



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA  
ESCORZONERA (*Perezia multiflora*) EN RATAS (*Rattus norvegicus*).”**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**PRESENTADO POR**

**MARIA DEL ROCIO CHUQUI REMACHE**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2013**

## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo investigativo, está dedicado a Dios por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy.*

*A **mis padres; Daniel y Olga** gracias, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera, y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí.*

*A **mis hermanos**, Cristian, Luis, Alexandra, Diana y Jhonny por su cariño y compañía.*

*A **Carlos**, por su amor, apoyo incondicional y paciencia, y a todos quienes participaron para la culminación de esta meta.*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por brindarme la vida y la oportunidad de compartir mis logros con mis seres queridos

Agradezco con mucho Amor a mis padres, hermanos y esposo por su apoyo incondicional.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, por haberme formado como profesional y persona.

Quiero agradecer profundamente a mi directora de tesis Dra. Cumadá Játiva por su paciencia y por sus conocimientos que han sido el pilar fundamental para la culminación de mi trabajo.

Al Dr. Francisco Portero gracias por sus enseñanzas, su valiosa colaboración y asesoramiento en la presente Tesis

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

# ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

## FACULTAD DE CIENCIAS

### ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que El trabajo de investigación: “EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA ESCORZONERA (*Perezia multiflora*) EN RATAS (*Rattus novergicus*).” de responsabilidad de la señorita egresada María del Rocío Chuqui Remache, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Silvio Álvarez Luna DECANO FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dr. Iván Ramos DIRECTOR ESCUELA	-----	-----
Dra. Cumandá Játiva DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Dr. Francisco Portero MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Dr. Jacinto Mera MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----
NOTA DE TESIS	-----	

Yo, **María del Rocío Chuqui Remache**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados, expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la tesis de grado pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

---

**MARIA DEL ROCIO CHUQUI REMACHE**

## INDICE DE ABREVIATURAS

<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>AIES</b>	Antiinflamatorios Esteroideos
<b>AINES</b>	Antiinflamatorios No Esteroideos
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CAM</b>	Complejo de Ataque a la Membrana
<b>CCDA</b>	Citotoxicidad Celular Dependiente del Anticuerpo
<b>COX</b>	Enzima Ciclooxygenasa
<b>Conc</b>	Concentrado
<b>Cmax.</b>	Concentración máxima
<b>Cm</b>	Centímetro
<b>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub></b>	Benceno
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo
<b>CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H</b>	Ácido fórmico glacial
<b>EtOAc</b>	Acetato de etilo
<b>FAP</b>	Factor Activador de plaquetas
<b>FCNK</b>	Factor citotóxico
<b>FcXII</b>	Factor Hageman
<b>HHT</b>	Ácido Hidroxiheptadecatrienoico
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitario Humano
<b>HCO<sub>2</sub>H</b>	Ácido acético
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>Ig</b>	Inmunoglobulinas
<b>IFN o INF</b>	Interferones
<b>IL</b>	Interleucinas
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>LB</b>	Linfocitos B
<b>5-LOX</b>	Enzima 5-lipooxige
<b>LT</b>	Leucotrienos
<b>LT</b>	Linfocitos T

<b>MDA</b>	Ácido Malondialdehído
<b>MFP</b>	Moléculas Formadores de Poros
<b>MHC</b>	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
<b>MHC-I</b>	Genes de clase I
<b>MHC-II</b>	Genes de clase II
<b>MHC-III</b>	Genes de clase III
<b>MIF</b>	Factor de Migración de los Macrófagos
<b>Mm</b>	Milímetro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mg</b>	Miligramo
<b>Min</b>	Minuto
<b>Nm</b>	Nanómetro
<b>NK</b>	Células Asesinas Naturales
<b>n-buOH</b>	n-butanol
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>pH</b>	Potencial hidrógeno
<b>PGI</b>	Prostaciclina
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>R1</b>	Primera repetición
<b>R2</b>	Segunda repetición
<b>R3</b>	Tercera repetición
<b>RFE</b>	Real Farmacopea Española
<b>Rf</b>	Franja de referencia
<b>SC</b>	Sistema del Complemento
<b>TC</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>TH</b>	Linfocitos T cooperadores

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>TNF<math>\beta</math></b>	Factor $\beta$ de transformación del crecimiento
<b>TPA</b>	12-O-tetradecanoílforbol-13-acetato
<b>TXA</b>	Tromboxanos
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina
<b>T1</b>	Extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg
<b>T2</b>	Extracto hidro-alcohólico 46,03 mg/Kg
<b>T3</b>	Subextracto Clorofórmico 5,303 mg /Kg
<b>T4</b>	Subextracto Butanólico 11,77 mg/Kg
<b>T5</b>	Subextracto Etéreo 2,32 mg/Kg

