



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO QUIMICO Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA DEL EXTRACTO METANOLICO DE

Achillea millefolium

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
ERIKA GUAJARDO ANCHONDO

289675

MEXICO, D.F.

2001



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

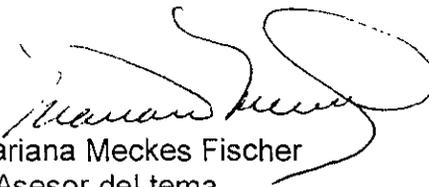
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

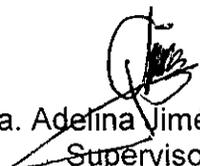
Presidente	Profra.	Elia Brosla Naranjo Rodríguez
Vocal	Profr.	Fernando García Tamayo
Secretario	Profra.	Mariana Meckes Fischer
1er suplente	Profr.	Rogelio Gregorio Pereda Miranda
2do suplente	Profra.	Patricia Elvira Berrón Ruíz

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

El trabajo experimental se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social IMSS.



Q. Mariana Meckes Fischer
Asesor del tema



Dra. Adelina Jiménez Arellanes
Supervisor técnico



Erika Guajardo Anchondo
Sustentante

DEDICATORIAS

A mi familia

Por ser lo más grande y lo que más amo en la vida.

A mis padres

Gracias **Mamá** por todo tu amor, consejos y apoyo durante todos estos años. Eres el mejor ejemplo de superación y fortaleza que puedo tener y espero que siempre te sientas tan orgullosa de mí, como yo lo estoy de ti. A mi **Papá**, gracias por tu gran amor, paciencia y apoyo; por todas tus enseñanzas y consejos para ser mejor cada día.

Estoy segura que no pude haber tenido mejor suerte, tenerlos a ustedes es mi mayor logro en la vida.

A mis hermanos (enanos)

A **Lore** por ser mi mejor amiga y confidente, gracias por ser lo diferente en mi vida. Al **Güero** (Gaby) por ser mi mejor amigo y apoyo incondicional.

Gracias por sus consejos y todo su amor. Son la *neta del planeta*. Quiero que sepan que son esenciales en mi vida y que este éxito obtenido no es mío, es nuestro.

A mis abuelitos (Alicia, Humberto, Elena y Héctor)

Aunque físicamente no están, estoy segura que siempre estarán aquí.

A Julián

Por ser la inspiración en mi vida, gracias por todo tu amor, paciencia, apoyo y por compartir tu vida conmigo. Te Amo.

A Susy y Julián Güitrón

Gracias por su cariño, apoyo, por sus enseñanzas y sobre todo por permitirme formar parte de su familia. Son un gran ejemplo a seguir. Los quiero mucho.

A Ari y Hugo

Por todo su cariño y por formar parte de mi familia.

A Lesvi

Gracias por todo tu amor y por los cuidados que me diste desde que nací y sobre todo por formar parte de nuestra familia.

A mis sobrinos (Mariana, Michel y Ale)

Por ser el mejor motivo para luchar y ser mejor en la vida.

A mis primos

Dei y **Rodrigo** por todo su cariño y apoyo, espero que siempre estemos juntos. A **Paty** y **Fito**, ojalá que siempre podamos compartir momentos como este, los quiero mucho. A **Dulce** y **Ale**, porque juntos formamos una gran familia, espero que siempre sea así.

A Gabo Trejo

Gracias por todo tu cariño y apoyo, sobre todo en los momentos de ayudarme a hacer mis proyectos finales durante la carrera.

A mis padrinos (Goga y Alfonso)

Gracias por todo su apoyo y cariño.

A Luis y Francis

Por todo su amor, apoyo y amistad incondicional.

A Fer y Roberto

Gracias por creer en mí, por ser ese gran apoyo, por todos esos momentos compartidos y más. Los quiero muchísimo.

A Hon (Ros)

Gracias por tu amistad y apoyo incondicional. Eres mucho mas que un amigo, te quiero mucho.

A Puca y Moni

Por ser parte de la alegría vivida en la Facultad. Gracias por todo su cariño y apoyo, espero que siempre seamos amigos.

A Piolino (Paul)

Gracias por tantos secretos compartidos. Te quiero mucho.

A Sayra

Por tu amistad y porque a pesar de todo, siempre estas ahí.

A Nohemí y Jahel

Por su amistad y cariño incondicional.

A Cut (Arturo)

Por que a pesar de la distancia, estas ahí. Gracias por tu amistad, te quiero mucho.

A Pili y Andrea

Por esa alegría compartida en los laboratorios y clases.

A Pamela, Natalia e Iván

Por haber formado parte importante en mi vida.

A todos los cuates del Avante; Sebastián Duchoux; Paola Pallares; Alberto Viterbo; y a mis compañeros de la generación '96 por haber formado parte de la historia de la Facultad de Química.

A la Linda (Sandy), Lola, Homero y Maggie

Por su compañía incondicional

En memoria a todas las ratitas de laboratorio

Porque gracias a ellas, la ciencia avanza día con día.

AGRADECIMIENTOS

A la Q. Mariana Meckes

Gracias por su confianza, cariño, apoyo, por sus enseñanzas y sobre todo por darme un espacio en la UIM en FPN para poder desarrollarme en todos los aspectos.

A la Dra. Adelina Jiménez

Gracias por tu amistad y apoyo incondicional, por tantos momentos compartidos, por todas tus enseñanzas y por ser un gran ejemplo a seguir.

A la Dra. Julieta Luna y a la Dra. Carolina Becker

Mi mas sincero agradecimiento por su apoyo en las revisiones hechas a mi trabajo.

A la Dra. Anayansin Molina

Por su confianza y gran apoyo en la donación de las ratitas.

A la M. en C. Abigail Aguilar

Al Dr. Eduardo Tena y al Dr. Herrera

Por todas sus atenciones en lo relacionado con el cuidado de las ratas.



La asesora de la tesis fue la Esp. Q. *Mariana Meckes Fischer* y en la parte experimental, relacionada con los estudios químicos, se contó con el apoyo y la asesoría de la Dra. *María Adelina Jiménez Arellanes*.

INDICE

	Página
LISTA DE ABREVIACIONES.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Mecanismos enzimáticos involucrados en el proceso inflamatorio....	9
Mediadores de la inflamación generados por la vía de la ciclooxi-....	11
genasa.	
¿Existen los fármacos antiinflamatorios ideales?.....	13
Agentes antiinflamatorios en la clínica.....	17
La carragenina como agente inflamatorio.....	20
Antecedentes sobre <i>Achillea millefolium</i>	27
Generalidades.....	27
Aspectos botánicos y etnobotánicos.....	27
Aspectos químicos.....	29
Aspectos farmacológicos.....	29
OBJETIVOS.....	35
HIPOTESIS.....	36
JUSTIFICACION.....	37
PARTE EXPERIMENTAL.....	38
Material vegetal.....	38
Modelo experimental animal.....	38
Análisis de los datos.....	39
Fraccionamiento químico.....	40
Fraccionamiento secundario de la fracción F3.....	43

Fraccionamiento secundario de la fracción F4.....	44
RESULTADOS.....	46
Actividad del extracto metanólico de <i>Achillea millefolium</i>	48
Fraccionamiento químico del extracto metanólico.....	50
Efecto de las fracciones primarias sobre el edema inducido.....	50
Fraccionamiento secundario de las fracciones F3 y F4.....	53
Actividad de las fracciones secundarias.....	56
DISCUSION.....	58
CONCLUSIONES.....	61
CITAS BIBLIOGRAFICAS	62

LISTA DE ABREVIACIONES

OMS	Organización Mundial de la Salud
PMN	Polimorfonuclear
ADN	Acido desoxirribonucleico
LPS	Lipopolisacárido
LB	Linfocito B
LT	Linfocito T
LT _H	Linfocito T cooperador
LT _c	Linfocito T citotóxico
AA	Acido araquidónico
FAP	Factor activador de plaquetas
NK	Células asesinas naturales
CPH-II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa tipo 1
COX-2	Ciclooxigenasa tipo 2
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PGD2	Prostaglandina D2
PGF2	Prostaglandina F2
TX	Tromboxano
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
SRS-A	Sustancia reactiva lenta de la anafilaxia
INF- γ	Interferón gamma

FNT- α	Factor de necrosis tumoral alfa
CPH-II	Complejo principal de histocompatibilidad tipo II
AAS	Acido acetilsalicílico
AINEs	Antiinflamatorios no-esteroidales
RIF	Respuesta inflamatoria fagocítica
RINF	Respuesta inflamatoria no-fagocítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
aq.	Acuoso
g.	gramos
CCD	Cromatografía en capa delgada
i.p.	Intraperitoneal
c/u	cada uno
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución

I NTRODUCCION

En México, antes de la llegada de los españoles, la práctica médica herbolaria era una actividad cotidiana, se había desarrollado un gran conocimiento de la medicina indígena como para enfrentar varios de los padecimientos, esto es, los indígenas sabían sobre las propiedades y los efectos de sus remedios, además transmiten dicho conocimiento. Hoy en día, como legado hasta nuestras generaciones, la medicina tradicional es una alternativa y son muchas las familias mexicanas que para curar sus males siguen acudiendo a los remedios herbolarios, también llamados remedios caseros, y en cada región existen plantas que, por su eficacia y por el conocimiento que se tiene de ellas, pueden considerarse como las más populares o representativas.

La importancia del estudio de los productos naturales radica en la contribución que representan para la terapéutica convencional como para la tradicional, cabe destacar que las plantas siempre han sido una fuente para la obtención de extractos, así como de principios activos puros.

La Organización Mundial de la Salud (**OMS**) estima que alrededor de un 80% de la población mundial, principalmente de los países en vías de desarrollo, recurre a las medicinas tradicionales para solucionar sus principales problemas de salud, y se puede afirmar que gran parte de los tratamientos tienen como base el uso de las plantas o de sus principios activos.

Por otra parte, son de interés los compuestos de origen natural en el campo de la industria farmacéutica, ya que sirven como materia prima para la obtención de los llamados fármacos semisintéticos como las hormonas esteroidales; también han constituido los prototipos estructurales para la síntesis de drogas análogas

con mayor actividad biológica. Uno de los propósitos de mayor relevancia en el campo de las ciencias médicas y farmacéuticas es encontrar nuevos agentes terapéuticos que actúen con mayor selectividad y menores efectos secundarios indeseables.

El descubrimiento de un alto porcentaje de fármacos de origen vegetal, ha sido resultado del estudio de plantas empleadas en la medicina tradicional. A pesar de la gran diversidad de plantas de reconocido uso popular, en México, la búsqueda de nuevos principios activos se encuentra aún en pleno desarrollo.

Por otra parte, el interés por encontrar nuevos fármacos con actividad antiinflamatoria, los antecedentes sobre los ya existentes en la clínica, la falta de programas de rastreo farmacológico de plantas con probable actividad antiinflamatoria, la información etnobotánica abundante sobre plantas empleadas para tratar una serie de síntomas y padecimientos asociados al proceso inflamatorio, son aspectos que se toman en consideración en la investigación de las plantas que son empleadas como antiinflamatorias en la medicina tradicional.

Achillea millefolium es una de las especies que se utiliza en los estados de Baja California, Chiapas, Durango, Estado de México, Hidalgo, Puebla, Oaxaca, Veracruz y en el D.F. para curar heridas, en el tratamiento de padecimientos relacionados con la inflamación, el dolor, etc.

En la literatura científica, la información de esta especie vegetal es dispersa y los resultados respecto a su actividad antiinflamatoria no son concluyentes; esto es, se tiene un conocimiento sobre sus constituyentes químicos, sin embargo no se han reportado los estudios a nivel farmacológico de todos estos constituyentes ni tampoco se especifica con claridad cual de estos compuestos químicos son los responsables de las actividades biológicas reportadas.

Por lo tanto, siendo *Achillea millefolium* una especie de importancia como recurso alternativo en el tratamiento de la inflamación, se decidió llevar a cabo el estudio químico-farmacológico del extracto metanólico de la planta, utilizando como modelo biológico, el del edema plantar de la rata inducido con carragenina.

Una vez analizados los resultados obtenidos, se concluye que el extracto metanólico de las partes aéreas de *A. millefolium* inhibe significativamente el edema inducido con carragenina; la composición heterogénea del extracto y la actividad de las fracciones aisladas, permite hasta el momento atribuir el efecto antiinflamatorio, fundamentalmente a la presencia de un esteroide y de un complejo de lactonas sesquiterpénicas. El estudio confirma en cierta medida, las propiedades antiinflamatorias que le confiere a esta especie vegetal la medicina tradicional mexicana.

A ANTECEDENTES

La inflamación es una respuesta fisiológica a la acción de agentes que producen infección, hipersensibilidad, traumatismos etc. y que trae como consecuencia alteración en la homeostasis del organismo. Participan en el proceso inflamatorio, células del sistema inmune que liberan mediadores químicos, activadores de diferentes mecanismos enzimáticos e inmunológicos.

La inflamación se manifiesta en cualquier parte del organismo y se acompaña de síntomas característicos como calor excesivo, tumefacción, dolor y enrojecimiento de la zona afectada. En la respuesta inflamatoria ocurren tres eventos fundamentales:

- Dilatación de los vasos capilares para incrementar el flujo sanguíneo en la zona afectada.
- Aumento de la permeabilidad vascular facilitando de esta manera que células, macromoléculas como la de los anticuerpos y el complemento, alcancen la zona inflamada.
- Migración de los leucocitos (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) al sitio de la inflamación.

La inflamación puede ser un cuadro de tipo agudo o crónico. El proceso de tipo agudo se caracteriza por una respuesta localizada, rápida y que lleva a la curación total; mientras que el de tipo crónico afecta a uno o más órganos y en este caso, la evolución del proceso es impredecible.

Los eventos que ocurren en el proceso inflamatorio son iniciados por una gran variedad de mediadores químicos, algunos de estos son producidos por microorganismos invasores, otros son liberados por células que han sido dañadas. Participan también mediadores que son generados por determinados sistemas enzimáticos en el plasma y otros, son producto de los leucocitos que intervienen en el proceso inflamatorio (Goldsby y col., 2000).

Los microorganismos invasores tienden a liberar enzimas, entre ellas hemolisinas que tienen como función destruir a los eritrocitos y, las leucocidinas que juegan un papel importante en la destrucción de los leucocitos polimorfonucleares (**PMN**); otro tipo de enzimas son las estreptocinasas y las estafilocinasas que son proteasas que se encargan de convertir el plasminógeno en plasmina para disolver los coágulos formados y lograr la diseminación de los microorganismos. Finalmente, cabe mencionar a las desoxiribonucleasas que degradan el **ADN** y promueven el movimiento bacteriano de un lugar a otro en el organismo. Algunos microorganismos sintetizan endotoxinas, un ejemplo es el componente del lípido A de los lipopolisacáridos (**LPS**) en las bacterias Gram-negativas, que es liberado cuando se produce la lisis de las mismas; generalmente, las bacterias Gram-positivas producen proteínas solubles llamadas exotoxinas que actúan de manera más específica y son más dañinas que las endotoxinas, algunas de estas son las enterotoxinas, neurotoxinas y otras (Lim, 1998).

Uno de los principales mediadores en el proceso inflamatorio es la histamina, agente que es liberado por las células cebadas, plaquetas, etc., y se une a receptores localizados en los capilares y vénulas, produciendo vasodilatación e incrementando la permeabilidad vascular. Entre otros mediadores químicos liberados están las proteínas séricas, la proteína C reactiva que es sintetizada en el hígado en respuesta a un traumatismo o a una infección, ésta última se une a receptores (C-polisacáridos) membranales de bacterias, hongos, etc., activando

así el sistema del complemento para ocasionar la lisis o la fagocitosis de los microorganismos (Goldsby y col., 2000).

Las cininas constituyen un grupo importante de mediadores involucrado con la respuesta inflamatoria, son pequeños péptidos que se encuentran en el plasma en su forma inactiva y cuando se presenta un daño tisular, éstas se activan causando vasodilatación e incrementando la permeabilidad de los capilares (Goldsby y col., 2000).

El proceso inflamatorio involucra la participación de células del sistema inmune tales como los fagocitos (eosinófilos, neutrófilos, monocitos, macrófagos), las células auxiliares (células cebadas, plaquetas, basófilos) y los linfocitos (linfocitos T, linfocitos B) que liberan mediadores de la inflamación (cuadro 1).

