedio.
- ***Artemia salina***,
- Carragenina, Diclofenaco, Acido Acetil ***salicílico***.
- Peceras rectangulares de vidrio, viales, micropipetas, beackers, erlenmeyer, placas petri, lunas de reloj, fiolas, balanza, tanque de oxígeno pequeño, focos de luz, algas, levadura seca, cloruro de sodio Q.P, Dimetilsulfóxido (DMSO), ***agua*** destilada, balanza analítica, balanza para animales menores, Algesímetro, Campana de Extracción, Estufa, Metanol, Suero fisiológico, Alcohol 96° etílico, Éter, Agua potable, Violeta de genciana, Heparina, Jeringas descartables de 1, 5, 10 y 20 ml, Tubos de ensayo, Embudos, Pipetas, Papel de filtro, Probetas, Cápsulas de porcelana, Frascos ambar boca ancha de vidrio con tapa (4Lt), Gradilla, Mechero, Campana, algodón, Guantes, Cinta adhesiva,

Procedimiento

El extracto seco atomizado de Zea mays L. Amilaceae st fue proporcionada por los Laboratorios Fitofarma. Se pesaron 400g del atomizado que fueron depositados en un recipiente ambar con tapa y se agregaron 4 L de Metanol, procediéndose a la maceración durante 7 días; después de los cuales el extracto metanólico al 10% p/v fue filtrado y evaporado en una campana de extracción a través de un rotavapor y concentrado al vacio hasta la total eliminación del solvente y obtener un residuo seco el cual fue redisuelto en agua bidestilada para llevar a cabo las pruebas farmacológicas : analgésica, antiinflamatoria, antiulcerosa. En el caso de los estudios de Toxicidad Aguda y de Toxicidad subcrónica se realizó la determinación de la Dosis Letal-50 en ratones, la Concentración Letal Media en artemia salina y la toxicidad sub crónica en ratas.

El screening fitoquímico preliminar se realizó de acuerdo al método descrito por Ciulei, adaptada en el Laboratorio del Centro de Investigación de Medicina Tradicional Andina de la FM de la USMP, por ofrecer mayor reproducibilidad y ser de fácil ejecución, permitiendo determinar la presencia de los principales grupos de compuestos químicos, tanto libres como en la forma de glicósidos. Siguiendo el método referido, se extrae la droga seca y molida con éter, utilizando un Soxhlet. El residuo es secado y extraído en el soxhlet con alcohol. Finalmente los principios activos son extraídos con agua, bajo reflujo. Los extractos etéreo, alcohólico y acuoso se sometieron a una secuencia de pruebas químicas de coloración y precipitación para la detección de compuestos orgánicos, a través de los siguientes pasos:

1. Pesar 30 g de extracto atomizado de Zea mays Amilaceas st.
2. Macerar por 48 horas con 90 ml de **éter etílico** a temperatura ambiente.
3. Filtrar.
4. Medir el volumen (mínimo debe obtenerse 30 ml para las pruebas fitoquímicas). Calcular la concentración EXTRACTO I EN ETER ETILICO (EEE).
5. Secar y pesar el residuo sólido obtenido de la extracción con éter etílico.
6. Extraer con tres veces el peso del residuo en volumen con **etanol** por maceración durante 48 horas.
7. Filtrar
8. Medir el volumen obtenido de la extracción y calcular la concentración. EXTRACTO II EN ALCOHOL ETILICO (EE). Mínimo se requiere 27 ml.
9. Secar, pesar el residuo sólido extraído con alcohol.
10. Extraer con 3 veces el peso del residuo sólido en volumen con **agua destilada** por maceración durante 48 horas.
11. Filtrar
12. Medir el volumen y calcular la concentración EXTRACTO III EN AGUA DESTILADA (EA).
13. Secar, pesar y desechar el residuo sólido.

EXTRACTOS	COMPUESTOS	ENSAYOS	RESULTADO
EEE 1	Grasas y Aceites		
	TEEE 1	Ensayo de Sudán	Positivo
EEE 2	Alcaloides		
	TEEE 2	Dragendorff	Precipitado Naranja (+++)
	TEEE 3	Mayer	Turbidez Definida (++)
	TEEE 4	Wagner	Amarillo coposo (+++)
EEE 3	Lactonas y Coumarinas		
	TEEE 5	Ensayo de Baljet	Aparicion de Coloracion (++)
EEE 4	Tripterpenos y/o Esteriodes		
	TEEE 6	Ensayo de Lieberman - Buchard	Negativo
EAE 5	Catequinas		
	TEAE 7	Ensayo de Catequinas	Positivo
EAE 6	Resinas		
	TEAE 8	Ensayo de Resinas	Positivo
EAE 7	Azucares Reductores		
	TEAE 9	Ensayo de Fehling	Positivo
EAE 8	Tripterpenos y/o Esteriodes		
	TEAE 10	Ensayo de Lieberman - Buchard	Negativo
EAE 9	Saponinas (de tipo esteroidal y triterpenoide)		
	TEAE 11	Ensayo de espuma	Negativo
EAE 10	Fenoles y Taninos		
	TEAE 12	Ensayo de Cloruro	Positivo
		Férrico	
EAE 11	Aminoacidos Libres o de Aminas		
	TEAE 13	Reactivo de Ninhidrina al 2% en agua	Negativo.
EAE 12	Quinonas		
	TEAE 14	Borntrager	Negativo
EAE 13	Flavonoides		
	TEAE 15	Shinoda	Positivo
EAE 14	Cardenolidos (Glicósidos Cardiotónos)		
	TEAE 16	Ensayo de Kedde	xxxxxxx
EAE 15	Antocianidina. Estructura C6-C3-C6 Flavonoides		
	TEAE 17	Ensayo de Antocianidina	Positivo
EAE 16	Alcaloides		
	TEAE 18	Dragendorff	Precipitado Naranja (+++)
	TEAE 19	Mayer	Turbidez Definida (++)
	TEAE 20	Popoff	Negativo
EAD 17	Azucares Reductores		
	TEAD 21	Fehling	Negativo

EXTRACTOS	COMPUESTOS	ENSAYOS	RESULTADO
EAD 18	Saponinas		
	TEAD 22	Ensayo de espuma	Positivo
EAD 19	Fenoles y Taninos		
	TEAD 23	Cloruro Férrico	Negativo
EAD 20	Principios Amargos		
	TEAD 24	Saborear una gota del extracto acuoso	Positivo
EAD 21	Flavonoides		
	TEAD 25	Shinoda	Positivo
EAD 22	Mucilagos		
	TEAD 26	Ensayo de Mucílagos	Positivo
EAD 23	Alcaloides		
	TEAD 27	Dragendoff	Negativo
	TEAD 28	Mayer	Negativo
	TEAD 29	Wargner	Negativo

Evaluación de la actividad antiinflamatoria (DE50).