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE GRÁFICOS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	1
1.1 Inflamación.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.2 Inflamación Aguda.....	2
1.3 Inflamación crónica.....	3
1.3.1 Inflamación crónica granulosa.....	4
1.4. Mecanismos que intervienen en inflamación.....	5
1.4.1. Migración leucocitaria.....	5
1.4.2 Mediadores celulares.....	6
1.4.3 Mediadores químicos.....	6
1.4.4 El factor activador de plaquetas.....	7
1.4.5 El óxido nítrico.....	7
1.4.6 Enzimas lisosomales.....	8
1.4.7 Las especies reactivas del oxígeno.....	8
1.5 Tratamientos empleados en procesos inflamatorios.....	10
1.6 Fármacos antiinflamatorios.....	10
1.6.1 Antiinflamatorios no esteroideos.....	10
1.6.2 Antiinflamatorios esteroideos.....	11
1.7 Diclofenaco sódico.....	12
1.7.1 Acción sobre prostaglandinas.....	13
1.7.2 Acción sobre los leucotrienos.....	13

1.7.3	Acción directa sobre el ácido araquidónico.....	13
1.8	Modelo de inflamación aguda inducida con carragenina.....	14
1.9	Extracciones botánicas.....	16
1.9.1	Métodos de extracción.....	16
1.9.2	Clasificación de los extractos.....	18
1.9.3	Fundamento del proceso de extracción.....	20
1.10	Escorzonera.....	22
1.10.1	Taxonomía de la Escorzonera.....	23
1.10.2	Estudios realizados .....	24
1.11	Tamizaje fitoquímico.....	25
1.12	Cromatografía en capa fina; definición.....	25
1.12.1	Cromatografía en capa fina.....	25
1.12.2	Reveladores más comunes para cromatografía en capa fina.....	26
1.13	Análisis espectrofotométrico.....	26
1.13.1	Espectrometría.....	26
1.13.2	Espectrometría ultravioleta-visible.....	27
1.14	Ratas ( <i>Rattus norvegicus</i> ).....	28
1.14.1	Clasificación taxonómica.....	28
1.14.2	Descripción de la especie.....	29
2.	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	31
2.1	Lugar de experimentación.....	31
2.2	Materiales, equipos y reactivos.....	31
2.2.1	Material biológico.....	31
2.2.2	Materia prima.....	31
2.2.3	Equipos.....	31
2.2.4	Materiales de laboratorio y otros.....	32
2.2.5	Reactivos.....	32
2.3	Factores de estudio.....	33
2.4	Técnicas y métodos.....	34
2.4.1	Recolección de la materia prima.....	34

2.4.2	Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	34
2.4.3	Procesamiento de materia prima.....	34
2.4.4	Obtención del extracto.....	35
2.4.5	Control de calidad del extracto.....	35
2.5	Tamizaje fitoquímico de la escorzonera.....	38
2.5.1	Ensayo de dragendorff.....	39
2.5.2	Ensayo de libermann-burchard.....	39
2.5.3	Ensayo de borntrager.....	40
2.5.4	Ensayo de baljet.....	40
2.5.5	Ensayo de catequinas.....	40
2.5.6	Ensayo de resinas.....	41
2.5.7	Ensayo de espuma.....	41
2.5.8	Ensayo de cloruro férrico.....	41
2.5.9	Ensayo de shinoda.....	41
2.5.10	Ensayo de antocianidinas.....	42
2.5.11	Ensayo de fehling.....	42
2.6	Diagrama de fraccionamiento del extracto.....	43
2.7	Cromatografía en capa fina.....	44
2.8	Determinación de flavonoides por espectroscopia UV.....	44
2.9	Prueba de edema plantar en rata inducido por carragenina.....	45
2.10	Animales de experimentación.....	47
2.11	Modelo experimental.....	49
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
3.1	Control de calidad de la droga fresca de la Escorzonera.....	51
3.2	Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	51
3.3	Tamizaje fitoquímico de la Escorzonera.....	52
3.4	Propiedades físico químicas del extracto.....	53
3.5	Curva de calibración de quercetina por UV.....	55
3.6	Cromatografía en capa fina de los sub-extracto.....	56
3.7	Actividad antiinflamatoria de los tratamientos en estudio.....	57
3.8	Análisis estadístico.....	58