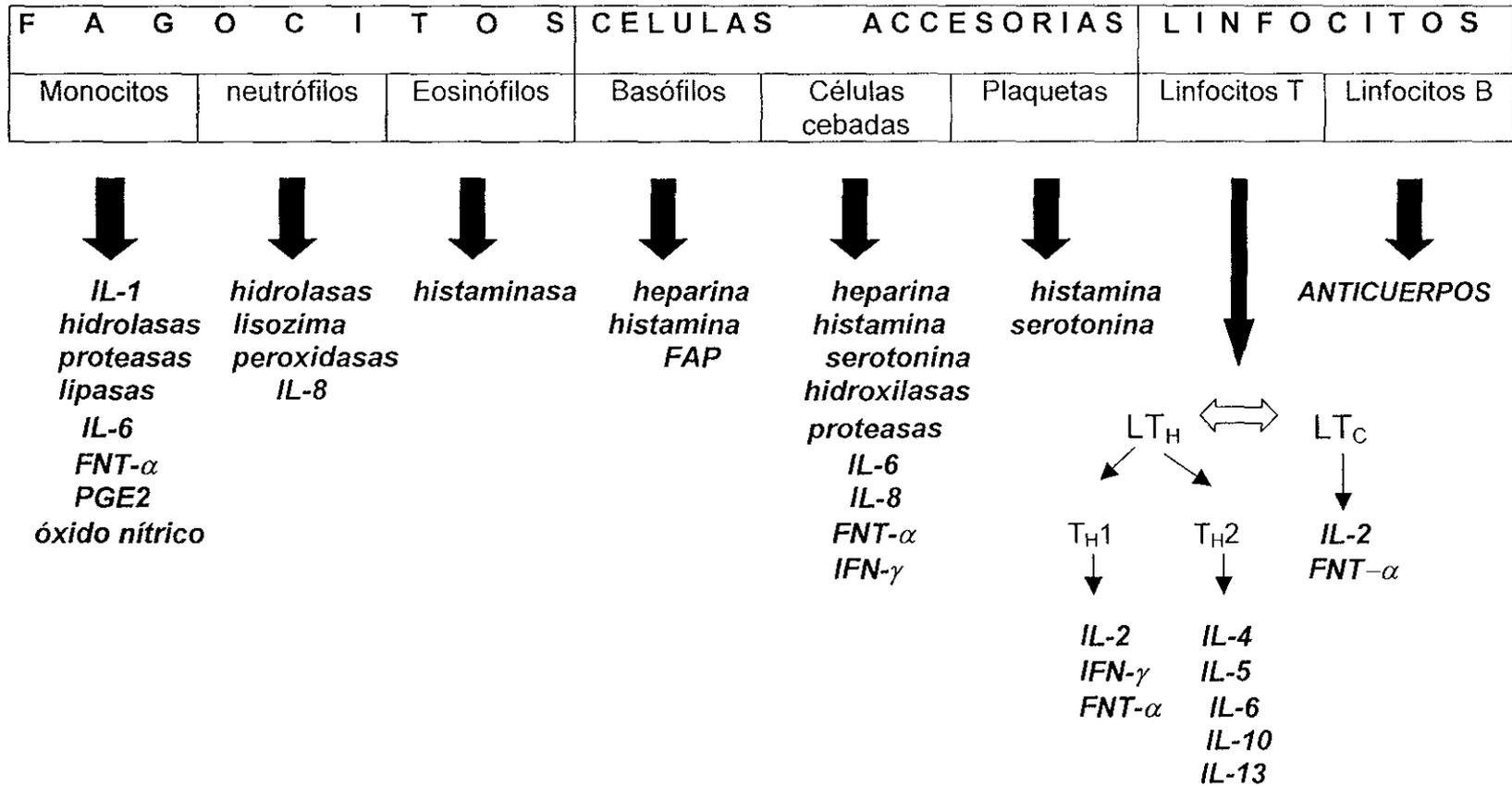
Los fagocitos son un grupo de células que se originan en la médula ósea y tienen como función endocitar bacterias, células sanguíneas y otras, internalizarlas y destruirlas. A este grupo pertenecen los eosinófilos, células características en las reacciones de hipersensibilidad; los neutrófilos que se presentan cuando se da un proceso inflamatorio de tipo agudo; los monocitos que tienen gran actividad fagocítica y que cuando se encuentran fuera del torrente sanguíneo se transforman en macrófagos (Roitt y col., 1996)

Las células auxiliares tienen la función de controlar la inflamación, atrayendo leucocitos y a los mediadores químicos hacia el sitio de la infección. Dentro de las células que toman parte activa en la inflamación, cabe mencionar a las plaquetas ya que liberan mediadores como la histamina y la serotonina los cuales aumentan la permeabilidad vascular y activan al complemento. Por otra parte, las células cebadas que se encuentran cerca de los vasos sanguíneos y los basófilos en circulación, se caracterizan por tener gránulos que liberan a los mediadores de la inflamación (histamina, serotonina, citocinas proinflamatorias, óxido nítrico, etc.) al momento de ser activados (Roitt y col., 1996).

Otro grupo celular es el de los linfocitos, éstos son los responsables del reconocimiento de los antígenos dando inicio a la respuesta inmune. Hay dos tipos de linfocitos, los linfocitos B (LB) que se originan en la médula ósea y los linfocitos T (LT) que se desarrollan en el timo. Los LB, son células que expresan en su superficie a un receptor específico para un determinado antígeno; una vez que se da el reconocimiento del antígeno, los LB se multiplican y se diferencian a células plasmáticas, mismas que producen gran cantidad de moléculas solubles llamadas anticuerpos. Estos anticuerpos son glucoproteínas que se encuentran en la circulación y en fluidos, tienen como función bloquear la actividad del antígeno uniéndose a él (Goldsby y col., 2000).

Existen varios grupos de linfocitos T, uno de ellos interactúa con los LB ayudándolos en su diferenciación y en la producción de anticuerpos, otro grupo estimula a los fagocitos eliminando a las células patógenas; estos dos grupos forman parte de los llamados linfocitos T-cooperadores (LT_H). Un tercer grupo de LT es el responsable de la destrucción de las células que han sido infectadas por los microorganismos patógenos o por un virus, a este grupo se les conoce como linfocitos T-citotóxicos (LT_C). Estos grupos de linfocitos T producen su efecto liberando proteínas solubles, conocidas como citocinas y promoviendo interacciones celulares. También existen células que son citotóxicas para las células tumorales y para las células infectadas por virus, a éstas se les conoce como células asesinas (natural killer NK), y a diferencia de los LT, emplean mecanismos de reconocimiento no-específicos (Goldsby y col., 2000).

Por otra parte, existe una gran cantidad de macromoléculas involucradas en el desarrollo de la respuesta inmune, dentro de las que se incluyen a los anticuerpos y a las citocinas producidas por los linfocitos, así como a las proteínas séricas. Se ha encontrado que las concentraciones de este tipo de proteínas aumenta rápidamente cuando se presenta un proceso infeccioso. El sistema del complemento es un grupo formado por 20 proteínas séricas y que

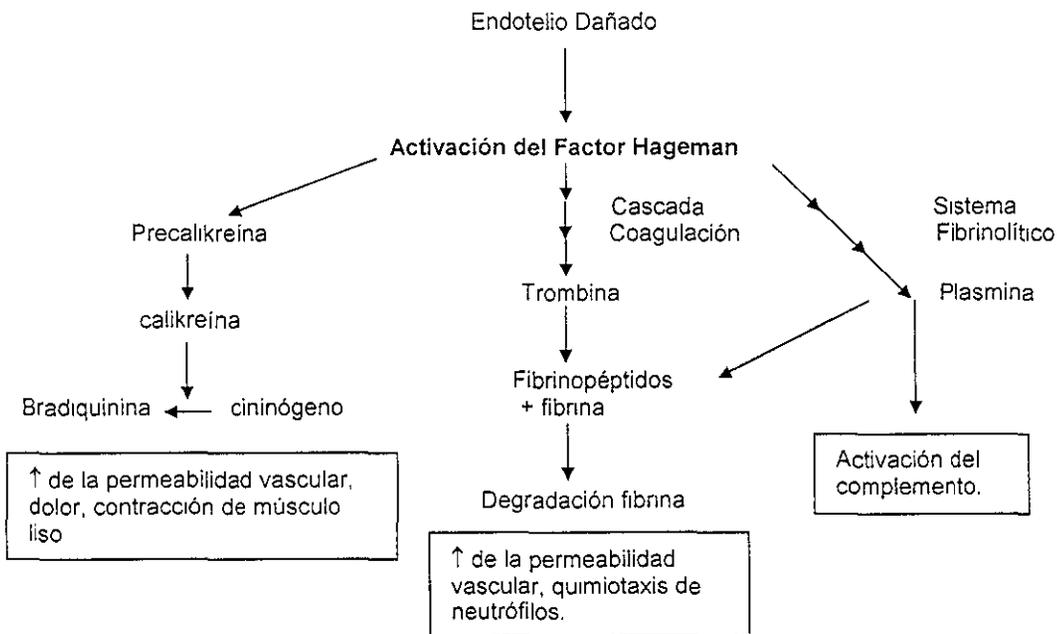


Cuadro 1.

Principales componentes y citocinas del sistema inmune. Las distintas células que integran el sistema inmune, liberan mediadores solubles de acuerdo a su función (tomado de Roitt y col., 1996, Immunology, pp 1 3).

tiene como función promover una respuesta inflamatoria. Este sistema se puede activar por dos vías: la clásica y la alterna. La vía clásica se activa cuando se forma el complejo antígeno-anticuerpo mediando la respuesta adaptativa, mientras que la vía alterna se activa con la presencia de microorganismos generando una respuesta inmune no específica. La activación del complemento es una serie de reacciones, en donde sus componentes se activan de manera secuencial. Esta activación, ya sea por la vía clásica o la alterna, genera péptidos que son quimiotácticos para los fagocitos, incrementan la permeabilidad vascular, liberan mediadores de la inflamación, producen la lisis de los microorganismos y opsonizan a los microorganismos haciendo mas eficiente la fagocitosis (Roitt y col., 1996).

MECANISMOS ENZIMÁTICOS INVOLUCRADOS EN EL PROCESO INFLAMATORIO



Cuadro 2

Sistemas enzimáticos involucrados en el desarrollo del proceso inflamatorio. El daño a nivel de endotelio induce la activación de mediadores enzimáticos en el plasma relacionados con los sistemas de las cininas, de la coagulación y fibrinolítico. Estos mediadores producen cambios vasculares. La plasmina además de degradar los coágulos formados, activa el sistema del complemento. (Tomado de Goldsby y col., 2000, Immunology, pp 381.)

Existen en el plasma cuatro sistemas interconectados que producen mediadores de la inflamación: el *sistema de las cininas*, el *sistema de la coagulación*, el *sistema fibrinolítico* y el *sistema del complemento*. Con excepción del sistema del complemento, los otros tres sistemas tienen un intermediario en común, el factor de coagulación denominado, *Factor Hageman* (cuadro 2). Cuando ocurre un daño tisular, se activan estos cuatro sistemas para formar una red de señales y generar mediadores (Goldsby y col., 2000).

El *sistema de las cininas* es una cascada enzimática que se desencadena al activarse el factor de Hageman. Este factor estimula a la precalicreína para formar calicreína, la cual induce la formación de bradiquinina. La bradiquinina es un péptido vasoactivo que incrementa la permeabilidad vascular, produce vasodilatación, dolor e induce la contracción del músculo liso; mientras que la calikreína actúa directamente sobre el complemento, dividiendo al componente C5 en los fragmentos C5a y C5b; el fragmento C5a es una anafilotoxina que induce la degranulación de las células cebadas, liberando mediadores de la inflamación como la histamina, aunque también actúa como un factor quimiotáctico (Goldsby y col., 2000).

El *sistema de coagulación* es una cascada enzimática que se activa cuando se produce un daño en los vasos sanguíneos, produce una gran cantidad de trombina que actúa sobre el fibrinógeno soluble para producir filamentos de fibrina insolubles y fibrinopéptidos. Estos filamentos se entrecruzan para formar un coágulo y así, prevenir hemorragias y en caso de infección, evitar que los microorganismos patógenos lleguen a la circulación sistémica. Los fibrinopéptidos actúan como mediadores de la inflamación incrementando la permeabilidad vascular y la quimiotaxis de los neutrófilos (Goldsby y col., 2000).

El *sistema fibrinolítico* tiene la función de remover el coágulo de fibrina formado en el tejido dañado. El producto final de esta vía es la plasmina, enzima proteolítica que deshace los coágulos transformándolos en productos de

degradación que son quimiotácticos para los neutrófilos y a su vez, contribuye a la respuesta inflamatoria activando al complemento por la vía clásica (Goldsby y col., 2000).

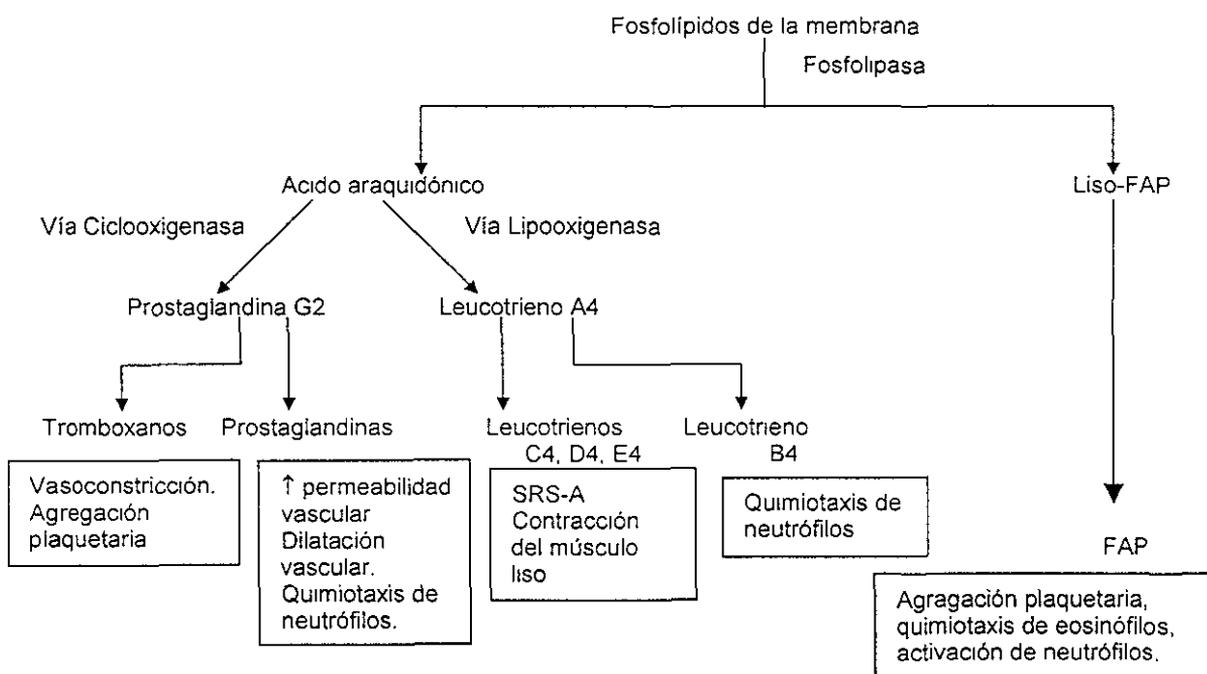
El *sistema del complemento* activado tanto por la vía clásica como por la vía alterna, da origen a varios mediadores químicos de la inflamación, como las anafilotoxinas C3a y C5a las cuales inducen la liberación de histamina y otros agentes que aumentan la permeabilidad vascular e inducen la contracción del músculo liso. Estas anafilotoxinas actúan de manera conjunta para lograr la adherencia, extravasación y migración de los monocitos y neutrófilos hacia la zona afectada (Roitt y col., 1996).

MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN GENERADOS POR LA VÍA DE LA CICLOOXIGENASA

Durante el proceso inflamatorio se dañan las membranas de los macrófagos, monocitos, neutrófilos, células cebadas y otras, generándose ácido araquidónico (AA) y el factor activador de plaquetas (FAP) (Cuadro 3). El FAP induce la activación de las plaquetas, ayuda a la quimiotaxis de los eosinófilos y a la activación y degranulación de los neutrófilos y eosinófilos (Goldsby y col., 2000).

El metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa (COX) genera mediadores de la inflamación como las prostaglandinas (PG) y los tromboxanos (TX), los cuales son liberados por distintas células: los neutrófilos producen PGE₂, los monocitos y macrófagos producen gran cantidad de PGE₂ y PGF₂, las células cebadas producen PGD₂; estas prostaglandinas tienen como función aumentar la permeabilidad y la dilatación vascular e inducir la quimiotaxis de los neutrófilos. Los tromboxanos son mediadores de la inflamación que inducen la agregación plaquetaria y la constricción de los vasos sanguíneos (Goldsby y col., 2000).

El ácido araquidónico también se metaboliza por la vía de la lipooxigenasa para generar leucotrienos (LT), existen cuatro tipos de leucotrienos: **LTB4**, **LTC4**, **LTD4** y **LTE4**. Tres de estos, **LTC4**, **LTD4** y **LTE4**, constituyen el complejo conocido como la sustancia reactiva lenta de la anafilaxia (**SRS-A**) y tiene como función inducir la contracción del músculo liso, el **LTB4** es un potente quimioattractor de neutrófilos. Este tipo de mediadores son producidos por diversas células entre éstas, los monocitos, los macrófagos, las células cebadas y los basófilos (Goldsby y col., 2000).



Cuadro 3.

Generación de mediadores de la inflamación por la vía de la ciclooxigenasa y lipooxigenasa. El metabolismo de los fosfolípidos membranales genera importantes mediadores de la inflamación como los tromboxanos, prostaglandinas, leucotrienos y el factor agregador de plaquetas. (Tomado de Goldsby y col., 2000, Immunology, pp 382.)