Utilizamos 50 ratas albinas machos distribuidas, aleatoriamente, en cinco grupos de 10 animales cada uno: I, Control Negativo (Agua destilada, 3 ml/kg); II, Control positivo (Diclofenaco, 10mg/kg); a los grupos III, IV y V se les administró extracto atomizado de Maíz morado a las dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg de peso respectivamente, por vía oral, 30 minutos antes de inyectar la carragenina en la bolsada aire en el lomo de la rata. Los animales fueron anestesiados en atmósfera de éter y se rasuró la zona dorsal, desinfectando la zona y procediendo luego a la inyección subcutánea de 20 ml de aire, formando una bolsa de aire en el dorso del animal en la cual se inyecta 2 ml del agente irritante: carragenina al 1% en solución salina; el exudado de la bolsa serosa fue extraído con una jeringa, 6 horas después de la administración del atomizado, realizándose el recuento leucocitario en una cámara de Neubauer, así como la determinación de proteínas totales por el método colorimétrico de Gornall utilizando reactivo de Biuret y un patrón de proteìna de 70 g/L . Para la preparación de las soluciones del extracto metanólico se disolvieron 10g en 20 ml de agua bidestilada obteniéndose una concentración de 500mg/ml. Los resultados fueron procesados estadísticamente. La estimación de la Dosis Efectiva Media (DE50) se realizó mediante el método de los Probits.

Evaluación de la actividad antiulcerosa.

Para evaluar el efecto antiulceroso se utilizó la Técnica de Lee, consistente en la producción de úlcera gástrica inducida por Indometacina. Para esto se trabajó con 50 ratas albinas de ambos sexos,

las cuales fueron distribuidas, aleatoriamente, en cinco grupos de 10 animales a las que se administró suero fisiolófico, Ranitidina y maíz morado a la dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg, por vía oral, previo ayuno de 48 horas. Transcurridos treinta minutos de la administración de Indometacina a la dosis de 75 mg/kg, se administraron las diferentes sustancias a cada grupo; después de 5 horas de la administración de Indometacina, los animales fueron sacrificados y se les extrajo el estómago y se realizó la evaluación macro y microscópica para cuantificar las úlceras.

Evaluación de la actividad analgesica.

Para evaluar la actividad analgésica se siguió el método del foco calorífico de D'Amour y Smith (CYTED;1995) (8,9), utilizando el Algesímetro MODEL 33, TAIL FLICK empleando 50 ratones albinos distribuidos en 5 grupos: : I, Control Negativo (Agua destilada, 3 ml/kg); II, Control positivo (Acido Acetil Salicilico, 100mg/kg); a los grupos III, IV y V se les administró por vìa oral el extracto atomizado de Maíz morado a las dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg de peso respectivamente y se realizó la evaluación a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de las sustancias.

Evaluación de la Dosis Letal Media (DL50):

Se utilizaron 36 ratones albinos procedentes del Instituto de Salud los cuales fueron mantenidos a una temperatura de 20+_2° C con un ciclo de luz/oscuridad. La alimentación consistió en alimento balanceado y agua a voluntad. Se formaron grupos de seis animales cada uno y fueron mantenidos en ayuno durante 12 horas. Las diferentes dosis del extracto metanólico se administraron por vía oral mediante cánula intragástrica y los animales fueron observados a las 24h, 48h y 72h, para determinar la mortalidad. El valor de la DL50 se estimó mediante el método estadístico de los Probits.

Evaluaciòn de la actividad citotóxica en Artemia salina; según Anderson, Meyer, Thompson (CYTED 1995) (8,9).

Este ensayo permite una rápida evaluación y observar su correlación con otras pruebas biológicas, permitiendo percibir sustancias con alta bioactividad, el procedimiento seguido fue:

Dia 1

a) Se preparó agua de mar (3.8 g de sal de mar comercial en 100ml de agua destilada). Se filtró.

b) Se colocaron 50 mg de huevos de *Artemia salina* en un erlenmeyer con 350 ml de agua de mar. Se les colocó en un lugar con luz artificial o natural y con una bomba de oxígeno con burbujeo lento.

Día 2

a) Se transfirieron la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con agua fresca

b) Se pesaron 20 mg de *Calophylum brasiliense*.

Día 3

a) Se disolvieron 20 mg de la muestra en 2 ml de disolvente, 0.5 ml de DMSO y 1.5 ml de agua destilada (lo que hizo un total de 2 mL). A partir de esta solución, se prepararon diluciones de 1000, 100 y 10 ppm transfiriendo a cada vial 500, 50, y 5 ul respectivamente. Siendo 3 viales por cada concentración (9 en total). Se hizo un control por muestra. Como la muestra fue apolar se le agregó al control 50ul de DMSO.

b) Los nauplios estuvieron listos para el ensayo.

A cada vial se le agregaron 10 nauplios (30 nauplios por dilución) y el extracto a la dilución requerida. Luego, se agregó agua de mar hasta completar 5 mL por vial. A cada vial se le agregó además, una gota de suspensión de levadura (3 mg de levadura seca se disuelven en 5 mL de agua de mar como alimento).

Día 4

a) Después de 24 horas, se contó y anotó el número de sobrevivientes en cada dilución.

b) Se analizaron los datos con el método de Probits para determinar valores CL_{50}.

Evaluación de la Toxicidad Subcrónica (técnica de Solomon et al, modificada 1993, vía oral intragástrica , por 30 días).