3.9	Análisis de varianza (ANOVA) para el % de inflamación.....	66
4	<b>CONCLUSIONES</b> .....	71
5	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	73
6	<b>RESUMEN</b> .....	74
	SUMMARY.....	75
7	<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	76
8	<b>ANEXOS</b> .....	89

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No. 1	Mediadores de la inflamación y sus efectos.....	6
TABLA No. 2	Sistema de solventes para cromatografía.....	44

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Esquema utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria...	51
CUADRO No. 2	Tamizaje fitoquímico.....	52
CUADRO No. 3	Determinación de las propiedades físicas y químicas.....	53
CUADRO No. 4	Lectura en el espectrofotómetro de la quercetina.....	55
CUADRO No. 5	Registro de las mediciones de la región subplantar.....	57
CUADRO No. 6	Análisis de varianza para los porcentajes de inflamación.....	67
CUADRO No. 7	Comparación de medias para el porcentaje de inflamación....	68
CUADRO No. 8	Análisis de varianza para los porcentajes de inhibición.....	69
CUADRO No. 9	Comparación de medias para los porcentajes de inhibición.....	69

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No. 1	Curva de calibración del extracto de la escorzonera.....	55
GRÁFICO No. 2	Medición de la región subplantar de las ratas.....	57
GRÁFICO No. 3	Efecto antiinflamatorio a la primera hora de administración...	58
GRÁFICO No. 4	Efecto antiinflamatorio a la segunda hora de administración..	59
GRÁFICO No. 5	Efecto antiinflamatorio a la cuarta hora de admistración.....	60
GRÁFICO No. 6	Efecto antiinflamatorio a la sexta hora de administración.....	60
GRÁFICO No. 7	Efecto antiinflamatorio a la octava hora de administración....	61
GRÁFICO No. 8	Efecto antiinflamatorio a la décima hora de administración....	62
GRÁFICO No. 9	Efecto antiinflamatorio a la doceava hora de administración...	63
GRÁFICO No. 10	Porcentajes de inflamación del edema suplantar. ....	64
GRÁFICO No.11	Porcentajes de inhibición del edema plantar.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Piel.....	1
FIGURA No. 2	Inflamación aguda.....	3
FIGURA No. 3	Inflamacion crónica.....	5
FIGURA No. 4	Mecanismo de acción de los antiinflamatorios .....	12
FIGURA No. 5	Estructura del diclofenaco sódico.....	12
FIGURA No. 6	Esquema de las reacciones a realizar en el extracto.....	38

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Registro de las mediciones de la región subplantar obtenidas a los diferentes tiempos.....	89
-------------	--	----

## ÍNDICE DE FOTOGAFÍAS

FOTOGRAFÍA N <sub>o</sub> . 1	Escorzonera.....	22
FOTOGRAFÍA N <sub>o</sub> . 2	TLC de los sub-extractos de la Escorzonera.....	56



de estos Aines presentan efectos adversos, la población recurre a tratamientos Fitoterapéuticos ya que el uso de plantas trae muchos beneficios, entre los cuales el más apreciado es el de encontrar mejoría, reponiendo o manteniendo sin alterar los delicados equilibrios inherentes al cuerpo.

El 80% de la población ecuatoriana depende del consumo de plantas medicinales y de sus productos, para su salud y bienestar, existen aproximadamente 500 especies de plantas medicinales conocidas. Las plantas medicinales del Ecuador, como en otros países se utilizan de varias formas: como materia prima, en forma de extractos, en forma semipurificada o como sustancias químicas puras o semi-sintéticas. Las plantas medicinales juegan hoy un doble papel, tanto como fuente de salud como de ingresos económicos para cultivadores, comerciantes y manufactureros de medicinas basadas en plantas, es una contribución importante al proceso de desarrollo.