Existen otros tipos de mediadores de la inflamación que no son generados por estas vías y generalmente se presentan cuando el proceso inflamatorio es de tipo crónico, algunos de ellos son: el interferón gamma (**INF γ**) y el factor de

necrosis tumoral alfa (FNT- α). El INF- γ es producido por las células NK y por los linfocitos LTc; mientras que el FNT- α es producido por los macrófagos en su estado activado. Uno de los efectos más importantes del INF- γ es la activación de los macrófagos, los cuales son capaces de expresar en su membrana, moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (CPH-II), hace mas efectiva la presentación de antígeno, aumenta la producción de citocinas, e incrementa su actividad microbicida para eliminar a los microorganismos patógenos. En un proceso inflamatorio de tipo crónico, el daño tisular ocasionado se debe a la acumulación de los macrófagos activados, ya que estos generan citocinas como enzimas hidrolíticas, intermediarios oxigenados reactivos y FNT- α . Este último, tiene un efecto citotóxico sobre las células tumorales, se ha demostrado que el FNT- α actúa de manera sinergista con el INF- α para iniciar una respuesta inflamatoria de tipo crónica (Goldsby y col., 2000).

¿ EXISTEN LOS FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS IDEALES ?

En la actualidad, los agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son los medicamentos de mayor uso como analgésicos y antiinflamatorios. El ácido acetilsalicílico (AAS) es uno de los fármacos más populares a nivel mundial por sus propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Efectos similares se han obtenido desde hace años utilizando productos naturales obtenidos del Sauce. El género *Salix* (Salicaceae) consta de aproximadamente 500 especies conocidas popularmente con el nombre de Sauce. Las especies *S. alba*, *S. fragilis* y *S. purpurea* son las especies medicinales de mayor uso (Calixto y col., 2000). El principio activo en el género *Salix* es la salicina y se han encontrado series de glucósidos fenólicos como la salicortina, fragilina y tremulacina, las cuales están presentes en la corteza de la planta (Trease y Evans, 1978.; Robbers y Taylor, 1999).

Las primeras descripciones sobre las propiedades curativas del Sauce datan del año 200 a.C. y pertenecen a Hipócrates, quien descubrió que la corteza y las

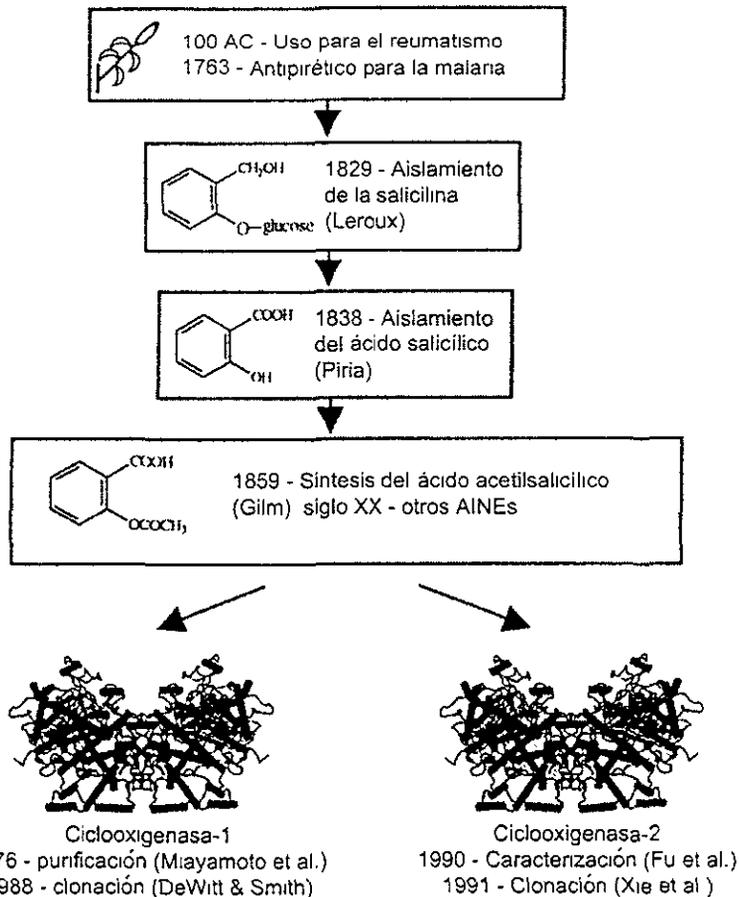
hojas aliviaban la fiebre y el dolor. Durante el siglo I, el médico griego, Dioscórides, prescribió el sauce a pacientes que padecían de reumatismo. El primer uso clínico de esta especie como tratamiento para la fiebre se reportó en 1763 (Norton y Meisinger, 1997). Posteriormente, en 1829, Leroux aisló de la corteza del sauce el principio activo *salicina*, y Gilm en el año de 1859, sintetizó por primera vez el AAS a partir de ácido salicílico. En 1860 este compuesto se empleó como antiséptico, antipirético y también para tratar el reumatismo y la artritis; en 1875, la sal de sodio del AAS se empleó como antipirético (Hass, 1983.; Walker, 1995) y una vez demostrados los efectos antiinflamatorios del AAS, en 1899 Bayer lo introdujo en el mercado con el nombre de "Aspirina".

El AAS es el prototipo de un grupo de fármacos llamados **AINEs**, éstos poseen actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética, se emplean para tratar diversas enfermedades y padecimientos como el dolor posoperatorio, la cefalea, el dolor de la musculatura esquelética, la osteoartritis y la artritis reumatoide (Walker, 1995). Sin embargo, los **AINEs** y los salicilatos tienen efectos secundarios como hipersensibilidad, disfunciones renales y hepáticas, irritación y/o ulceración del tracto gastrointestinal (Clissold, 1986), etc.

La elucidación del mecanismo de acción de los **AINEs** tardó casi un siglo. En 1971, Vain obtuvo las primeras evidencias de que las propiedades analgésicas de los salicilatos, específicamente de la aspirina, se debían a la inhibición de la síntesis de PGs como resultado de un bloqueo a nivel de la COX. En 1976, se logró purificar esta enzima a partir de glándulas vesiculares y se clonó por primera vez en 1988 (Miayamoto y col., 1976; Dewitt y Smith, 1988; O'Banion, 1999). Estudios han demostrado que los fármacos que actúan inhibiendo la COX, tienen distintos efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, y que esto probablemente se deba a la existencia de dos isoformas de la **COX** (Fu y col., 1990; Masferrer y col., 1990). El descubrimiento de la **COX-2** (Xie y col., 1991; Kubuju y col., 1991) fue el antecedente que permitió explicar la variación de los efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios existentes entre los

AINEs. También se ha demostrado que los efectos secundarios observados por estos fármacos, se atribuyen a la inhibición de la **COX-1** y que los efectos terapéuticos obtenidos se relacionan con la inhibición de la actividad de la **COX-2**.

Historia del género SALIX (sauce).



Esquema 1

Desarrollo de los AINEs. Principales constituyentes de las especies del género Salix en el desarrollo de los AINEs (Tomado de Calixto, J B y col., 2000, Phytother. Res. 14:408.)

Actualmente, estudios realizados en animales de experimentación empleando inhibidores de la **COX-2**, demuestran que la inducción de esta isoforma de la ciclooxigenasa es un evento crítico en el proceso inflamatorio y del dolor (O'Banion, 1999; Xu y col., 1999). Estos estudios sugieren que algunas

propiedades que poseen los salicilatos, como la actividad antiinflamatoria y los efectos analgésicos, están relacionados directamente con la inhibición de la COX-2.

Con anterioridad se han reportado estudios sobre la actividad antiinflamatoria de *Achillea millefolium*: el efecto inhibitor sobre el edema que posee el extracto acuoso de las flores y el aislamiento de un complejo de glicoproteínas como el principio activo (Goldberg y col., 1969), la evaluación del efecto de las partes aéreas de la planta y la corroboración de un 29% de inhibición del edema a una dosis oral de 100 mg/kg (Mascolo y col., 1987), algunas alcanidas poliinsaturadas aisladas del extracto que inhiben a la 5-lipooxigenasa y ciclooxigenasa (Müller y col., 1994). Sin embargo, los efectos biológicos descritos no permiten aún concluir sobre las propiedades antiinflamatorias de la planta.

Es característica la presencia de lactonas sesquiterpénicas en las especies de *Achillea*, de acuerdo con la configuración en C-11 que presentan, se dividen en las series achillina (11- β Me) y matricarina (11- α Me) (Abad y col., 1984). Un ejemplo de este tipo de metabolitos es la desacetilmatricarina, compuesto que ha sido reportado por su actividad antialérgica con una potencia superior a la que posee el cromoglicato de disódico, uno de los fármacos de uso clínico (Ho y col., 1998). Leucodina, otro de los metabolitos presentes en el género, mantiene una diferencia estructural respecto a la desacetilmatricarina en un grupo hidroxilo C-8; sin embargo, no hay reportes sobre su actividad biológica.

Los flavonoides son otro tipo de metabolitos presentes en la especie vegetal, éstos son inhibidores de la peroxidación del ácido araquidónico lo que explicaría los efectos antiinflamatorios de muchas plantas que contienen este tipo de compuestos (Bauman, 1980), también se ha reportado la inhibición que producen a nivel de la 5-lipooxigenasa (Castro y col., 2000), mecanismo de acción que es de interés en la búsqueda de antiinflamatorios. Constituyen uno

de los grupos más estudiados a nivel estructura-actividad y se sabe que leves modificaciones en su estructura alteran de manera notable tanto la bioquímica como los efectos farmacológicos. La artemetina es una flavona identificada en *Achillea millefolium* y se sabe que posee propiedades antiinflamatorias, se ha reportado una DI_{50} de 67.07 mg/kg en el modelo del edema plantar inducido con carragenina (Sertié y col., 1990).

AGENTES ANTIINFLAMATORIOS EN LA CLÍNICA

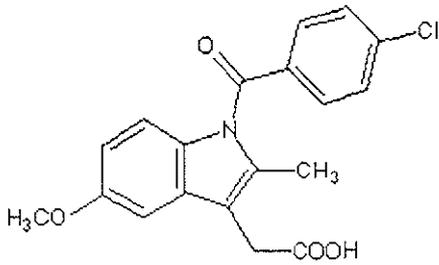
Entre los agentes antiinflamatorios no-esteroidales de uso clínico destaca el tipo de los salicilatos (Esquema 2) cuyas propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas han sido motivo de estudios muy amplios. Uno de estos fármacos es la *indometacina*, agente poco potente como analgésico y antipirético, mientras que como antiinflamatorio tiene una potencia mayor a la de la aspirina, y generalmente se emplea en el tratamiento de la artritis reumatoide. Otro fármaco que forma parte de los AINEs es el *sulindac*, éste es mucho menos potente que la indometacina, se considera un profármaco ya que su metabolito sulfurado actúa como inhibidor de la **COX** y es 500 veces más potente que el propio sulindac, principalmente se utiliza para tratar la artritis y la osteoartritis. El *diclofenac* es un ácido fenilacético que se ha desarrollado específicamente como agente antiinflamatorio pero posee también propiedades analgésicas y antipiréticas, se ha demostrado que su potencia es mayor a la de la indometacina, naproxen y otros, ya que este fármaco disminuye la concentración intracelular del ácido araquidónico en los leucocitos, se emplea también en el tratamiento de la artritis en un estado crónico. Otro fármaco es el *acetaminofen*, un potente analgésico y antipirético; sin embargo, resulta ser un antiinflamatorio poco potente debido a que el compuesto bloquea la **COX** en un medio bajo en peróxidos y el proceso inflamatorio genera gran cantidad de peróxidos. En la actualidad, la *fenilbutazona* no es un agente antiinflamatorio de elección debido a los efectos secundarios que produce, sin embargo debido a su rápida absorción, es utilizado como fármaco de referencia en estudios de tipo agudo.

El mecanismo de acción de estos fármacos se relaciona con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, especialmente la PGI₂ y PGE₂ generadas por la vía de la **COX**. Algunos de los efectos indeseables que se describen para estos principios activos, son fundamentalmente úlcera y hemorragia gástrica, consecuentemente producen anemia (Insel, 1990).

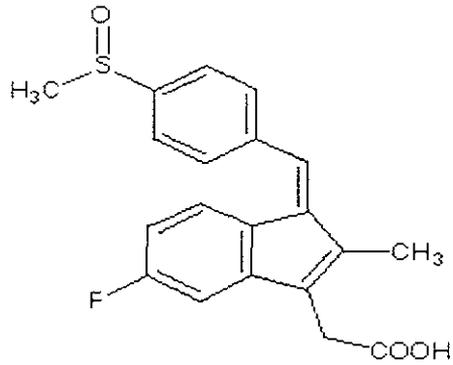
A través de la ruta metabólica del ácido araquidónico se producen dos isoformas de la **COX**, la **COX-1** y la **COX-2**. La **COX-1** es una enzima que se encuentra permanentemente en los tejidos de la mucosa gástrica, del riñón y de las plaquetas (Kargman y col., 1996), la **COX-2** se expresa, principalmente en los macrófagos y las células sinoviales cuando el proceso inflamatorio involucra la participación de lipopolisacáridos y/o citocinas (Needelman y col., 1997; McAdam y col., 1999). Los efectos adversos detectados con los salicilatos se atribuyen a su acción sobre la **COX-1** (Lichtenstein y col., 2000).

Recientemente, han tenido gran difusión otra serie de compuestos **AINEs** inhibidores de la **COX-2** (Lypsky, 2000). La Organización Mundial de la Salud los clasificó como una subclase de los AINEs denominándolos *coxibs*.

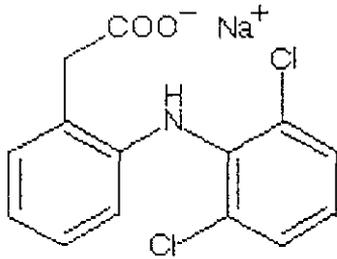
En la actualidad se distribuyen comercialmente dos fármacos del tipo *coxibs*. Rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), ambos compuestos actúan específicamente sobre la **COX-2**, evitando de esta manera los efectos colaterales sobre la mucosa gástrica. Esta clase de fármacos tienen la desventaja de que pueden aumentar el riesgo de tromboembolias debido a que inhiben la síntesis de prostaciclina en el endotelio (McAdam y col., 1999).



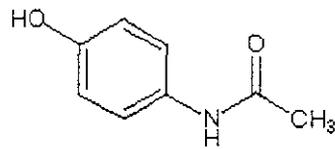
indometacina



sulindac



diclofenac



acetaminofen

Esquema. 2

Ejemplos de fármacos antiinflamatorios no-esteroidales. Algunos fármacos cuyo mecanismo de acción está mediado por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Actúan a nivel de la COX.

LA CARRAGENINA COMO AGENTE INFLAMATORIO

La carragenina o carragenano es una mezcla de polisacáridos sulfatados que se obtienen frecuentemente a partir de *Chondrus crispus*, alga marina de la familia *Rhodophyta*. Desde el punto de vista de la estructura química, estos constituyentes son copolímeros formados por unidades $\beta \rightarrow 3$ -D-galactosa y (1 \rightarrow 4)-3,6-anhidro-D- o bien, L-galactosa. Existen varios tipos de carrageninas que difieren entre sí por el número de ésteres de sulfato y/o de otros sustituyentes en la molécula. Los principales productos comerciales son:

- Carragenina tipo **kappa** (Tipo III), obtenida de la especie marina *Euchema cottonii*. Este tipo de carragenina contiene gran cantidad de sulfatos en su estructura, razón por la cual forma geles muy rígidos.
- Carragenina tipo **lamda** (Tipo IV) se aísla de *Gigartina aciculaire* y *Gigartina pistillata*, contiene un grupo sulfato en cada disacárido y no forma geles.
- Carragenina tipo **iota** (Tipo V) es obtenida de la especie *Euchema spinosa* y se caracteriza por formar geles flexibles.

(Merck Index, 1989).

La diferencia estructural de cada uno de los tipos de carragenina, determina la diferencia en sus actividades biológicas. Todos los tipos de carragenina son considerados agentes flogísticos, aunque los mecanismos que participan en la formación del edema subplantar en el animal de laboratorio, es un tópico aún no descrito totalmente (Anderson y col., 1984).

Durante las primeras tres horas después de la administración vía plantar de carragenina tipo lamda, se ha descrito un comportamiento bifásico en la formación del edema plantar (fig. 1).