Utilizamos 55 ratas machos, cuyos pesos oscilaron entre 150 y 200g, de 6 a 8 semanas de edad, procedentes de la Universidad Agraria la Molina a los cuales se les administró, vía oral en dosis única: 100, 250 y 500 mg/kg de extracto atomizado y del cocimiento de maíz morado, durante 4 semanas. Los animales fueron adaptados al bioterio de la Facultad de Medicina Humana durante 4 días, proporcionándoles

alimentación balanceada y agua a voluntad, formándose 5 grupos de 10 ratas cada uno: Grupo 1, Control al que se le administró por 30 días suero fisiológico(3ml/Kg), Grupo 2 , Cocimiento acuoso del extracto atomizado a la dosis de 250 mg/kg, Grupo 3 , extracto atomizado a la dosis de 100 mg/Kg, Grupo 4, Extracto atomizado a la dosis de 250 mg/ kg, Grupo 5, Extracto metanólico a la dosis de 500 mg/ Kg de peso y se formo un grupo adicional de 5 ratas para reemplazo. Al inicio y al final del experimento se realizó la observación respectiva para evaluar respuestas fisiológicas de conducta y otras. El peso corporal fue registrado semanalmente. Después de 24 horas de la última administración, los animales fueron anestesiados con éter etílico y las muestras de sangre fueron colectadas por punción cardiaca en tubos de centrífuga heparinizados y no heparinizados, secos. La sangre heparinizada fue usada para el recuento total de glóbulos rojos, blancos y recuento diferencial de leucocitos y estimación de hemoglobina. La sangre no heparinizada se dejo coagular, luego se centrífugo para separar el suero. En el suero se evaluaron los valores de fosfatasa alcalina, alanino transaminasa(T.G.P) y aspartato transaminasa (T.G.O), colesterol, triglicéridos, urea y creatinina. Inmediatamente después de recoger las muestras de sangre los animales fueron sacrificados extrayéndoles el hígado, corazón, páncreas, estómago y riñones, los cuales fueron lavados y colocados en formol para realizar los estudios patológicos correspondientes.

Para llevar a cabo las pruebas bioquímicas se utilizó el analizador Vitalab Selectra 2, utilizando los siguientes métodos para la determinación de:

Fosfatasa alcalina: Método Cinético DGKC

T.G.P: Método UV IFCC

T:G:O Método UV IFCC

Colesterol Total: Método GPO-PAP

Urea: Método Cinético UV

Creatinina: Método Cinético Jaffe

Proteina Total: Método Colorimétrico Biuret

Albúmina: Método colorimétrico BCG

Lactato Deshidrogenasa: Método UV optimizado (DGKC).

Para las pruebas hematológicas se utilizó el analizador Celldyn 1700

Hemoglobina: Cianometahemoglobina modificado

Recuento de Leucocitos: Impedancia electrica.

RESULTADOS:

Estudio Fitoquímico:

En el screening fitoquímico del Zea mays (maíz morado), encontramos:

En el extracto clorofórmico, la presencia mayor de alcaloides, cumarinas y esteroides, seguido de glucósidos.

En el extracto metanólico, la presencia de cumarinas, seguido de alcaloides.

En el extracto etanólico, la presencia mayor es de: cumarinas, seguido de esteroides y glucósidos; en menor cantidad: alcaloides, azúcares y oximas.

En el extracto acuoso, la presencia mayor es de: cumarinas, esteroides y azúcares, seguido de alcaloides, glicósidos y oximas. Apreciamos la presencia de mayor número de principios activos en el extracto acuoso (tabla Nº 1)

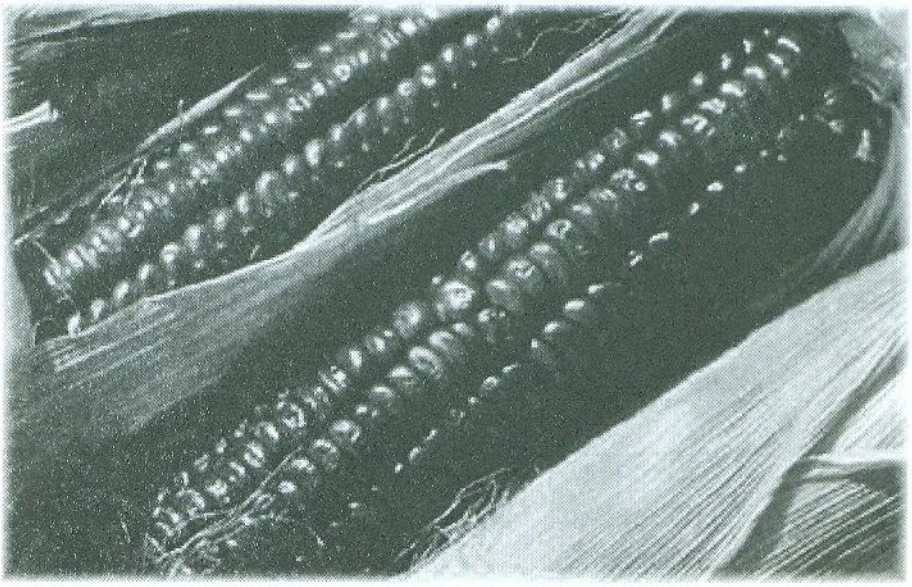


Figura 1
Maíz Morado

Tabla 1
Evaluación Fitoquímica *del ext. met. de Zea mays L Amilacea st, «Maíz Morado»*

PRINCIPIOS ACTIVOS	EXTRACTO CLOROFÓRMICO	EXTRACTO METANÓLICO	EXTRACTO ETANÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Alcaloides	+++	++	+	++
Cumarinas	+++	+++	+++	+++
Glicósidos	++		++	++
Esteroides	+++		++	+++
Azúcares			+	+++
Oximas		+++	+	++
Taninos				++