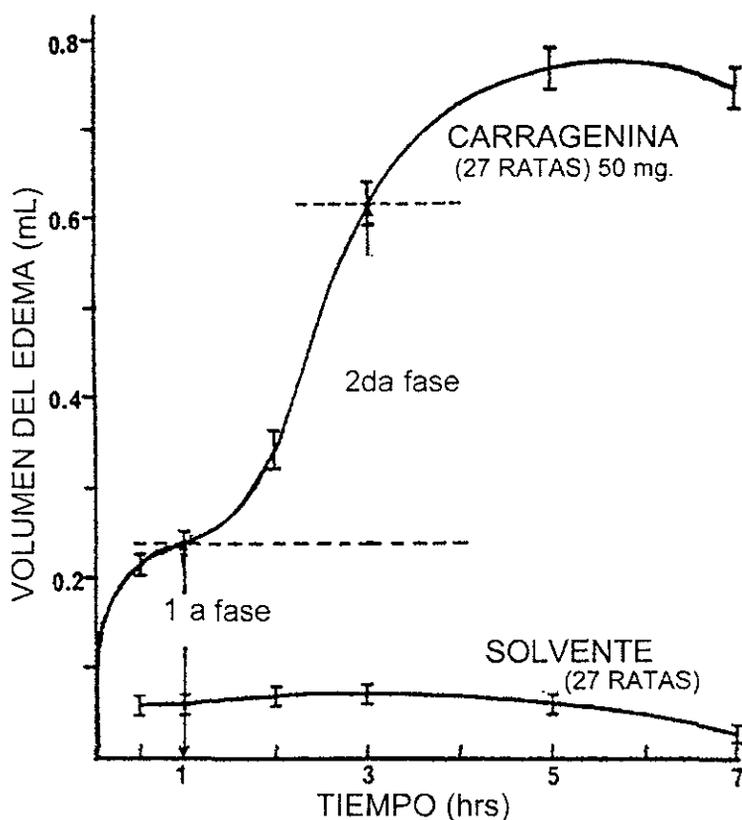


Fig. 1

(tomado de Vinegar y col., 1969, *J Pharmacol Exp Ther*, 166:97)

Como se ilustra en la fig 1, una "primera fase" registra el incremento gradual del edema en el transcurso de la primera hora, seguido de una "segunda fase" que dura hasta 3 horas después de la administración de la carragenina y que se caracteriza por el incremento abrupto que presenta el edema a partir de los 90 minutos. Un factor a considerar en la inducción del edema es la temperatura a la que se somete la carragenina para su disolución en el vehículo. Se ha demostrado que el calentamiento a 130-180 °C por un período de 16 horas carboniza el producto y se pierden las propiedades coloidales; como consecuencia, la segunda fase en la formación del edema no se detecta aunque la primera etapa de formación se lleva a cabo (Vinegar y col., 1969).

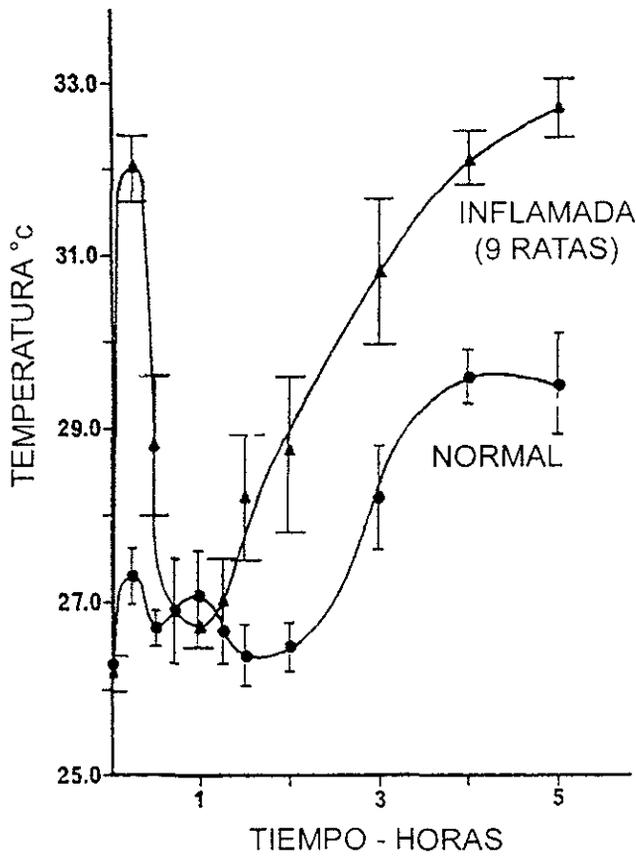


Fig. 2
(tomado de Vínegar y col., 1969, *J Pharmacol Exp Ther*, 166:98)

Por lo que la temperatura en los animales tratados con carragenina es un parámetro que registra variaciones significativas durante las primeras horas después de su administración. En la fig. 2 se ilustra la temperatura de la extremidad inyectada en función del tiempo (5 horas). Al inicio se produce un aumento inmediato de la temperatura hasta alcanzar niveles de 32 °C para descender luego a los niveles basales (aproximadamente de 26 °C) a los 45 minutos siguientes. La fase se describe como la “primera etapa de hipertermia”, seguido de una “segunda etapa” en la que se observa un aumento gradual de la

temperatura hasta alcanzar valores de 32.5 °C a las 5 horas después de administrada la carragenina.

Un factor a considerar en la inducción del edema es la hora del día en que se administra la carragenina. Estudios reportados (Labrecque y col., 1981) señalan la susceptibilidad o la resistencia que presentan ciertos organismos frente a un agente agresor de acuerdo a la hora del día. El ciclo circadiano influye en la formación del edema inducido con carragenina, esto es, si la administración de carragenina ocurre a las 8:00 P.M., el edema es mayor que cuando la administración es las 9:00 A.M. La diferencia del efecto se atribuye a una mayor concentración de los mediadores de la inflamación (histamina, bradikina, prostaglandinas, etc), mismos que se liberan conforme a un patrón cronobiológico. Considerando la participación de mediadores en cada etapa del desarrollo del edema, otros autores mencionan 4 etapas características (Hwang y col., 1986), la primera fase (0 -1.5 h) sería controlada por la liberación de mediadores de la inflamación como la histamina y la serotonina. En la segunda fase (1.5-2.5 h) participarían las cininas y finalmente una tercera fase (después de 2.5h) sería regulada por las prostaglandinas. Una cuarta fase en el desarrollo del edema involucra al proceso con la biosíntesis de los leucotrienos (Holsapple y Yim, 1984).

El factor activador de plaquetas es un mediador de naturaleza lipídica liberado por la estimulación de los neutrófilos, basófilos, macrófagos alveolares, plaquetas y células endoteliales. En los animales tratados con carragenina se ha demostrado la biosíntesis del factor activador de plaquetas así como de agentes que son antagonistas de este factor, tal es el caso de la kadsurenona que inhibe el desarrollo de la primera fase de formación del edema, lo que permite establecer que el factor activador de plaquetas es un mediador que se libera en la primera fase (Hwang y col., 1986). Por otra parte, estudios realizados con antiinflamatorios esteroidales y no-esteroidales demuestran que estos fármacos inhiben exclusivamente la segunda fase en la inducción del edema con carragenina (Vinegar y col., 1987).

Los estudios de carácter histológico realizados con tejido de dermis y de epidermis, aunque no señalan alteraciones celulares evidentes a los 20 min después de la administración subplantar de la carragenina, a las 3 h muestran gran cantidad de neutrófilos alrededor de los vasos sanguíneos de la dermis, proceso conocido como "respuesta inflamatoria fagocítica" (RIF). Los cambios celulares producidos antes de 60 min se clasifican como componentes de la respuesta inflamatoria no-fagocítica (RINF).

El mecanismo de acción de la carragenina se vincula con el sistema inmunológico. La secuencia de los procesos propuestos por Vinegar son los que se describen a continuación (Vinegar y col., 1987).

Secuencia de los procesos involucrados en la respuesta inflamatoria

1. Inyección subplantar de la carragenina (t_0)
2. Absorción de pequeñas partículas de carragenina por células cebadas (t_0 - $t_{10 \text{ min}}$)
3. Daño a células cebadas por carragenina (t_0 - $t_{10 \text{ min}}$)
4. Inicio del metabolismo del AA (t_2 - $t_{10 \text{ min}}$)
5. Síntesis de PG responsables de la hiperalgesia (t_2 - $t_{10 \text{ min}}$)
6. Degranulación de células cebadas (t_2 - $t_{10 \text{ min}}$)
7. Liberación de serotonina que provoca vasodilatación y en consecuencia hiperemia (t_2 min- $t_{10 \text{ días}}$)
8. Hipoalgesia producida por la serotonina liberada (t_2 - $t_{60 \text{ min}}$)
9. Gradiente osmótico (dependiente de carragenina) establecido entre el sitio de inyección y el tejido que lo rodea (t_2 - $t_{50 \text{ min}}$)
10. Desarrollo gradual del tercer factor del edema ocasionado por fuerzas de tipo osmóticas (t_2 - $t_{50 \text{ min}}$)
11. Citotoxicidad a células endoteliales causado por la absorción de la carragenina (t_{30} - $t_{240 \text{ min}}$)
12. Liberación de IL-1 por las células dañadas (t_{30} - $t_{240 \text{ min}}$)
13. Alteración de la superficie del tejido endotelial dañado, causado por la liberación de IL-1 (t_{60} - $t_{240 \text{ min}}$)
14. Adhesión de neutrófilos a la superficie del endotelio dañado (t_{60} - $t_{240 \text{ min}}$)
15. Diapedesis de los neutrófilos (t_{60} - $t_{240 \text{ min}}$)
16. Atracción de los neutrófilos al sitio dañado mediante quimiotaxis de una enzima liberada por las células dañadas (t_{60} - $t_{240 \text{ min}}$)
17. Fagocitosis de la carragenina por los neutrófilos (t_{60} - $t_{240 \text{ min}}$)

18. Daño a las vacuolas de los neutrófilos ocasionado por la carragenina (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
19. Fusión de lisosomas a las vacuolas dañadas (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
20. Degranulación de los lisosomas dentro de las vacuolas (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
21. Daño a la membrana de las vacuolas ocasionado por una enzima lisosomal (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
22. Liberación intracelular de enzimas lisosomales por los neutrófilos (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
23. Daño enzimático ocasionado a la membrana de los neutrófilos (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
24. Liberación de enzimas lisosomales de los neutrófilos en el tejido dérmico (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
25. La fosfolipasa A_2 libera AA de los fosfolípidos de la membrana del tejido dérmico (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
26. Síntesis y liberación de PG de los neutrófilos (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
27. La PG incrementa la permeabilidad de las células endoteliales así como también la sensibilidad de las terminaciones nerviosas locales (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
28. Desarrollo del edema y de hiperalgesia (t_{60} - $t_{240\text{min}}$)
29. Alteración la superficie del endotelio por los neutrófilos (t_7 - $t_{12\text{h}}$)
30. Adherencia de los monocitos al endotelio (t_7 - $t_{12\text{h}}$)
31. Diapedesis de los monocitos (t_7 - $t_{12\text{h}}$)
32. Quimiotaxis de los monocitos (t_7 - $t_{12\text{h}}$)
33. Fagocitosis de los neutrófilos por los monocitos (t_7 - $t_{48\text{h}}$)
34. Interrupción del proceso de formación del edema (t_7 - $t_{24\text{h}}$)
35. Disminución del edema (t_7 - $t_{24\text{h}}$)
36. Disminución de hiperemia (t_{24} - $t_{72\text{h}}$)
37. Estimulación del fibroblasto y proliferación del tejido vascular de la dermis (t_2 - $t_{8\text{d}}$)
38. Incorporación de monocitos en el nuevo tejido (t_6 - $t_{15\text{d}}$)
39. La dermis vuelve a su estado normal ($t_{15\text{d}}$)
40. Formación de edema extracelular en la epidermis (t_4 - $t_{48\text{h}}$)
41. Hiperplasia en la epidermis (t_{12} - $t_{36\text{h}}$)
42. Hiperqueratosis de la epidermis (t_2 - $t_{20\text{d}}$)
43. La epidermis vuelve a su estado normal ($t_{20\text{d}}$)

Al inicio de la **RINF**, las células cebadas absorben pequeñas partículas de carragenina las cuales ejercen un efecto citotóxico sobre las células y consecuentemente, éstas liberan las enzimas que activan el metabolismo del ácido araquidónico y la síntesis de prostaglandinas, éstas últimas, son mediadores de la hiperalgesia. Posteriormente, la degranulación de las células cebadas liberan serotonina que produce vasodilatación, hiperemia e hipoalgesia. En el sitio de la inyección y del tejido circundante se forma un gradiente osmótico que depende de la concentración de la carragenina administrada.

La **RIF** (de 1 a 4 h después de administrada la carragenina) ocurre como resultado de la interacción de la carragenina con las células del endotelio y que trae como consecuencia la liberación de IL-1. La IL-1 altera la superficie del endotelio de tal manera que las células dañadas son un blanco para los neutrófilos. A su vez, los neutrófilos fagocitan a la carragenina y en el proceso, estos sufren un daño irreversible y liberan fosfolipasa A₂ la cual activa el mecanismo del ácido araquidónico, consecuentemente se libera **PG**. La **PG** tiene como función aumentar la permeabilidad celular e incrementar la sensibilidad de las terminales nerviosas en la dermis formando edema y provocando la hiperalgesia. Por otra parte, se produce una mayor afluencia de monocitos que fagocitan a su vez los neutrófilos dañados, esta interacción interrumpe la formación del edema, disminuye la hiperemia y la hiperalgesia. Los monocitos en su forma de macrófagos forman parte del tejido reconstituído a los 20 días después de la administración de carragenina.

ANTECEDENTES SOBRE *ACHILLEA MILLEFOLIUM* L.

Generalidades

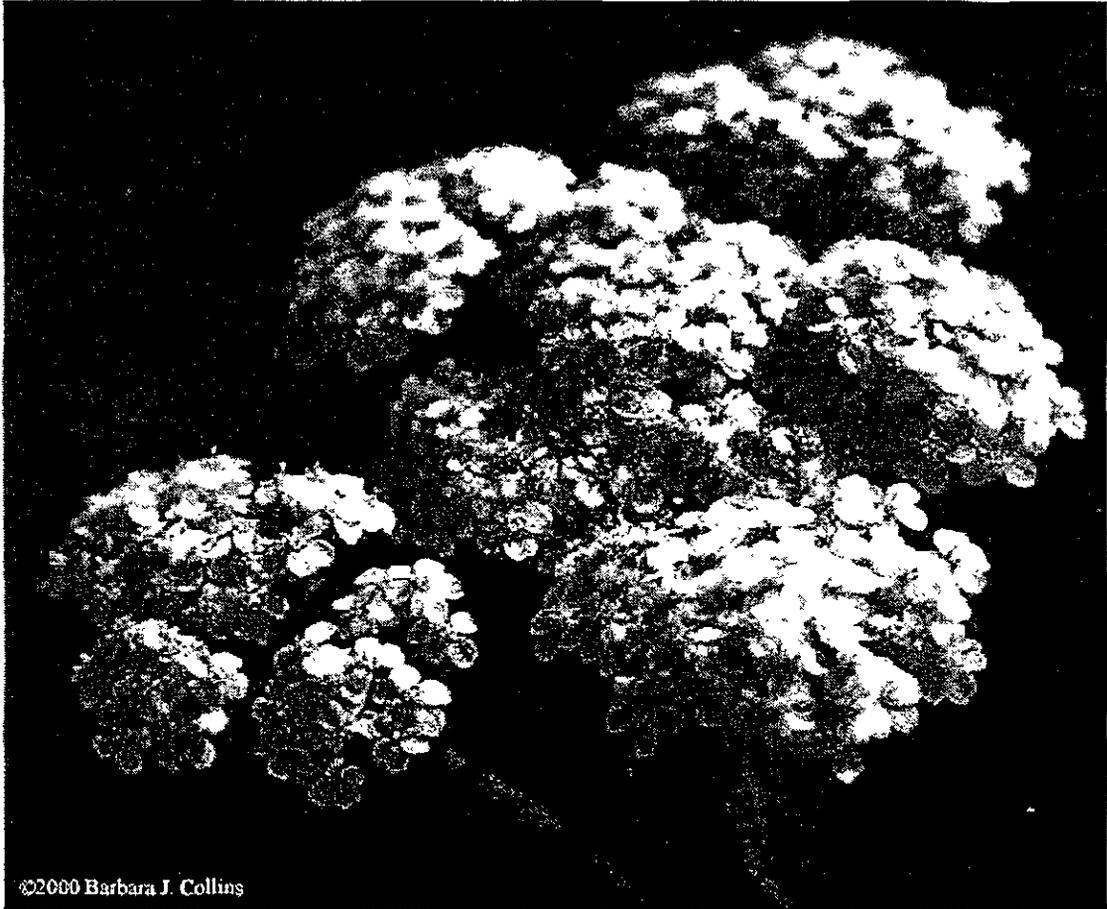
Achillea millefolium es una especie que pertenece a la familia Compositae y popularmente se conoce con el nombre de ciento en rama, hecosh (Chiapas), mil en rama, necotes (Chiapas), plumajillo, plumajo, plumilla, real de oro. (Aguilar-Contreras y col., 1998)

En la República Mexicana se distribuye en Baja California, Chiapas, Durango, Estado de México, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Veracruz y en el Distrito Federal (Aguilar-Contreras y col., 1998).

Aspectos botánicos y etnobotánicos

Achillea millefolium es una hierba perenne de 30 cm a 1 m de altura, de tallos vellosos con hojas partidas de 5 a 15 cm de largo que semejan plumas, sus flores son blancas y muy abundantes. Crece en zonas templadas del país y es aromática con un olor agradable (Figura 3) (Aguilar-Contreras y col., 1998).

Los usos en la medicina tradicional de varios países son para curar heridas, dolor de cabeza, como analgésico, antiinflamatorio, antipirético, para tratar la dismenorrea, la diarrea, el dolor de estómago (Angier, 1978; Grieve, 1974; Hutchens, 1969; Racz-Kotilla y col., 1968). Generalmente, se emplean las hojas y las ramas como infusión o decocción. En nuestro país, el uso que tiene la planta es local para tratar el dolor de oído, en este caso, se colocan las hojas alrededor de la oreja (Aguilar-Contreras y col., 1998). También se usa para combatir la tos, la tos con flemas, tos ferina, alteraciones en el ciclo menstrual y afecciones gastrointestinales (Aguilar y col., 1994).



©2000 Barbara J. Collins

Figura 3. *Achillea millefolium*

Aspectos químicos

Esta especie vegetal ha sido objeto de numerosos estudios desde el punto de vista químico. Los metabolitos aislados y caracterizados incluyen más de 120 compuestos, entre ellos, alcaloides, aminoácidos, alcanidas, flavonoides, compuestos fenólicos simples, terpenoides, esteroides y muchos otros metabolitos (Chandler y col., 1982a). En el cuadro 4 se describen los distintos compuestos químicos aislados de *Achillea millefolium* de acuerdo a su estructura química y algunos ejemplos de estos metabolitos se ilustran en el esquema 3 (Chandler y col., 1982a).

Aspectos farmacológicos

Achillea millefolium es una especie vegetal que ha sido objeto de diversas investigaciones a nivel biológico, se ha reportado anteriormente que posee actividad larvicida (Lalonde y col., 1980); actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Mycobacter phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* (McCutcheon y col., 1992); actividad repelente contra el mosquito *Aedes aegypti* (Tunón y col., 1994); actividad antitumoral *in vivo* en células de ratón P-338 con leucemia (Tozyo y col., 1994); también se ha encontrado un efecto antiespermatogénico en pruebas realizadas con ratones (Montanari y col., 1998); y un efecto inhibitorio de la germinación de semillas (Thorsell y col., 1998).

Alcaloides	Achiceína, achilleína, achillettina, , betaína, betonicina, colina, estaquidrina, homostaquidrina, moschatina, trigonelina
Aminoácidos	Acido glutámico, alanina, histidina, leucina, lisina
Alcamidas	Isobutilamida, piperideidos
Flavonoides	Apigenina, luteolina, rutina (ramnoglucósido de quercetina), hispidulina (5,7,4'-trihidroxi-6- metoxiflavona), isorhamnetina (3,5,7,4'-tetrahidroxi-5'-metoxiflavona), 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona, casticina (5,3'-dihidroxi-3,6,7,4'- tetrametoxiflavona), artemetina (5- hidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona), nepetina, cirsilineol, cirsidol, salvigenina, quercetina, 6- hidroxiluteolina-6,7,3',4'-tetrametil- éter. <u>Otros:</u> C-glicosilflavonas, flavonol-3-O- glucósidos, flavona 7-O-glicósidos, glicósidos de apigenina, 7-glicósidos de luteolina, glucósidos de quercetina.

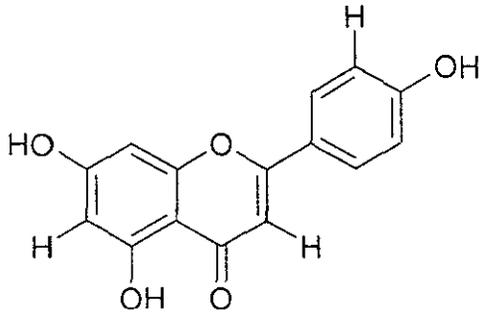
Cuadro 4.

Constituyentes químicos de Achillea millefolium

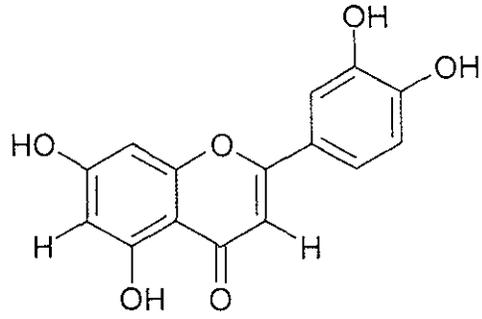
Fenólicos simples	Acido caféico, ácido vainílico
Terpenoides	<p><u>Monoterpenos</u>: allo-ocimeno, borneol, acetato de bornilo, canfeno, canfor, 1,8-cineol, cimeno, cuminaldehído, eugenol, limoneno, mentol, mirceno, α y β pinenos, sabineno, α-terpineno, terpinen-4-ol, terpinoleno.</p> <p><u>Sesquiterpenos</u>: azuleno, cadineno, chamazuleno, ácido chamazulen-carboxílico, copaeno, farneseno, humuleno, ácido achillímico.</p> <p><u>Lactonas sesquiterpénicas</u>: achillicina, achillina, hidroxiachillina, 8-acetoxiartabsina, 2,3-dihidro-deacetoximatricina, achillifolina, millefina, millefólido, balchanólido, acetilbalchanólido, dehidropartenólido, leucodina, matricarina, desacetil-matricarina, achillina-8α-acetoxi-artabsina, austricina.</p> <p><u>Triterpenos</u>: α y β amirina, acetato de α amirina, taraxasterol, pseudo-taraxasterol.</p>
Esteroles	β -sitosterol, sitosteril, 3 α -glucósido, campesterol, estigmasterol, colesterol.

Cuadro 4 (continuación).

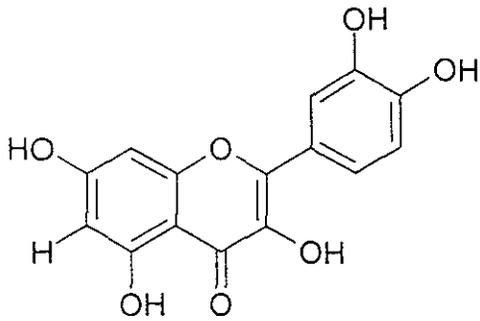
Constituyentes químicos de *Achillea millefolium*. Las partes aéreas de la especie vegetal contienen alcaloides, aminoácidos, alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos simples, terpenoides y esteroides.



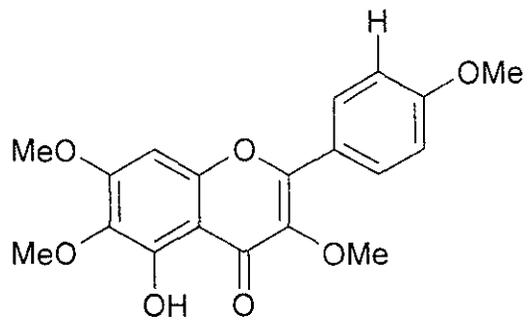
apigenina



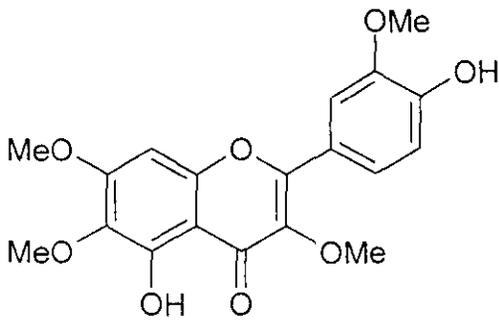
luteolina



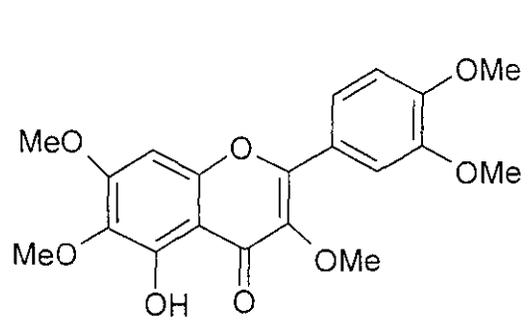
quercetina



5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona



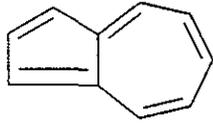
casticina



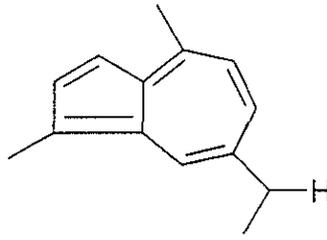
artemetina

Esquema 3.

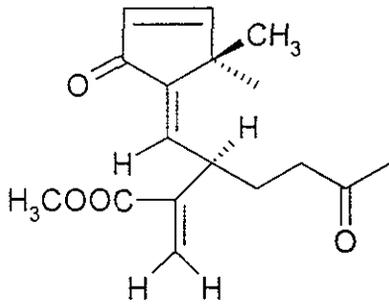
Metabolitos aislados de Achillea millefolium. Apigenina, luteolina, quercetina, 5-hidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona, casticina y artemetina son algunos ejemplos de flavonoides presentes en las partes aéreas de la planta.



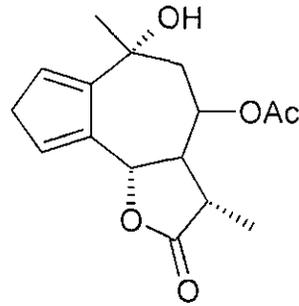
azuleno



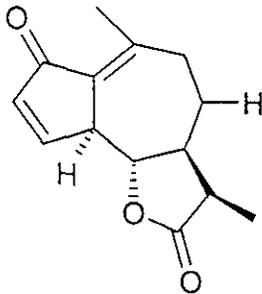
chamazuleno



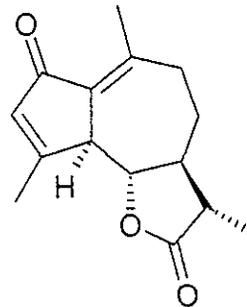
ácido achillímico



achillicina



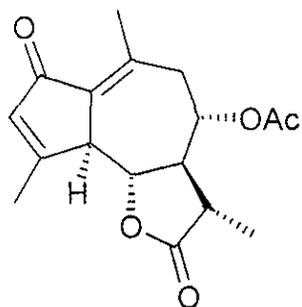
achillina



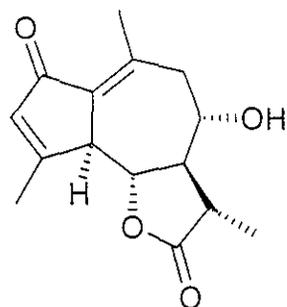
leucodina

Esquema 3 (continuación)

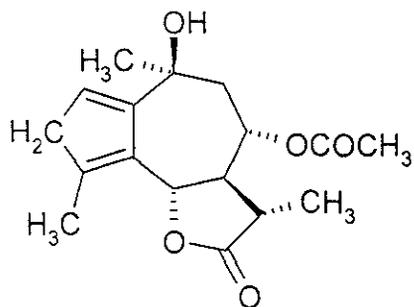
Metabolitos aislados de *Achillea millefolium*.



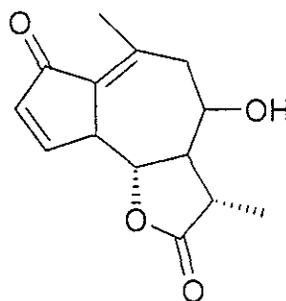
matricarina



desacetilmatricarina



achillicina-8 α -acetoxi-artabsina



austricina

Esquema 3 (continuación)

Metabolitos aislados de Achillea millefolium. Azuleno, chamazuleno y el ácido achilímico pertenecen a los llamados sesquiterpenos; achillicina, achillina, leucodina, matricarina, desacetilmatricarina, matricarina, achillicina-8 α -acetoxi-artabsina y austricina forman parte de las lactonas sesquiterpénicas presentes en las partes aéreas de la planta.

Los antecedentes descritos llevaron a la propuesta del estudio del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta, utilizando como prueba para determinar la actividad biológica, el edema plantar de la rata inducido con carragenina.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del extracto metanólico de *Achillea millefolium* sobre el edema plantar de la rata inducido con carragenina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Revisar en la literatura científica la información sobre la especie.
- Preparar el extracto vegetal.
- Implementar el modelo del edema plantar en la rata para medir el efecto antiinflamatorio.
- Determinar la potencia del efecto del extracto vegetal.
- Realizar el fraccionamiento químico biodirigido del extracto metanólico.
- Evaluar el efecto de las fracciones en el modelo biológico.
- Detectar el o los principios activos en las fracciones.

HIPOTESIS

- La evaluación químico-farmacológica del extracto metanólico de *Achillea millefolium*, especie medicinal seleccionada con base en un criterio etnobotánico, puede llevar a corroborar la supuesta actividad antiinflamatoria atribuída a la planta.
- El fraccionamiento químico biodirigido conducirá a la identificación de los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria.

JUSTIFICACION

La búsqueda de principios bioactivos a partir de productos naturales es un hecho bien documentado (Hamburguer, 1991; Ghisalberti, 1993; Hosttetman y Marton, 1990; Kinghorn y col., 1995) y aunque en la actualidad existe gran interés por investigar otras fuentes naturales (flora y fauna marina), las plantas continúan siendo un recurso importante para la obtención de agentes terapéuticos. En este sentido, la biodiversidad de la flora mexicana ofrece numerosas posibilidades en la búsqueda de nuevos fármacos.

En este contexto, la especie *Achillea millefolium* podría ser un candidato para obtener fármacos con actividad antiinflamatoria, ya que el uso de esta planta en nuestro país es una alternativa terapéutica para tratar padecimientos relacionados con un proceso inflamatorio.

P

ARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL VEGETAL

La especie en etapa de floración fue colectada en el mes de agosto de 1998 en el Estado de Puebla e identificada botánicamente por la M. en C. *Abigail Aguilar*, Jefa del Herbario de Plantas Medicinales del IMSS (IMSSM). Un ejemplar fue registrado con el número 13044.

Las partes aéreas de la planta se secaron a temperatura ambiente y a 37% de humedad, bajo corriente de aire y protegido el vegetal de la acción directa de la luz solar. El material seco y molido (348.32 g) se extrajo vía maceración con metanol (3 x 6 L), el disolvente se evaporó a presión reducida y se obtuvieron 73.42 g (21.08% de rendimiento con respecto al peso seco de la planta) del extracto.

MODELO EXPERIMENTAL ANIMAL

La metodología utilizada en el estudio se basó en un modelo anteriormente reportado en la literatura científica (Chattopadhyay y col., 1994). Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 150 a 200 g. Los animales se mantuvieron con acceso libre al agua. La medición del edema inducido por medio de la administración plantar de carragenina (tipo IV, Lambda; Sigma, USA) se realizó con ayuda de un Pletismómetro 7140 Ugo Basile. Después de registrar 5 mediciones introduciendo en la celda la pata trasera hasta la articulación tibio-tarsal, se determinó el volumen promedio del líquido desplazado. Para el estudio se consideró una desviación estándar respecto a la media cercana al 10%.

Para las determinaciones, se emplearon grupos de 5 a 8 animales incluyendo un grupo control (tratado únicamente con el vehículo) y un grupo problema (tratado con el extracto o con las fracciones). El extracto se evaluó a las dosis de 50, 100, 200, 300 y 400 mg/Kg administradas por vía intraperitoneal (i.p.), para las fracciones F1, F2, F3-1 y F4-2 se emplearon dosis de 100 mg/Kg (i.p.) y en el caso de las fracciones F3, F4, F4-3, F5 y F6 la dosis administrada fue de 200 mg/Kg (i.p.). El extracto crudo se solubilizó en el vehículo, esto es, una mezcla DMSO-EtOH-H₂O (1:1:4) y en el caso de las fracciones, éstas se solubilizaron en 100% de dimetilsulfóxido (DMSO), considerando un volumen de DMSO inyectado al animal < 200 µL. En el estudio se incluyó la determinación del efecto de la fenilbutazona sódica (aq) como el fármaco de referencia (Sigma, USA, P-8386) y se administró en dosis de 20, 60 y 80 mg/Kg (i.p.). Después de 60 min, a los animales se les inyectaron en la zona plantar de la pata trasera 0.1 mL de una solución al 1% carragenina (aq.). La medición del edema producido se determinó a las 3, 5, 24, 48 y 72 horas después de la administración de la carragenina; sin embargo, para la determinación del comportamiento bifásico de la carragenina, las mediciones se realizaron al inicio cada 10 minutos durante la primera hora y a los 120 y 180 minutos siguientes.

Análisis de los Datos

Los resultados se expresaron como el porcentaje de inhibición del edema obtenido empleando la siguiente ecuación (Otterness y Moore, 1988):

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\Delta' \text{ (mL)}}{\Delta_c \text{ (mL)}} \times 100\% - 100$$

El edema para cada rata tratada con el anti-inflamatorio se calculó como la diferencia del volumen después de administrar la carragenina y al iniciar el estudio (Δ mL). La inhibición del edema se expresó como porcentaje respecto al valor promedio del grupo control (Δ_c mL). El valor DI_{50} (dosis a la cual se inhibe en un 50% el efecto) para el extracto y la fenilbutazona, se calculó por una curva no lineal mediante el programa Sigma PL NONLIN.