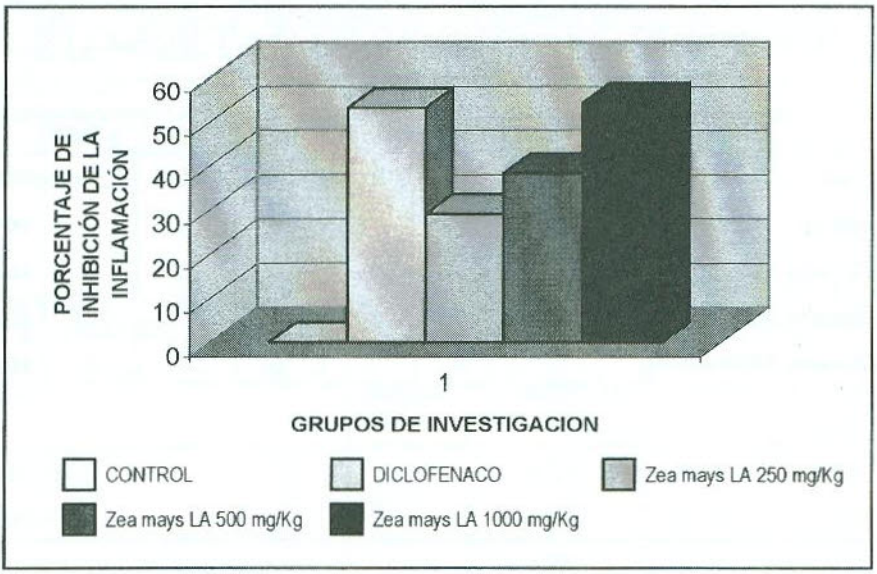
Efecto antiinflamatorio

Se observó que el extracto atomizado presentó un efecto inhibidor de la inflamación, dosis dependiente, comparable al presentado por Diclofenaco (53.02%), obteniéndose el 28.95, 38.21 y 54.15% para las diferentes dosis ensayadas. Al evaluar los datos por el Análisis de Varianza se observó resultados significativos siendo $p < 0.0001$, como podemos apreciar en las tablas Nº 1y 2 y las gráficas Nº 1y 2

Tabla 2
EVALUACIÓN ANTIINFLAMATORIA

GRUPO DE INVESTIGACIÓN	RECUENTO LEUCOCITARIO mm3	PROTEÍNAS g/dl	%INHIBICION DELA INFLAMACIÓN
Diclofenaco	11556	0.76	53.02
Ext.Met.Maíz M. 250 mg/kg	17476	1.08	28.95
Ext.Met.Maíz M. 500 mg/kg	15200	0.98	38.21
Ext.Met.Maíz M. 1000 mg/kg	11278	0.84	54.15

Figura N° 2
EVALUACIÓN ANTIINFLAMATORIA de Zea mays L. Amilaceae
(% de Inhibición inflamatoria, por grupos)



Efecto antiulceroso

Observamos un efecto gastroprotector, dosis dependiente, del Zea mays, superior al de la Ranitidina que fue del 60 %, en tanto que con el maíz morado fue del 10, 50 y 100%, con las tres dosis evaluadas, respectivamente, evidenciándose la efectividad del maíz morado como protector de la mucosa gástrica en comparación con la Ranitidina. Tablas Nº 3, 4 y gráficas Nº 2, 3.

Tabla 3
EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DE LA MUCOSA GÁSTRICA SEGÚN GRADO DE COMPROMISO DEL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae

	Nº de Animales	Normal	Leve	Moderado	Severo	Muy severo
Control	10	0	0	1	4	5
Ranitidina	10	0	5	2	2	1
Maíz Morado 250 mg/Kg	10	0	0	8	1	1
Maíz Morado 500 mg/Kg	10	0	1	6	2	1
Maíz Morado 1000 mg/Kg	9	9	0	0	0	0

Tabla 4
NUMERO DE LESIONES GÁSTRICAS SEGÚN TAMAÑO BAJO TRATAMIENTO CON EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae

	-1mm	*1mm*	*2mm*	*3mm*	*5mm*	*+5mm*	
Control	10	20	30	10	20	10	**100 %**
Ranitidina	60	20	10	0	10	0	**100 %**
M. Morado 250 mg/Kg	10	90	0	0	0	0	**100 %**
M. Morado 500 Mg/Kg	0	0	30	20	10	40	**100 %**
M. Morado 1000 mg/Kg	100	0	0	0	0	0	**100 %**

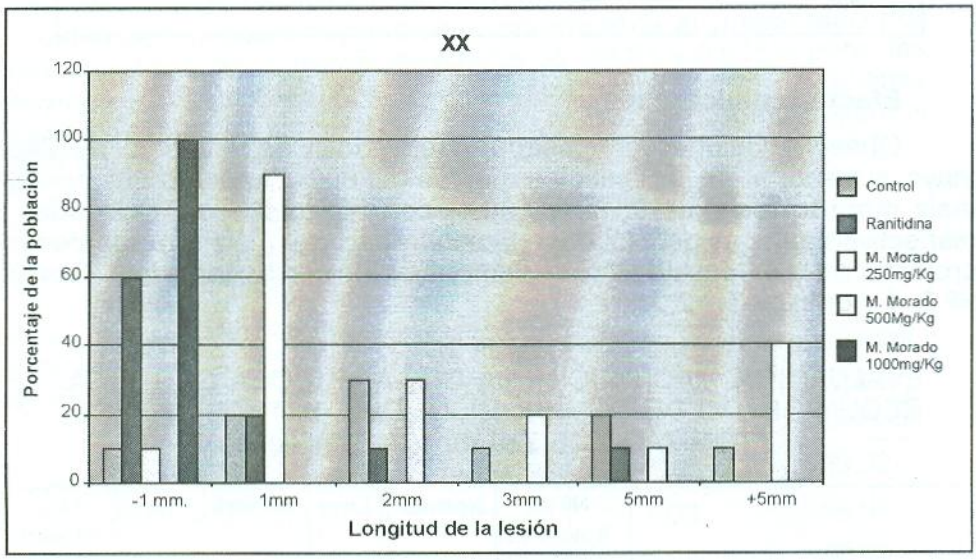


Figura 3
LESIONES GÁSTRICAS SEGÚN TAMAÑO Y TRATAMIENTO CON EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae

Efecto analgésico

En el grupo control positivo, con ácido Acetil Salicílico, observamos una elevación del umbral doloroso del 17% y 100% a la media hora y a la hora respectivamente; la elevación del umbral doloroso por acción del extracto atomizado a la dosis de 250 mg/Kg fue de 7.14 a la media hora y 78.85% a la hora, a la dosis de 500 mg/kg la elevación fue de 44.57% a la media hora y 102.28% a la hora, con la dosis de 1000 mg/kg el umbral del dolor se elevó en 49.14 a la media hora, superior a la elevación producida por el ácido Acetil Salicílico (17%) .