FRACCIONAMIENTO QUÍMICO

Siguiendo el diagrama de flujo (Diag. 1), se realizó el fraccionamiento del extracto metanólico de *A. millefolium* empleando cromatografía de adsorción en columna abierta, empacada con gel de sílice (Kieselgel 60, 0.063- 0.200 mm, 70-230 mesh ASTM) y como fase móvil, mezclas de disolventes con polaridad creciente (hexano, hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-metanol y metanol). En la columna se sembraron 5.09 g del extracto previamente solubilizados en metanol y adsorbidos en sílica gel, y se eluyeron un total de 56 fracciones de 125 mL cada uno (c/u) (Tabla 1).

Las fracciones se concentraron a presión reducida y posteriormente se combinaron de acuerdo a la similitud que presentaban sus constituyentes en la cromatografía en placa delgada (CCD) con gel de sílice y los sistemas de elución que se indican en la tabla 2.

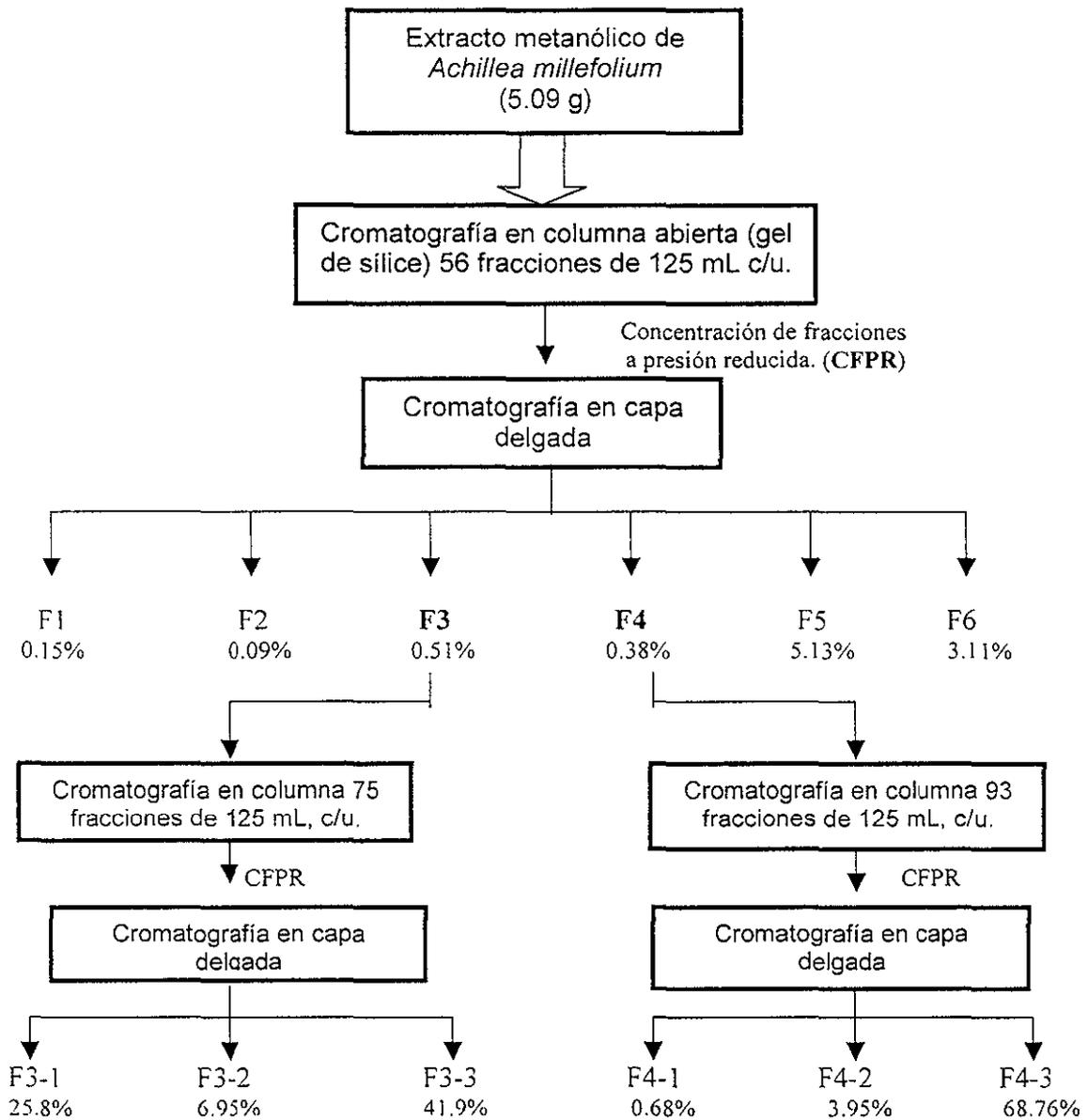


Diagrama 1.

Diagrama de flujo del fraccionamiento químico de *Achillea millefolium*. Las fracciones primarias que presentaron el mayor rendimiento con respecto al peso seco de la planta fueron F5 y F6; las fracciones secundarias F3-3 y F4-3, fueron las que presentaron un mayor rendimiento respecto a las fracciones F3 y F4 respectivamente.

Tabla 1

Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *A. millefolium*

Eluyente	Proporción de los eluyentes	Fracciones eluidas
hexano	100	1-12
hexano-CHCl ₃	50:50	13-29
CHCl ₃	100	30-41
CHCl ₃ -MeOH	50:50	42-55
MeOH	100	56-57

Tabla 2

Combinación de las fracciones de acuerdo a la similitud cromatográfica

Clave	Fracciones combinadas	Rendimiento % **
F1	13	0.15
F2	14-19	0.09
F3	20-23	0.51
F4	24-40	0.38
F5	41-46	5.13
F6	47-56	3.11

** respecto al peso seco de la planta.

Fraccionamiento secundario de la fracción F3

El fraccionamiento secundario de la fracción primaria F3 (546 mg) se realizó en cromatografía de adsorción en columna abierta empacada con gel de sílice (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM) y como fase móvil se emplearon sistemas de polaridad creciente (hexano, hexano-acetato de etilo y metanol), se eluyeron un total de 75 fracciones de 250 mL c/u (tabla 3). Las fracciones obtenidas se concentraron a presión reducida y se combinaron de acuerdo a la similitud observada en CCD. Las placas se revelaron con H₂SO₄ (aq) al 10% o con vainillina etanólica al 1% en H₂SO₄ al 5%. (tabla 4)

Tabla 3

Fraccionamiento secundario de la fracción F3

Eluyente	Proporción de los eluyentes	Fracciones eluidas
hexano	100	1-4
hexano-AcOEt	95:5	5-20
hexano-AcOEt	90:10	21-69
hexano-AcOEt	80:20	70-73
MeOH	100	74-75

Tabla 4

Combinación de las fracciones de acuerdo a la similitud cromatográfica

Clave	Fracciones combinadas	Cantidad (g)	Rendimiento** %
F3-1	21-69	0.141	25.8
F3-2	17-20	0.038	6.95
F3-3	70-73	0.229	41.9

** con respecto a F3

Fraccionamiento secundario de la fracción F4

El fraccionamiento secundario de F4 se realizó por cromatografía de adsorción en columna abierta empleando como fase estacionaria gel de sílice (Kieselgel 60, 0.063- 0.200 mm, 70-230 mesh ASTM) y como fase móvil sistemas de elución de polaridad creciente (hexano, hexano-cloroformo, cloroformo, cloroformo-metanol y metanol). De la fracción F4 (2.5 g), se eluyeron 93 fracciones de 125 mL c/u (Tabla 5). Las fracciones se concentraron a presión reducida y posteriormente se combinaron de acuerdo con la similitud que presentaban sus constituyentes en CCD (Tabla 6).

Tabla 5

Fraccionamiento secundario de F4

Eluyente	Proporción de los eluyentes	Fracciones eluidas
hexano	100	1-5
hexano-CHCl ₃	75:25	6-31
hexano-CHCl ₃	50:50	32-51
hexano-CHCl ₃	25:75	52-65
CHCl ₃	100	66-81
CHCl ₃ -MeOH	50:50	82-89
MeOH	100	90-93

Tabla 6

Combinación de las fracciones de acuerdo a la similitud cromatográfica

Clave	Fraciones combinadas	Cantidad (g)	% Rendimiento**
F4-1	7-9	0.0170	0.68
F4-2	10-81	0.0988	3.95
F4-3	82-88	1.7191	68.76

** respecto a la fracción F4.

R RESULTADOS

En la fig. 4 se ilustra el comportamiento que tiene la carragenina como agente inflamatorio en la formación del edema plantar en el transcurso de cinco horas. En el grupo control, el edema aumentó de manera gradual en la primera hora, pero entre los 120 y 180 min se observó un incremento abrupto. A las 24 horas, los animales recuperaron los valores iniciales antes de la administración de la carragenina (valores no ilustrados).

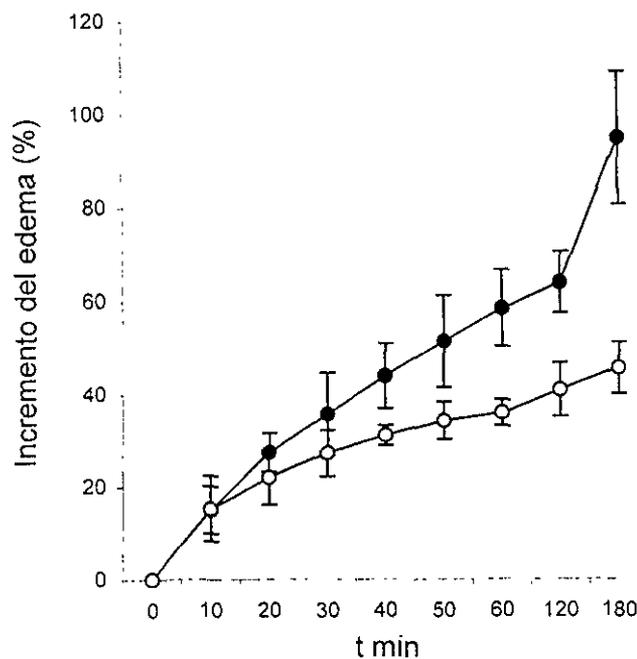


Figura 4

Comportamiento bifásico de la carragenina. La gráfica ilustra los valores después de la administración de la carragenina (1%, 100 μ l), expresados como % respecto al volumen del líquido desplazado en $t=0$. Curva control (●) es el grupo de animales tratados únicamente con el vehículo (DMSO-EtOH-H₂O) (i.p.) 1 hora antes de la administración de carragenina, cada punto corresponde al promedio \pm DS de $n=8$ animales y (○) curva que corresponde al grupo de animales tratados con una dosis de 400 mg/kg del extracto metanólico de *A. millefolium*, 1 hora antes de la administración de carragenina ($n=6$).

En el grupo tratado con una dosis de 400 mg/kg (i.p) del extracto metanólico de *A. millefolium*, los valores registrados a partir de los 20 min. después de administrar la carragenina, fueron inferiores a los respectivos de la curva control y se observó 65.5% de inhibición del edema a las tres horas.

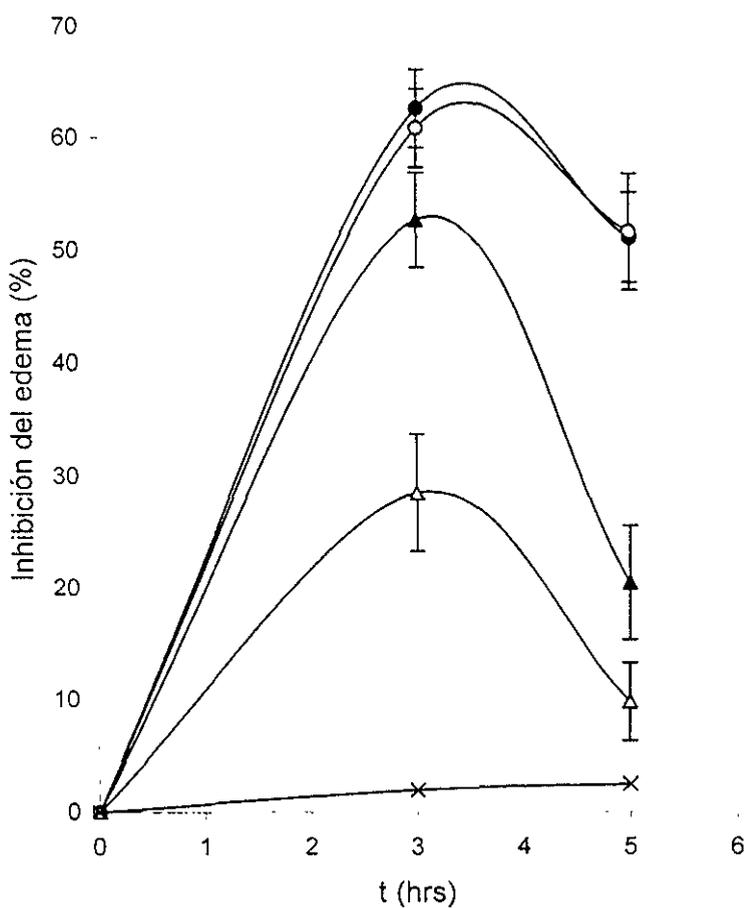


Figura 5

Efecto de diferentes dosis del extracto sobre el edema inducido con carragenina. La gráfica muestra el porcentaje de inhibición del edema que producen diferentes dosis del extracto metanólico de *A. millefolium* (●) 400 mg/kg; (○), 300 mg/kg; (▲), 200 mg/kg; (△), 100 mg/kg, respecto al grupo control (x). Las mediciones se realizaron a las 3 y 5 horas después de la administración de 100 μ L de carragenina. Cada punto en la curva es el promedio \pm DS de n= 6 animales.

En la figura 5, se ilustra el efecto inhibitor que produce el extracto metanólico de la planta a las concentraciones de 100, 200, 300 y 400 mg/kg (i.p.) registrado a las 3 y 5 horas después de la administración de la carragenina. Respecto al grupo control, el extracto produjo a estas concentraciones un efecto máximo de 28.54%, 52.69%, 60.88% y 62.64% respectivamente a las 3 horas. Tanto en el grupo control como en el grupo de los animales tratados con el extracto, se observó una tendencia a la recuperación de los niveles iniciales a partir de las 5 horas. A las 3 horas, la diferencia entre los valores para las dosis de 300 y 400 mg/kg no fue significativa.

ACTIVIDAD DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *ACHILLEA MILLEFOLIUM*

Con base en los resultados anteriormente señalados, para la determinación de la potencia del efecto antiinflamatorio del extracto y del fármaco de referencia, los valores se registraron a las 3 horas después de administrar la carragenina.

Tabla 7

Potencia del efecto anti-inflamatorio del extracto metanólico y fenilbutazona

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	% Inhibición (n=8)	DI ₅₀ (mg/kg)
<i>Achillea millefolium</i>	0	0	239.2
	50	5.05± 2.33	
	100	28.54± 3.43	
	200	52.69± 6.25	
	300	60.88± 8.87	
	400	62.64± 3.61	
Fenilbutazona	0	0	64.57
	20	26.44± 5.78	
	60	57.05± 1.70	
	80	69.68± 9.62	

En la tabla 7, se reporta la inhibición del edema con diferentes dosis del extracto metanólico de *A. millefolium* (50-400 mg/kg) y de la fenilbutazona (20-80 mg/kg). El valor DI_{50} (concentración del producto que inhibe en un 50% el efecto máximo) para el extracto fue de 239.2 mg/kg, valor que resultó ser 4 veces inferior a la potencia determinada para la fenilbutazona (DI_{50} = 64.57 mg/kg). En la literatura, el valor DI_{50} reportado para este fármaco es de 53.5 mg/kg (Chattopadhyay y col., 1994).

En otra serie de estudios se evaluó el efecto del extracto en el transcurso de 3 días, administrando por vía i.p. una concentración de 400 mg/kg (tabla 8). La actividad máxima inhibidora alcanzada con el extracto fue de 62.64% a las 3 horas, valor que disminuyó a 51.07% a las 5 horas y se mantuvo en estos niveles hasta las 24 horas, disminuyendo a las 48 horas a un 36.71% y finalmente alcanzó un valor de 11.34% a las 72 horas de administrada la carragenina. Los grupos de los animales tratados con el extracto y con el vehículo presentaron un comportamiento aparentemente normal y no se registró mortalidad.

FRACCIONAMIENTO QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO

Debido a que el extracto metanólico de *A. millefolium* presentó efecto antiinflamatorio, se procedió a realizar el fraccionamiento químico. A partir del fraccionamiento del extracto por cromatografía en columna abierta se obtuvieron 6 grupos de fracciones primarias (tabla 2) siendo las fracciones F5 y F6 las que presentaron el mayor rendimiento con respecto al peso seco de la planta (5.13 % y 3.11 % respectivamente), mientras que las fracciones de menor rendimiento fueron F1 y F2 (0.15 % y 0.09 % respectivamente). Para llevar a cabo la evaluación biológica de las fracciones, fue necesario obtener una mayor cantidad de la muestra, situación que llevó a repetir el fraccionamiento químico siguiendo la metodología ya mencionada.

De acuerdo con el perfil cromatográfico en CCD y empleando como agente revelador 10 % de ácido sulfúrico (aq), los constituyentes en F1 podrían ser compuestos de baja polaridad; F2 es una fracción semipura de dos compuestos mayoritarios que correlacionan con el β -sitosterol y el triterpenoide β -amirina (Esq. 4), caracterizados anteriormente en estudios químicos realizados con la misma especie (Fernández, 2001; Jiménez y col., enviado a publicación). En la fracción F3 se detectaron fundamentalmente lactonas sesquiterpénicas y trazas de β -sitosterol. Los compuestos mayoritarios en la fracción F4 son de naturaleza flavonoide y las fracciones F5 y F6 constituyen una mezcla de compuestos glicosídicos, entre ellos se detectó β -D-glucositosterol, sacarosa y glucosa.

EFFECTO DE LAS FRACCIONES PRIMARIAS SOBRE EL EDEMA INDUCIDO

La tabla 8 muestra el efecto que producen sobre el edema el extracto metanólico (400 mg/kg) y las fracciones primarias F1, F2 (100 mg/kg); F3, F4, F5, F6 (200 mg/kg). Las observaciones se prolongaron por 72 horas y las dosis empleadas en estos estudios se realizaron fundamentalmente de acuerdo con la cantidad de fracción disponible. En la figura 6 se ilustra el porcentaje de inhibición del edema

que produjeron 400 mg/kg del extracto metanólico y 200 mg/kg de las fracciones F3, F4, F5 y F6.

Tabla 8

Efecto antiinflamatorio del extracto y de las fracciones primarias

Especie	Dosis (mg/Kg)	% inhibición (n=6-8)				
		3hrs	5hrs	24hrs	48hrs	72hrs
Extracto metanólico	400	62.64	51.07	50.09	36.71	11.34
F1	100	12.0	4.3	27.2	0	0
F2	100	54.2	45.7	25.6	0	0
F3	200	50.85	58.38	52.09	15.07	0
F4	200	30.25	37.52	44.91	0	0
F5	200	27.33	15.01	53.02	31.15	0
F6	200	17.04	13.28	42.99	37.80	38.46

De las fracciones primarias evaluadas, a 200 mg/kg la que presentó mayor efecto fue F3, actividad cercana a la que presentan 100 mg/kg de F2. A las 3 horas el efecto inhibitor de F3 fue de 50.85 % y alcanzó un valor máximo de 58.38 % a las 5 horas, a las 48 horas el efecto fue cercano al inicial (15.07 %) desapareciendo completamente a las 72 horas. Por otra parte, las fracciones F4 y F5 fueron menos activas, el edema disminuyó en un 30.25% a las 3 horas y con ambas fracciones se observó a las 24 horas un incremento de la actividad hasta un 44.91% y 53.02% respectivamente. El efecto inhibitor únicamente perduró hasta las 48 horas con la fracción F5.

La fracción F6 presentó un comportamiento diferente al del extracto y las fracciones F3, F4 y F5. En este caso, el efecto inhibitor se produjo a partir de las 24 horas prolongándose hasta las 72 horas del estudio.

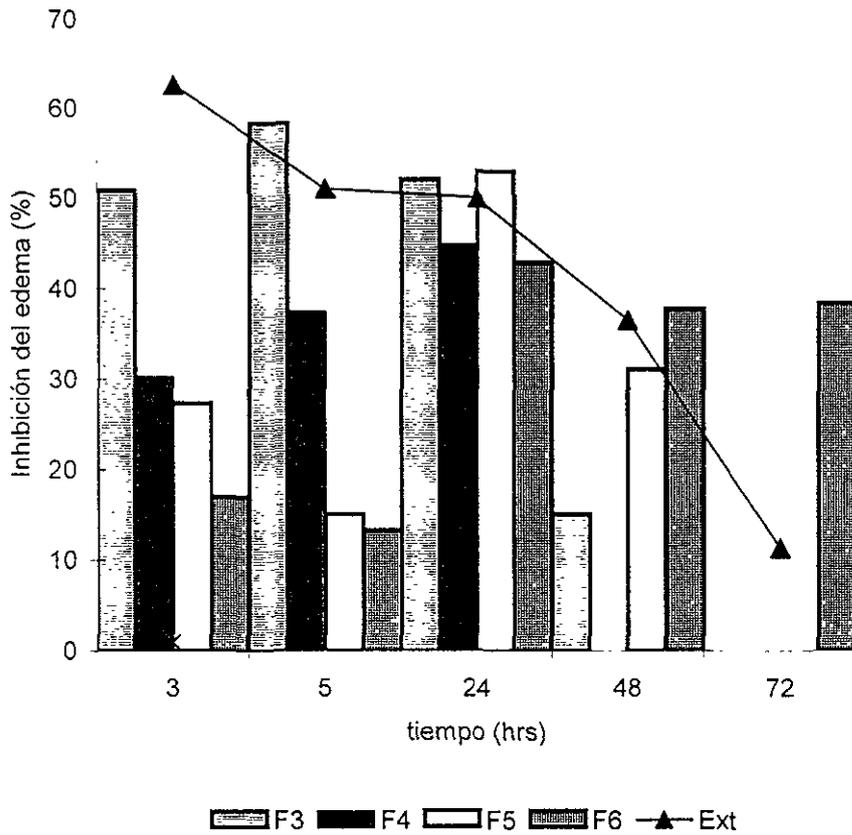


Figura 6

Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto de *Achillea millefolium* y de las fracciones primarias. El gráfico ilustra el comportamiento que tienen 400 mg/kg del extracto metanólico (▲) y 200 mg/kg de las fracciones primarias F3, F4, F5 y F6, obtenidas por separación cromatográfica en columna abierta. Las determinaciones se realizaron a lo largo de 72 horas después de administrar la carragenina (1%, 100 μ L). Los valores para cada barra representan el promedio \pm DS de 5 animales.

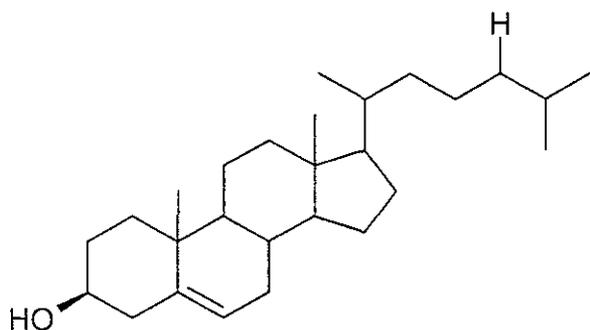
En la figura 7 se muestra el efecto inhibitor que poseen las fracciones F1 y F2 a una dosis de 100 mg/kg. La fracción F2 presentó un efecto inhibitor de 54.2% a las 3 horas, disminuyó ligeramente a partir de las 5 horas (45.7%) teniendo un valor de 25.6% a las 24 horas, para desaparecer a las 48 horas. Por otra parte, la actividad de la fracción F1 fue menor con un 12% de inhibición a las 3 horas, valor que aumentó a un 27% a las 24 horas para desaparecer completamente a las 48 horas.

En la misma figura, se observa que de todas las fracciones evaluadas, F2 a una concentración de 100 mg/kg, fue la fracción que presentó un efecto similar al observado para el extracto metanólico.

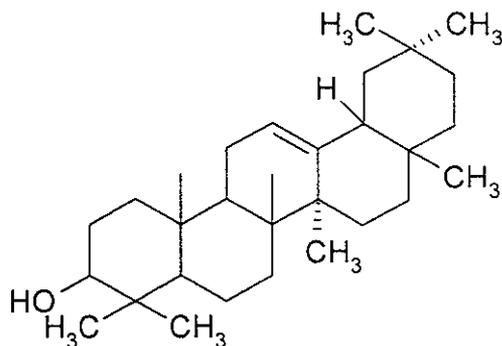
FRACCIONAMIENTO SECUNDARIO DE LAS FRACCIONES F3 Y F4

Considerando los antecedentes sobre el contenido de lactonas sesquiterpénicas en la fracción F3, de flavonoides en la fracción F4 y la actividad antiinflamatoria que ya ha sido reportada para este tipo de compuestos (Alcaraz y col., 1987; Hall y col., 1980), se procedió a la obtención de mayor cantidad de estas fracciones y a su posterior separación cromatográfica en columna.

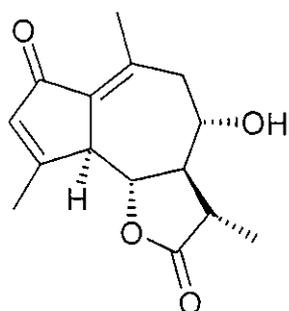
En la tabla 4 se muestran las subfracciones separadas por recromatografía de F3. Como resultado de este procedimiento se obtuvo la subfracción F3-1 con un rendimiento de 25.8%, las fracciones F3-2 y F3-3 presentaron un rendimiento de 6.95% y 41.9% respectivamente. De acuerdo con el perfil cromatográfico en placa delgada y empleando como agentes reveladores vainillina etanólica al 1% y ácido sulfúrico etanólico al 5%, se detectó un complejo de lactonas sesquiterpénicas. Por comparación de los tiempos de retención en cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con las lactonas sesquiterpénicas puras, aisladas y caracterizadas estructuralmente en estudios previos (Fernández, 2001; Jiménez y col., enviado a publicación), se identificó la presencia de matricarina, desacetilmatricarina y de leucodina (Esq 4).



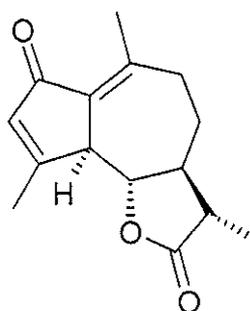
β -sitosterol



β -amirina



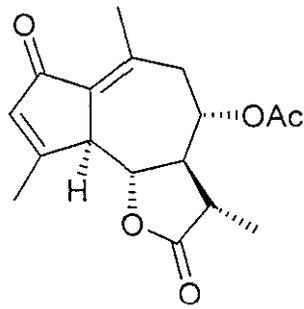
desacetilmatricarina



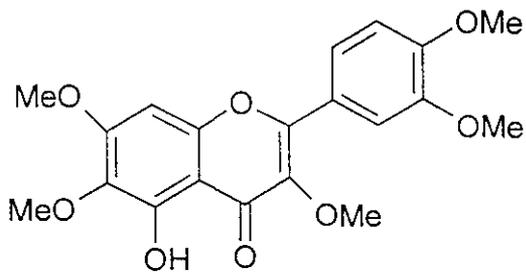
leucodina

Esquema 4.

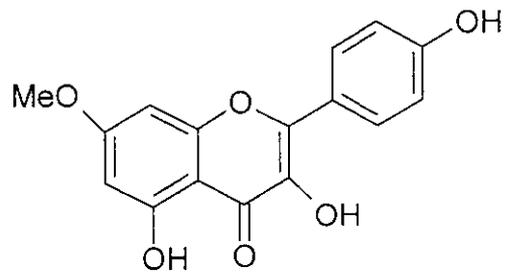
Metabolitos secundarios identificados en las fracciones activas. Los constituyentes químicos detectados en las fracciones activas fueron identificados por medio de la comparación de algunos parámetros (R_f en placa delgada y t_r en CLAR), establecidos para los compuestos puros aislados previamente de *Achillea millefolium* (Jiménez y col., 2001).



matricarina



artemetina



7-metil-éter-canferol

Esquema 4 (continuación)

Metabolitos secundarios identificados en las fracciones activas F3 y F4.

Como se ilustra en la tabla 6, la recromatografía de la fracción F4 dió como resultado la obtención de 3 fracciones secundarias, siendo la fracción F4-3 la que presentó un mayor rendimiento (68.76 %), la F4-2 con un rendimiento de 3.95 % y finalmente la fracción F4-1 de menor rendimiento (0.68 %.)

De acuerdo con el perfil cromatográfico en placa fina, empleando como agentes reveladores, 10% de H₂SO₄ (aq) al 10 % y el reactivo *Natural Products-polyethylenglycol (NP/PEG)*, F4-1 contiene una serie de compuestos, probables grasas; en la F4-2 se detectó un compuesto amarillo no fluorescente de probable naturaleza flavonoide y en la fracción F4-3 se detectó una mezcla de dos flavonoles, artemetina identificada por CLAR y comparación con el compuesto puro aislado y caracterizado anteriormente (Fernández, 2001; Jiménez y col., enviado a publicación) y metil-éter-canferol que probablemente corresponda al 7-metil-éter-canferol ya caracterizado (Jiménez y col., enviado a publicación) (Esquema 4). De las fracciones secundarias obtenidas, aquellas que presentaron un efecto inhibidor fueron F3-1, F4-2 y F4-3.

ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES SECUNDARIAS

Tabla 9

Efecto de las fracciones secundarias F3 y F4

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	% Inhibición del edema				
		3 hrs	5 hrs	24 hrs	48 hrs	72 hrs
F3-1	100	0	0	56.78	25.76	0
F4-2	100	36.2	5.87	19.8	22.5	0
F4-3	200	36.83	18.19	10.0	0	0

La tabla 9 ilustra que la fracción F3-1 no mostró efecto antiinflamatorio inmediato, a las 24 horas la inhibición fue de un 56.78% y de 25.76% a las 48 horas, para desaparecer a las 72 horas.

La fracción F4-2 tuvo un efecto máximo de 36.2% a las 3 horas y disminuyó a 19.8% a las 24 horas, sosteniéndose estos valores hasta las 48 horas. Con respecto a F4-3, el efecto máximo se observó a las 3 horas con un valor de 36.83%, a las 5 horas el efecto fue de 18.19% y disminuyó a 10% a las 24 horas, para desaparecer a las 48 horas.

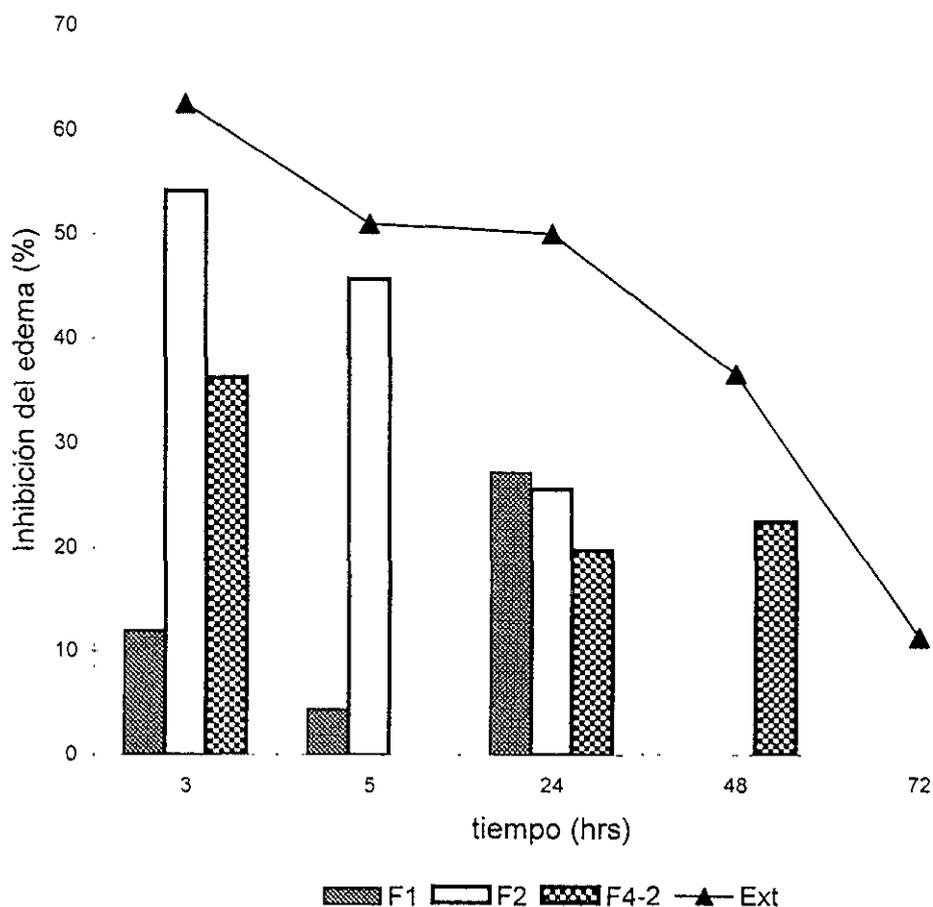


Figura 7.

Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto de Achillea millefolium y de las fracciones. El gráfico ilustra el comportamiento a lo largo de 72 horas después de administrada la carragenina, del extracto metanólico a una dosis de 400 mg/kg y de las fracciones F1, F2, F3-1 y F4-2 a una dosis de 100 mg/Kg.. Los valores para cada barra representan el promedio \pm D S de 5 animales.

DISCUSSION

Achillea millefolium es una planta medicinal utilizada en varios países como un antiinflamatorio, en el presente estudio se demostró que el extracto metanólico de las partes aéreas inhibe el edema inducido con carragenina en la región plantar de la rata.