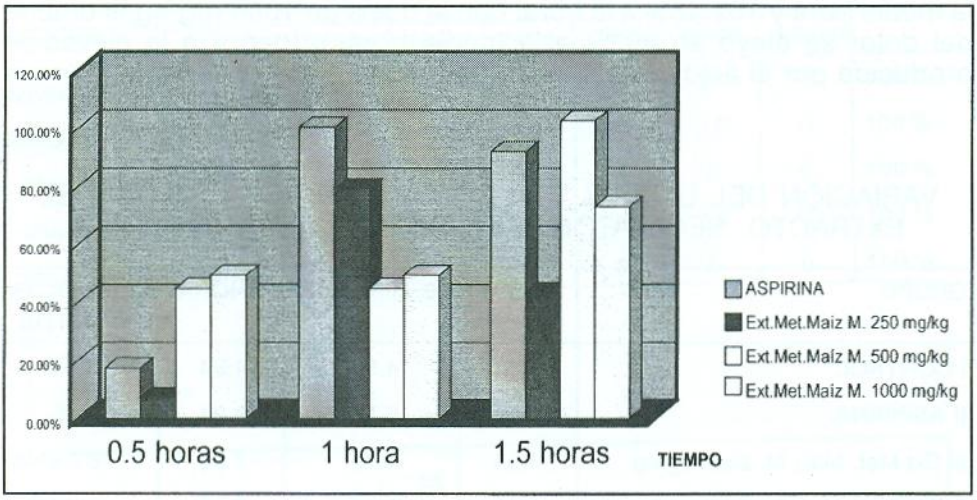
Tabla 5
VARIACIÓN DEL UMBRAL DEL DOLOR CON POR EFECTO DEL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae

GRUPO	BASAL	30 MINUTOS	1 HORA	1 HORA 30 MINUTOS
I CONTROL	4.54	4.54	4.54	4.54
II ASPIRINA	4.54	5.14	8.04	7.75
III Ext.Met. Maíz M. 250 mg/kg	4.54	4.79	7.30	6.05
IV Ext.Met. Maíz M. 500 mg/kg	4.63	6.10	6.10	8.12
V Ext.Met. Maíz M. 1000 mg/kg	4.54	6,26	6.26	7.095

Tabla 6
PORCENTAJE DE INCREMENTO DEL DOLOR CON RESPECTO AL TIEMPO POR EFECTO DEL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae

GRUPO	30 MINUTOS	1 HORA	1 HORA 30 MINUTOS
II ASPIRINA	17.14%	100%	91.71%
III Ext.Met. Maíz M. 250 mg/kg	7.14%	78.85%	43.14%
IV Ext.Met. Maíz M. 500 mg/kg	44.57%	44.57%	102.28%
V Ext.Met. Maíz M. 1000 mg/kg	49.14%	49.14%	72.85%

Figura 4
VARIACIÓN DEL UMBRAL DOLOROSO POR EFECTO DEL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae, POR GRUPOS



Citotoxicidad, toxicidad aguda y subcrónica

Estudio toxicológico:

Los resultados obtenidos por medio del bioensayo en ***Artemia salina*** presentaron una CL50 (Concentración Letal Media) = 202.50 ppm, con un limite inferior y superior, al 95%, de 149.37 y 249.89ppm, respectivamente, según el método de los Probits. El valor de la DL50 fue de 4,678.665 mg/kg de peso con un límite de confianza inferior y superior, al 95%, de: 4,333.595 y 5,064.50, de acuerdo al Método de Lichfield y Wilcoxon, observándose sedación, caída del tren posterior, ojos cerrados y respiración acelerada. Según los criterios de Williams, este extracto se ubica dentro de clasificación de atóxico. Los resultados del estudio de la toxicidad sub crónica, realizado en 55 ratas machos, a las dosis de 100, 250 y 500 mg/Kg por espacio de 4 semanas, mostraron que el extracto atomizado, no es tóxico a las dosis utilizadas.

Figura 5
CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL50) DEL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae EN EL BIOENSAYO EN ARTEMIA SALINA

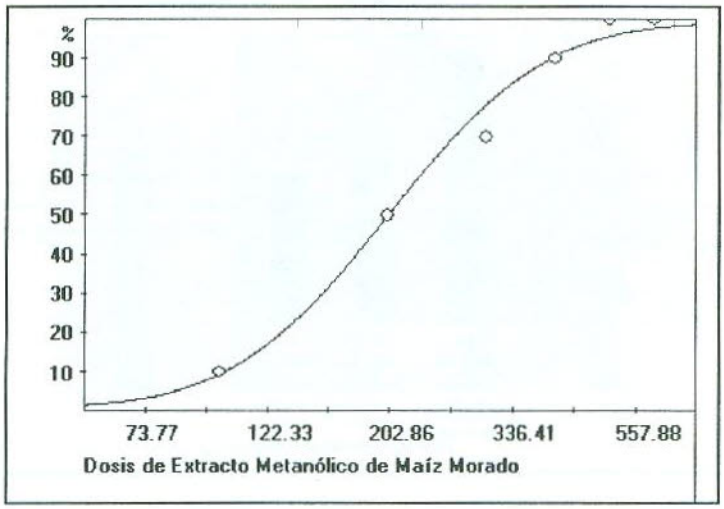


Figura 6
DOSIS LETAL MEDIA (DL50) DEL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae EN RATONES EN ADMINISTRACION UNICA

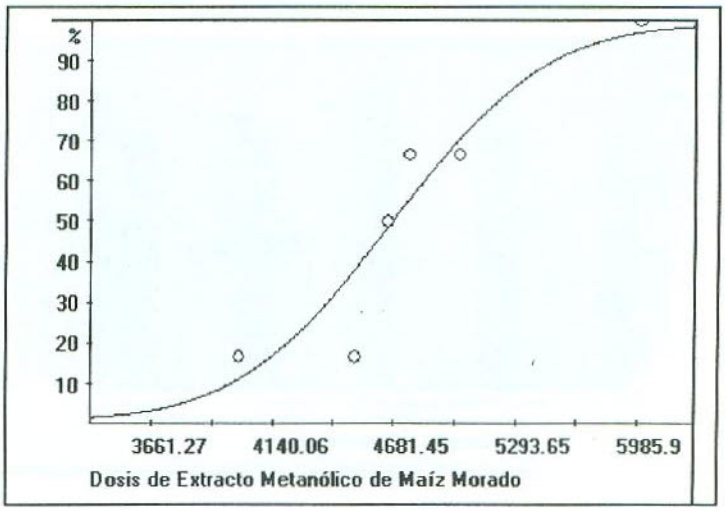


Figura 7

T.G.O DESPUÉS DE 4 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON EL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae EN RATAS, SEGÚN GRUPOS