El efecto máximo del extracto, administrado en concentraciones variables, se registró a las tres horas después de haber inyectado la carragenina y con una potencia que resultó ser cuatro veces menor a la de la fenilbutazona, uno de los fármacos que en la actualidad no es un antiinflamatorio de elección en la clínica por sus efectos secundarios, pero que, debido a su absorción rápida, es utilizado como referencia en los estudios de tipo agudo. Cabe señalar que la actividad de *A. millefolium*, a una dosis de 100 mg/kg i.p. tuvo un efecto comparable al reportado para igual dosis de *Arnica montana* (Mascolo y col., 1987), una de las plantas europeas de mayor uso como antiinflamatorio a nivel mundial.

Es conocido que la carragenina produce una respuesta bifásica en la formación del edema, observándose un aumento gradual del proceso en la primera hora. En los estudios realizados, este comportamiento bifásico se reprodujo y el extracto modificó la respuesta inicial a partir de los 40 min. La primera fase involucra la participación de mediadores tales como la histamina y la serotonina liberadas por las células cebadas. Por tal razón, se puede considerar que el efecto inhibitor que presenta el extracto de *A. millefolium* podría actuar también a nivel de estos mediadores. Sin embargo, es necesario realizar estudios más específicos para determinar el mecanismo de acción.

A las tres horas se produjo un incremento abrupto del edema; en este tiempo, el extracto inhibió el proceso en un 65%. El efecto podría involucrar mecanismos relacionados con la producción de citocinas como la IL-1 que promueven a los neutrófilos a fagocitar la carragenina y a liberar enzimas como la fosfolipasa A2, activando de esta manera el metabolismo del ácido araquidónico y la producción de prostaglandinas y de leucotrienos.

Finalmente, el edema en los animales del grupo control disminuyó a partir de los 240 min, probablemente como consecuencia de la afluencia de monocitos hacia la zona afectada, mismos que fagocitan a los neutrófilos, interrumpiendo así la formación del edema.

En el presente estudio, el fraccionamiento químico biodirigido del extracto metanólico condujo a la obtención de tres fracciones activas, la fracción F2 con un contenido de β -sitosterol y de β -amirina. Estos metabolitos han sido anteriormente identificados en la especie *A. millefolium* (Chandler y col., 1982b; Jiménez y col., enviado a publicación) y la actividad antiinflamatoria ha sido anteriormente evaluada (Recio y col., 1995; Safayhi y Sailer, 1997). La actividad antiinflamatoria del triterpeno β -amirina perteneciente a la serie del tipo oleanano ha sido evaluada en los modelos del edema plantar inducido con carragenina o con acetato de tetradecanoil forbol (TPA) en la oreja, demostrándose que la β -amirina no tiene actividad sobre el edema inducido con carragenina. Estos antecedentes permiten asumir que la inhibición del edema producido por la fracción F2 se debe al contenido de β -sitosterol (Recio y col., 1995). Además, en la literatura se reporta para β -sitosterol una DI_{50} de 155 mg/kg en el modelo del edema plantar de la rata (Rasadah y col., 1998) y en el presente estudio una dosis de 100 mg/kg de la fracción inhibió el edema en un 54.2% .

Un grupo de tres lactonas sesquiterpénicas en la fracción F3 presentó una actividad tardía después de seis horas de su administración, con una concentración de 100 mg/kg el efecto registrado a las 24 horas fue de 56.78%.

En la mezcla de lactonas presentes en la fracción primaria F3 se detectaron matricarina, desacetilmatricarina, éste último compuesto como ya se mencionó anteriormente, ha sido reportado por su actividad antialérgica (Ho y col., 1998). Leucodina, es otro de los constituyentes presentes en la mezcla, sobre este compuesto no hay antecedentes de su actividad biológica. Los resultados en este trabajo, con relación al efecto presentado por la mezcla de guaianólidas, no permite establecer si matricarina y leucodina participan de manera sinérgica en la actividad detectada.

La mezcla de los flavonoles artemetina y el 7-metil-éter-canferol (F4-3) presentes en la fracción F4 presentó un efecto rápido (menos de 24 horas) y de menor intensidad que las fracciones activas arriba mencionadas. Anteriormente se mencionó acerca de las propiedades antiinflamatorias de artemetina, se ha reportado una DI_{50} de 67.07 mg/kg en el modelo del edema plantar inducido con carragenina (Sertié y col., 1990), potencia mayor a la que se obtuvo con el producto utilizado en el presente estudio. La diferencia podría deberse a la vía oral de administración utilizada en el estudio reportado o bien, a la presencia del metil-éter-canferol en la mezcla. La cantidad insuficiente del material, no permitió concluir al respecto. En la fracción F4-2 se detectaron otros probables flavonoides, fracción que tampoco presentó actividad importante.

La composición heterogénea del extracto metanólico de *Achillea millefolium* y la actividad de las fracciones aisladas, permite hasta el momento atribuir el efecto inhibitorio sobre el edema inducido con carragenina, fundamentalmente a la presencia del β -sitosterol y de las lactonas sesquiterpénicas de la serie matricarina (11- α Me). Los estudios realizados permiten sustentar en cierta medida, el uso de la planta para tratar padecimientos que se relacionan con un proceso inflamatorio.

CONCLUSIONES

- En el presente estudio se demostró la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de las partes aéreas de *Achillea millefolium* mediante la evaluación del producto vegetal sobre el edema plantar de la rata inducido con carragenina.
- El fraccionamiento químico biodirigido del extracto activo permitió la identificación de los siguientes metabolitos: β -sitosterol, β -amirina, desacetilmatricarina, matricarina, leucodina, artemetina y 7-metil-éter-canferol.
- De los constituyentes químicos identificados, la mezcla de β -sitosterol y de β -amirina demostró tener una mayor actividad inhibidora sobre el edema inducido, el complejo de las lactonas sesquiterpénicas constituido por desacetilmatricarina, matricarina y leucodina, demostró actividad aunque en una fase tardía, y la mezcla de los dos flavonoles no demostraron una actividad antiinflamatoria significativa ya que inhibieron el edema con una menor intensidad a la del esteroles y las lactonas sesquiterpénicas.
- Conforme se fraccionó el extracto, se observó un incremento en la actividad; sin embargo, debido a que no se llevaron a cabo los estudios con los compuestos puros, no se puede asumir si uno o varios compuestos son los responsables de la actividad antiinflamatoria o si es el resultado de un efecto sinérgico.
- La presente investigación químico-farmacológica constituye una contribución adicional para el conocimiento de la actividad biológica de la especie vegetal *Achillea millefolium*.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

Abad, M. J., Bermejo, P., Valverde, S., Villar, A. Anti-inflammatory activity of hydroxyachillin, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. *Planta Med*, 60: 228-231 (1994)

Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jáquez, P., López, M. E. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica*. 1ª Edición. México. pp 253 (1994)

Aguilar-Contreras, A., Camacho-Pulido, J. R., Chino-Vargas, S., Jáquez-Ríos, P., López-Villafranco, M. E. *Plantas Medicinales del Herbario IMSS: Su distribución por enfermedades*. 1ª Edición. México: Grupo Roche Syntex de México, S.A de C.V. pp 74 (1998)

Alcaraz, M. J., Jiménez, M. J. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Fitoterapia*, 59: 25-38 (1988)

Anderson, W., Harthill, J.E., Zeitlin, I.J. Structure activity in the carrageenans: iota- carrageenan and experimental oedemagenic activity. *J Pharm Pharmacol*, 36: 808-813 (1984)

Angier, B. *Field Guide to Medicinal Wild Plants*. Stackpole Books, Harrisburg, PA, pp. 314-318 (1978)

Bauman, J., von Bruchhausen, F., Wurm, G. Flavonoids and related compounds as inhibitor of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins*, 20: 627-639 (1980)

Calixto, J. B., Beirith, A., Ferreira, J., Santos, A. R., Filho, V. C., Yunes, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res*, 14: 401-418 (2000).

Castro, F., Wagner, H., Lombardi, J. A., Oliveira, A. B. Screening Brazilian plant species for *in vitro* inhibition of 5-lipoxygenase. *Phytomed*, 6: 447-452 (2000)

Chandler, R.F., Hooper, S.N., Harvey, M.J. Ethnobotany and Phytochemistry of Yarrow, *Achillea Millefolium*, Compositae. *Econ Bot*, 36(2): 203-223 (1982a)

Chandler, R. F., Hooper, S. N., Hooper, D. L., Jamieson, W. D., Flinn, C. G., Safe, L. M. Herbal remedies of the maritime Indians: sterols and triterpenes of *Achillea millefolium* L. (Yarrow). *J Pharm Sci*, 71(6): 690-693 (1982b)

Chattopadhyay, R.R., Sarkar, S.K., Ganguly, S., Basu, T.K. A comparative evaluation of some anti-inflammatory agents of plant origin. *Fitoterapia*, LXV (2): 146-148 (1994).

Clissold, S. P. Aspirin and related derivatives of salicylic acid. *Drugs*, 32: 8-26 (1986)

Dewitt, D. L., Smith, W. L. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85: 1412-1416 (1988)

Fernández, J. *Efecto Antimicrobacteriano e Inmunomodulador de los Metabolitos Secundarios de Achillea millefolium (Asteraceae)*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM (2001)

Fu, J. M., Masferrer, J. L., Seibert, K., Raz, A., Needleman, P. The induction and supression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem*, 265: 16737-16740 (1990)

Ghisalberti, E. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. In *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination*. Colegate, S and Molyneux, R., (Eds), CRC Press, U.S.A., pp 10-49 (1993)

Goldberg, A. S., Mueller, E. C., Eigen, E., Desalva, S. J. Isolation of the antiinflamatory principles from *Achillea millefolium* (Compositae). *J Pharm Sci*, 58(8): 938-941 (1969)

Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. Kuby Immunology, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 10, 380-391 (2000).

Gómez, M. A., Sáenz, M. T., García, M. D., Fernández, M. A. Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. *Z. Naturforsch*, 54: 937-941 (1999)

Grieve, M. A Modern Herbal. Hafner, New York (1974)

Gupta, M. B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., Bhargava, K. P. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. *Planta Med*, 39(2): 157-163 (1980)

Hall, I. H., Starnes, C. O., Lee, K. H., Waddell, T. G. Mode of action of sesquiterpene lactones. *J Pharm Sci*, 69: 537-543 (1980)

Hass, H. History of antipyretic analgesic therapy. *Am J Med*, 75: 1-3 (1983)

Hamburguer, M., Hosttetman, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, 30(12): 3864-3874 (1991)

Ho, C., Choi, E. J., Yoo, G. S., Kim, K. M., Ryo, S. Y. Desacetylmatricarin, an anti-allergic component from *Taraxacum platycarpum*. *Planta Med*, 64: 577-578 (1998).

Holsapple, M. P. y Yim, G. K. W. Therapeutic reduction of ongoing carrageenin induced inflammation by lipooxygenase, but not cyclooxygenase inhibitors. *Inflammation*, 8: 223 (1984)

Hosttetman, K., Martson, A. Bioactive constituents of plants used in African traditional medicine. *Studies in natural products chemistry*, 7:405-437 (1990)

Hutchens, A. R. Indian Herbage of North America. Merco, Windsor, Ontario (1969)

Hwang, S.B., Lam, M.H., Li, Ch.L., Shen, T.Y. Release of platelet activating factor and its involvement in the first phase of carrageenin-induced rat foot edema. *Eur J Pharmacol*, 120: 33-41 (1986).

Insel, P. A. Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents: drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis ang gout. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman and Gilman's Ed), Pergamon Press, pp. 654 (1990).

Jiménez, A.A., Fernández, L. H., Meckes, F. M., Fernández, J. R. R. Chemical and biological studies from *Achillea millefolium*. (enviado a publicación)

Kargman, S., Charleson, S., Cartwright, M. Characterization of prostaglandin G/H synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology*, 111:445-454 (1996)

Kinghorn, A.D. Novel strategies for plant-derived anticancer agents. *Int J Pharmacog*, 33: 48-58 (1995)

Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W., Herschmann, H. R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cell, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, 266: 12866-12872 (1991)

Labrecque, G., Doré, F., Bélanger, P.M. Circadian variation of carrageenan-paw edema in the rat. *Life Sciences*, 28: 1337-1343 (1981).

Lalonde, R.T., Wong, C. F., Hofstead, S. J., Morris, C. D., Gardnet, L. C. N-(2-methyl-propyl)-(E,E)-2,4-decadienamido: a mosquito larvicide from *Achillea millefolium*. *J Chem Ecol*, 6: 35-48 (1980)

Lichtenstein, D.R., Wolfe, M.M. COX-2-selective NSAIDs: new and improved? *JAMA*, 284 No 10 (2000)

Lim, D. Host-Parasite Relationships In: *Microbiology*, McGraw-Hill, USA, pp. 448-452 (1998)

Lypsky, P.E. Defining COX-2 inhibitors. *J Rheumatol Suppl*, 60: 13-6 (2000)

Mascolo, N., Autore, G., Capasso, F., Menghini, A., Fasulo, M. P. Biological screening of italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. *Phytother Res*, 1(1): 28-31(1987)

Masferrer, J. L., Zweifel, B. S., Seibert, K., Needleman, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxine in mice. *J Clin Invest*, 86: 1375-1379 (1990)

McAdam , B.F., Catella-Lawson, F., Mardini, S., Lawson,J.A., FitzGerald, G.A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human

pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci*, 96:272-277 (1999)

McCutcheon, A. R., Ellis, S. M., Hancock, R. E. W., Towers, G. H. N. Antibiotic screening of medicinal plants of the native british Columbian native peoples. *J Ethnopharm*, 37: 213-223 (1992)

Merck Index, 11a Ed, Ed Merck & Co., Inc. U.S.A. pp 284 (1989)

Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O. Purification of prostaglandin endoperoxidase synthase from bovine vesicular gland microsomes. *J Biol Chem*, 251: 2629-2636 (1976)

Montanari, T., de Carvahlo, J. E., Dolder, H. Antispermatogetic effect of *Achillea millefolium* L. in mice. *Contraception*, 58(5): 309-313 (1998)

Müller-Jakic, B., Walter, B., Pröbstle, A., Redl, K., Greger, H., Bauer, R. In vitro inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkamides from *Echinacea* and *Achillea* species. *Planta Med*, 60: 37-40 (1994)

Needelman, P., Isakson, PC. The discovery and function of COX-2. *J Rheumatolog*, 24: 9-14 (1997)

Norton, W. L., Meisinger, M. A. An overview of nonsteroidal antiinflammatory agents (NSAIA). *Inflammation*, 2:37-46 (1997)

O'Banion, M. K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, 13: 45-82 (1999)

Otterness, I. G., Moore, P. F. Carrageenan foot edema test. *Methods in Enzymology*, 162:320-327 (1988)

Racz-Kotilla, E., Adam, S., Calin, D. Protective effect of certain antiulcer medicines associated with azulene on experimental gastric ulcers. *Rev Med (Targu-Mures)*, 14: 331-334 (1968)

Rasadah, M. A., Houghton, P. J., Raman, A., Houtt, J. R. S. Antimicrobial and antiinflammatory activities of extracts and constituents of *Oroxylum indicum* (L.) Vent. *Phytomed*, 5(5): 375-381 (1998)

Recio, M. C., Giner, R. M., Máñez, S., Ríos, J. L. Structural requirements for the anti-inflammatory activity of natural triterpenoids. *Planta Med*, 61: 182-185 (1995)

Robbers, J. E. y Tyler, V. E. In *Herbs of Choice: The Therapeutic Use of Phytomedicinals*. Haworth Press Inc: New York; 199-209 (1999)

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. Immunology. Mosby, Barcelona, pp. 1.3-1.7, 14.1-14.9 (1996)

Safayhi, H., Sabieraj, J., Sailer, E. R., Ammon, H. P. T. Chamazulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B₄ formation. *Planta Med*, 60: 410-413 (1994)

Safayhi, H., Sailer, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med*, 63: 487-493 (1997)

Sertié, J. A. A., Basile, A. U., Panizza, S., Matida, A. K., Zelnik, R. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. *Planta Med*, 56: 36-40 (1990)

Thorsell, W., Mikiver, A., Malander, I, Tunón, H. Efficacy of plant extracts and oils as mosquito repellents. *Phytomed*, 5(4): 311-323 (1998)

Tozyo, T., Yoshimura, Y., Sakurai, K., Uchida, N., Takeda, Y., Nakai, H., Ishii, H. Novel antitumor sesquiterpenoids in *Achillea millefolium*. *Chem Pharm Bull*, 42: 1096-1100 (1994)

Trease. G. E., Evans, W. C. In *Pharmacognosy*. Bailliére Tindall: London: 527-620 (1978)

Tunón, H., Thorsell, W., Bohlin. Mosquito repelling activity of compounds occurring in *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). *Econ Bot*, 48(2): 111-120 (1994)

Vinegar, R., Schreiber, W., Hugo, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 166 (1): 96-103 (1969).

Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J.L., Johnston, P.R., Venable, A.L., McKenzie, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc*, 46: 118-126 (1987)

Walker, J. S. NSAID: an update on their analgesic effects. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 22: 855-860 (1995)

Xie, W., Chipman, J. G., Robertson, D. L., Erikson, R. L., Simmons, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 2692-2696 (1991)

Xu, X-M., Sansores-García, L., Chen, X-M., Matijevic-Aleksic, N., Du, M., Wu, K. K. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5292-5297 (1999)