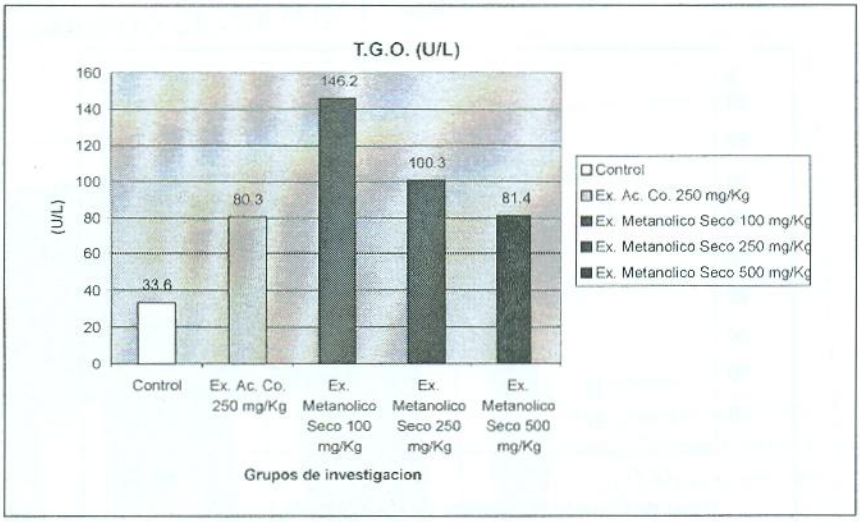


Figura 8

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE T.G.O AL CABO DE 4 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON EL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae EN RATAS

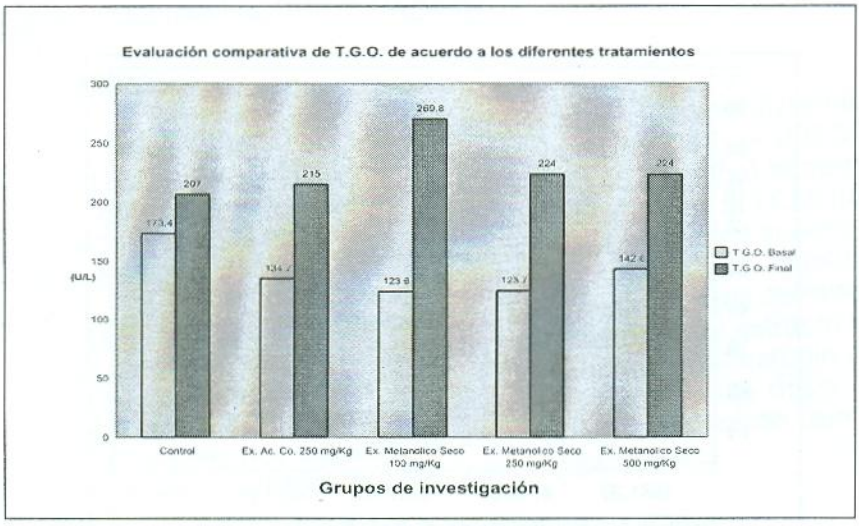


Figura 9
T.G.P AL CABO DE 4 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON EL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae EN RATAS, SEGÚN GRUPOS

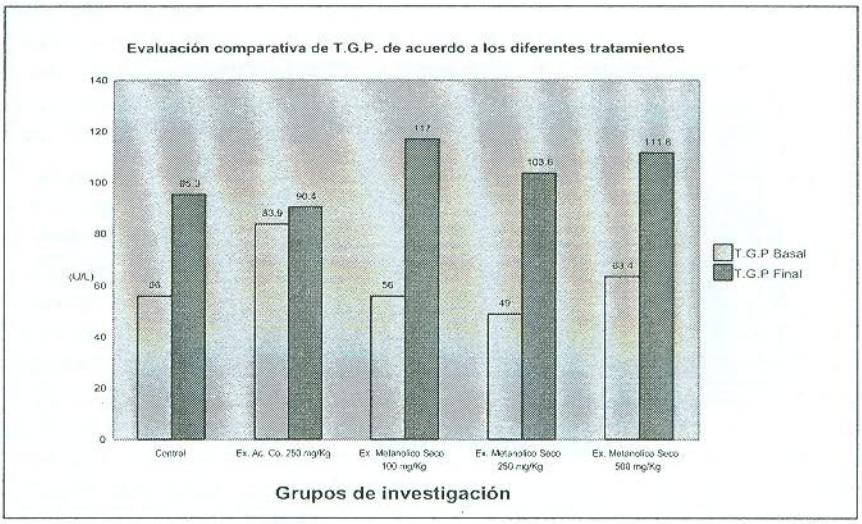


Figura 10
VARIACIÓN DE LA UREA AL CABO DE 4 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON EL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae EN RATAS, POR GRUPOS

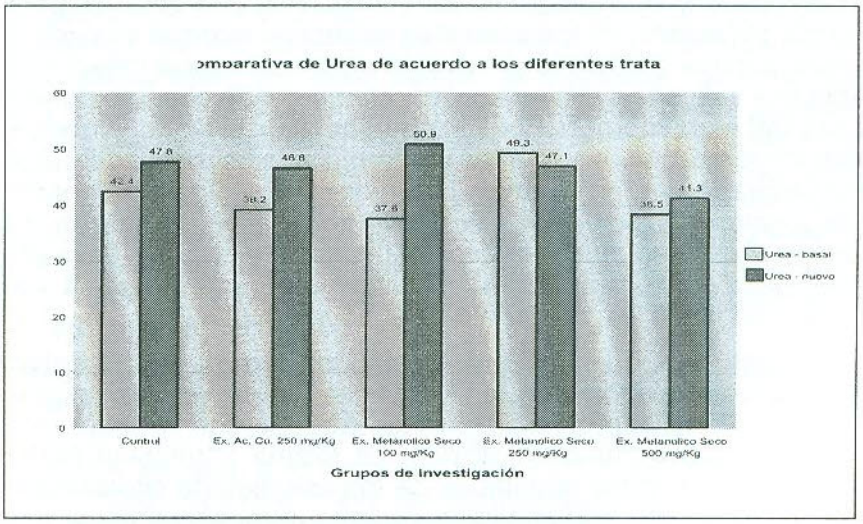
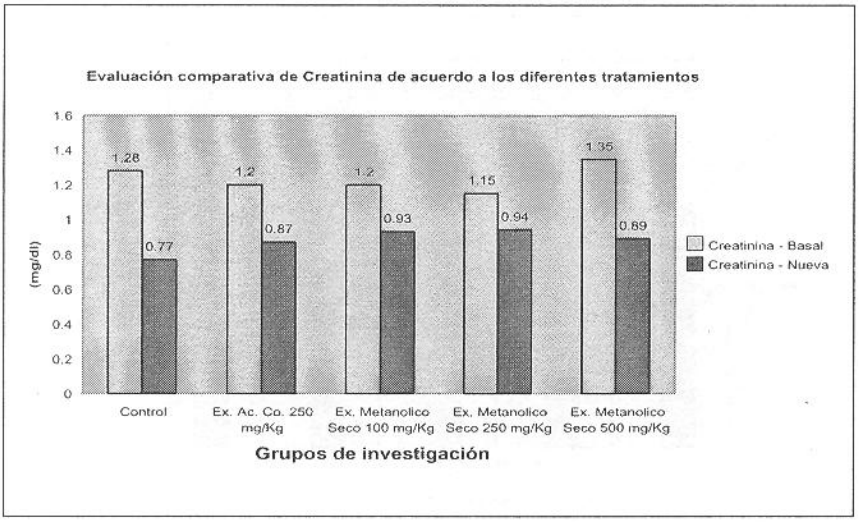


Figura 11
VARIACIÓN DE LA CREATININA AL CABO DE 4 SEMANAS DE TRATAMIENTO CON EL EXTRACTO SECO ATOMIZADO DE Zea mays L. Amilaceae EN RATAS, POR GRUPOS



DISCUSION.

Del estudio fitoquímico realizado del maíz morado peruano **Zea mays L. Amilaceae st.**colegimos que los principios activos varían en los diferentes extractos, tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo, siendo las cumarinas las más constantes, presentes en los cuatro extractos y en cantidades parecidas. Por otro lado, el principio activo más constante, en los diferentes extractos, aunque en cantidades diferentes, son los alcaloides y el extracto que contiene el mayor número de principios activos es el acuoso; importante desde el punto de vista de consumo del maíz morado, pues el agua es el disolvente utilizado en la preparación de todos los alimentos y la forma más frecuente del consumo del maíz morado, en forma de chicha morada. Igualmente el hecho de que las cumarinas sean los principios activos presentes en mayor proporción y en todos los extractos estudiados, abre un nuevo campo de investigación del maíz morado, puesto que las cumarinas son de amplio uso en la clínica por su efecto anticoagulante (13)

Los estudios de toxicidad aguda del Zea mays L., realizados mediante la determinación de la Dosis Leta-50, en ratones y siguiendo los criterios de Williams, nos permiten afirmar que el maíz morado estudiado es, prácticamente, atóxico. La misma afirmación podemos sostener observando los resultados de los estudios de citotoxicidad en Artemia Salina. Como en estudios anteriores apreciamos la correlación

entre la determinación de la DL50, en ratones y la determinación de la CL50 en artemia salina, demostrando que este último es práctico y de fácil realización.(4)

En los estudios de toxicidad subcrónica, el extracto atomizado de Zea mays Amilaceae st, no produjo alteración de los diferentes parámetros evaluados y no produjo alteración de la función de hígado y riñones, como podemos colegir de los valores de enzimas hepáticas y los de urea y creatinina evaluados antes y después de 30 días de tratamiento con Zea Mays.Otros autores han obtenido resultados parecidos (1)

Al evaluar la acción antiinflamatoria del Zea mays (maíz morado), frente a la inflamación ocasionada por la carragenina, encontramos que posee un efecto antiinflamatorio, dosis dependiente, y que a la dosis de 1000 mg/kg de peso es equiparable al efecto antinflamatorio del diclofenaco, un AINE de eficacia comprobada y ampliamente utilizado en la terapéutica médica. Como sucede con otras plantas con acción antiinflamatoria, éstas presentan una enorme ventaja sobre los AINEs, al no producir lesión de la mucosa gástrica y más bien protejen a ésta de las lesiones producidas por la Indometacina. Creemos que este aspecto debe ser aún investigado a fin de poder dilucidar el posible mecanismo de la acción antiinflamatoria. Es posible que a través de las antocianinas estabilicen las membranas celulares, disminuyendo o inhibiendo la liberación de los mediadores del fenómeno inflamatorio (4,5).

En relación a la acción analgésica mostrada por el extracto atomizado del Zea mays (maíz morado), según nuestros resultados, es equiparable al primigenio de los AINEs, la Aspirina (Ac. Acetil salicílico), tal como sucede con la acción antiinflamatoria, es dosis dependiente y se ejerce a menor dosis; es decir, la dosis analgésica del Zea mays es menor que la dosis antiinflamatoria, en forma semejante a lo que sucede con la Aspirina. No nos llama la atención que plantas que posean acción antiinflamatoria, sean, al mismo tiempo, analgésicos, toda vez que los mediadores del dolor y la inflamación son, prácticamente los mismos. (13,27). Se requiere, igualmente, de mayor investigación para dilucidar el nivel de acción analgésica (central, periférica o ambos). Algunos trabajos de investigación han demostrado que la inyección facial de carragenina, incrementa la captación de GABA en el cerebro de rata y que induce plasticidad que conlleva a un efecto inhibitorio de la galanina, correlacionado con aumento de los niveles de m-RNA de galanina en el asta dorsal de la médula (6,26).

Una acción novedosa, no descrita anteriormente, lo constituye la actividad antiulcerosa del Zea mays, frente a la inducción de úlceras gástricas por la Indometacina. Esta acción se aparta del patrón de acción de los AINEs, los que, más bien, lesionan la mucosa gástrica. El efecto gastroprotector del Zea mays es equiparable al de la Ranitidina, antihistamínico H2, ampliamente utilizado en el tratamiento de la

enfermedad ulceropéptica y cuyo mecanismo es bloquear a la histamina a nivel de uno de los tipos de sus receptores (H2).

Como colofón del estudio realizado, podemos sostener que el Zea mays (maíz morado peruano), posee acción analgésica y antiinflamatoria equiparable a los AINEs, pero que presentan una ventaja muy importante, sobre éstos, al no !esionar la mucosa gástrica y, por el contrario, protegerla de las lesiones inducidas por la Indometacina, precisamente un AINE tipo en la investigación. Como no basta demostrar la eficacia de un fármaco para ser utilizado como medicamento, sino demostrar su seguridad o inocuidad, el Zea mays, en los estudios sobre toxicidad aguda y subcrónica ha demostrado que es, prácticamente, atóxico, lo que valida el amplio uso del maíz morado en muchos países del mundo.

CONCLUSIONES

Del estudio realizado, en animales de experimentación, podemos concluir que el Extracto Atomizado de Zea mays L. Amilaceae st. :

1.- Posee actividad antiinflamatoria equiparable a la del Diclofenaco.

2.- Presenta actividad analgésica equiparable al de Ácido Acetil Salicílico (Aspirina)

3.- Carece de efectos gastrolesivos y protege a la mucosa gástrica de las lesiones inducidas por Indometacina, en magnitud semejante a como lo hace la Ranitidina

4.- Es, prácticamente, atóxico

Agradecimientos: A los alumnos que participaron en los diferentes grupos de investigación, relacionados con maíz morado, en la cátedra de Farmacología

Referencias Bibliográficas

Acosta E. D, Cervera C. L, Contreras A V, Cruzado VL, Gastelumendi V.J, Icochea M y col, (2002). *Toxicidad Subcrónica del Atomizado de Zea mays L, «Maiz morado» en ratas*. Libro de Resúmenes del V Congreso Mundial de Medicina Tradicional. 2005. Pag. 120.

Alvarez, A y col. *Gastric antisecretory and antiulcer activities of the ethanolic extract of Bidens pilosa* L Var. radiate Schult. Bip. Journal of Ethnopharmacology 1999; 67: 333-340

Bruneton J. 1991. *Elementos de Fitoquìmica y Farmacognosia*. Editorial Acribia. S.A Zaragoza España.

Castañeda, B y col. *Evalución del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las semillas del Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi, Chocho) en animales de experimentación*. Horizonte Médico USMP, 2002 : 35-47

Castañeda, B y col. *Evaluación del efecto antiulceroso del extracto acuoso y metanólico de las semillas del Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi, Chocho) en ratas albinas*. V Congreso Nacional y III Congreso Internacional de Farmacología- Lima, Perú, 2003

Chee-Hong Ng, Wei-Yi Ong. *Increased Synaptosomal (3H) GABA uptake in the rat brainsterm after facial carrageenan injections*. PAIN vol 98 (3) August 2002 : 259-268

Ciulei, I. (1982). *Metodología D'Analyse des Produit Vegetaux*. Mimeografadoi Facultade de Farmacia,Bucareste.Brasil.

CYTED (1995). *Manual de Técnicas de Investigación*. (Págs 44, 48, 52, 91, 100,140.)

CYTED. RIVAPLAMED. *Métodos Farmacológicos para una validación de Plantas Medicinales.*

Desmarchelier C - Witting SF(2000). *Setenta Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana*. Ecología Etnomedicina y Bioactividad. ISBN 9972-9186-0-2

Fernández F.N.A.1995. *Estudio de la extracción y prepurificación de antocianinas de Maíz morado*. UNALM.

Fuentes N.W, Iparraguirre L. H (2005). *Efecto del refresco de Maíz Morado y vino Tinto en la agregación plaquetaria en personas sanas*. Libro de resúmenes del V Congreso Mundial de Medicina tradicional. Lima-Perú.

Goodman & Gilman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Décima Edición. Editorial Panamericana, 2003

Gorriti, A 2003. Facultad de Farmacia y Bioquímica.UNMSM. Audiencia Pública: maíz morado. Audiencia Pública.

Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, Sano M, Tamaro S, Kadola T, y col. 2001 *Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2 amino-1-methyl-6- phenylimidazo* /4,5-b/ pyridine(PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. Cancer Letters 171: 17-25.

Ibáñez V. L. (2003). *Importancia de la Investigación Cientìfica en Plantas. Rev. Folium* Año XII, Nùmero 34. Pàg 5. México

Ibáñez V.L (2003) *Caracterización química y efecto antiinflamatorio del extracto metanòlico de las hojas de Pelargonium robertianum L, Geranio, en Mus musculus.* Revista Ciencia e Investigación VI(2),15-

23 Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. ISSN 1561-0861.

Kalt W, Mc Donald JE, Donner H. 2000. *Anthocyanins , phenolics and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products*. J. Food Sci 65(3): 390-393.

Mazza G, Minati E 1993. *Anthocyanins in fruits, vegetables and grains*. Boca Raton FL CRC Press.

Ortiz M, Ramirez C, Ramon R, Ramos A, Ramos F, Reyes J, Riega K, Rivera E, y col *Evaluación del efecto antiinflamatorio y anlagésico del extracto seco atomizado del Zea mays L Amilacea , Maíz Morado*. Libro de Resumenes del V Congreso Mundial de Medicina Tradicional. Abril. Lima-Perú. Pag 148.

Peralta N, Pinedo J, Ramírez J, Rivera F, Rivera K, Santos J, Valdivia C, Valdivieso G y col. *Evaluación de la Toxicidad del Maíz morado en ratones (DL50) y en artemia salina* (CL50). Libro de Resúmenes del V Congreso Mundial de Medicina Tradicional. Abril. Lima-Perú. Pag 149.

Ramírez Ramos, A. *Tratamiento médico de la úlcera péptica*. Diagnóstico, 1997, 36 (5):190

Ramos, A ; Orozco,H; Ramírez,J; Noriega ,C; Muñoz C; Rodríguez L, Barrios M, Amorin S y col . *Evaluación del efecto antiulceroso y Marcha Fitoquímica del extracto seco atomizado de Zea Mays L Amilaceae st Maiz morado*. V Congreso Mundial de Medicina Tradicional. Abril. Lima-Perú. Pag 153.

Retuerto,F .2003. Facultad de Biología UNMSM. *Audiencia Pública: Maíz morado* Congreso de la república del Perú.

San Feliciano M. Arturo 1990. Iatroquìmica. *La creación de sustancias para la Medicina*. Ediciones Universidad de Salamanca ISBN:84-7841-548-7 España.

Sarah, J.L.; Flaters Alyson J. Fox; Anthony H Dickenson. *Nefve injury induces plasticity that results in spinal inhibitory effects of galanin*. PAIN vol 98 (3) August 2002: 249-258

Zaragoza, F y Villaseca, L. . Vitaminas y Fitoterapia. VELASQUEZ: *Farmacología Básica y Clínica*. 17ª edición, Editorial Médica Panamerican, 2004, pág. 991