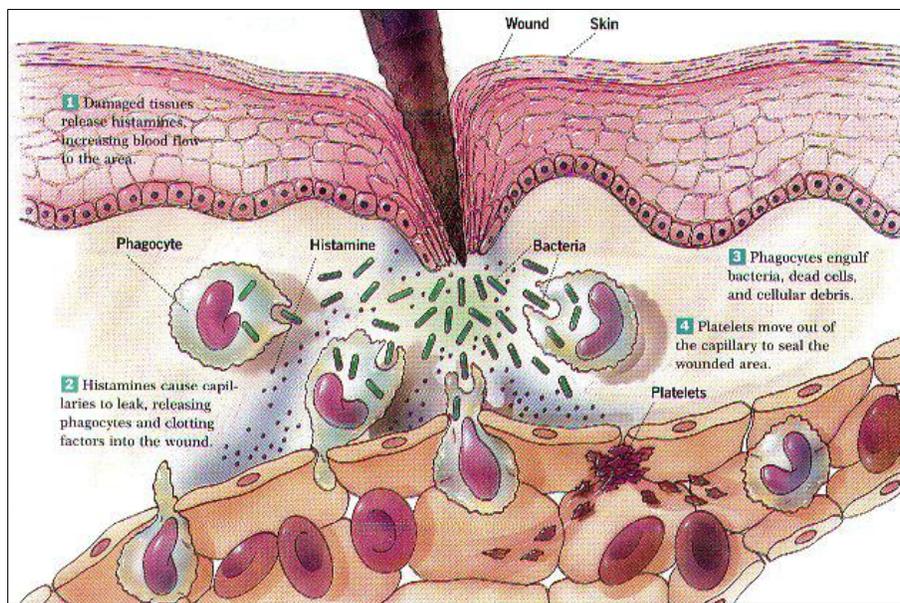
El género *Perezia multiflora* se caracteriza por poseer en su raíz, tallo, hoja y flores metabolitos como flavonoides, alcaloide, fenoles, cumarinas, triterpenos, esteroides etc. que es su composición justifican las propiedades antiinflamatorias del extracto acuoso o etanólico, el mecanismo que se emplea es la inhibición de la liberación de ácido araquidónico del que se deriva las prostaglandinas, inhibe la liberación de tromboxano A<sub>2</sub> plaquetario, e inhibe la formación de trombos. Es así que en el valle del Mantaro (Perú) y la zona de San Andrés (Riobamba –Ecuador) utilizan la Escorzonera para la tos, enfermedades de los pulmones, así por su capacidad, expectorante y antiasmática.

En este trabajo se realiza una evaluación *in vivo* del efecto antiinflamatorio de *Perezia multiflora*, mediante el modelo biológico de edema de pata en ratas inducida por carragenina, con el objeto de buscar una mayor eficacia antiinflamatoria en el extracto o en sus sub-extractos, butanolico, etéreo y clorofórmico; también se determinó el contenido de flavonoide, mediante análisis espectroscópicos (UV), del sub-extracto butanólico, obtenido del extracto total de *Perezia multiflora*. Se obtendrá resultados positivos mediante la disminución del edema en la pata de rata similar al Diclofenaco sódico.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. INFLAMACIÓN



FUENTE: <http://piel-l.org/blog/20451>

FIGURA No.1 PIEL

#### 1.1.1 DEFINICIÓN.

El término inflamación deriva del latín *inflammare*, que significa encender fuego. En medicina se denomina con el sufijo *itis*. Es una respuesta fisiopatológica fundamental cuyo objetivo es la eliminación de cualquier estímulo nocivo introducido en el huésped y de reparar el tejido u órgano dañado. Estos estímulos nocivos incluyen agentes causales externos (microorganismos, agentes físicos, agentes químicos) y agentes causales internos (alteraciones inmunitarias y alteraciones vasculares). (15)

Los cuatro signos cardinales de la inflamación fueron descritos por Paracelso (30 AC al 38 DC) y son: rubor (coloración roja); tumor (hinchazón); calor y dolor. El calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor se produce por el edema y acúmulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor. (60)

Posteriormente Galeno (130-200) añadió un quinto signo: pérdida de función. Los cambios de la microcirculación son inducidos por mediadores químicos. Estos mediadores aumentan la permeabilidad capilar para que los líquidos y las células sanguíneas pasen al espacio extravascular provocando la hinchazón y un aumento de la presión local que es el que origina el dolor. (21)

Según Edgar Samaniego la inflamación es la respuesta de los tejidos vivos a la injuria. Ella involucra una compleja batería de activación enzimática, liberación de mediadores químicos, extravasación de fluidos, migración celular, daño tisular y reparación. (30)

Dependiendo de las características temporales de la inflamación definimos dos tipos de respuesta: inflamación aguda e inflamación crónica. (31)

## **1.2. INFLAMACIÓN AGUDA**

Es la repuesta inicial e inmediata a la lesión diseñada para suministrar leucocitos a la zona lesionada, donde ayudan a eliminar las bacterias invasoras e inician el proceso de degradación de los tejidos necróticos. (59)

Los cambios que se produce tras la lesión tisular deben a tres procesos:

Cambio en el flujo y calibre vascular, que hace que aumente el flujo sanguíneo.

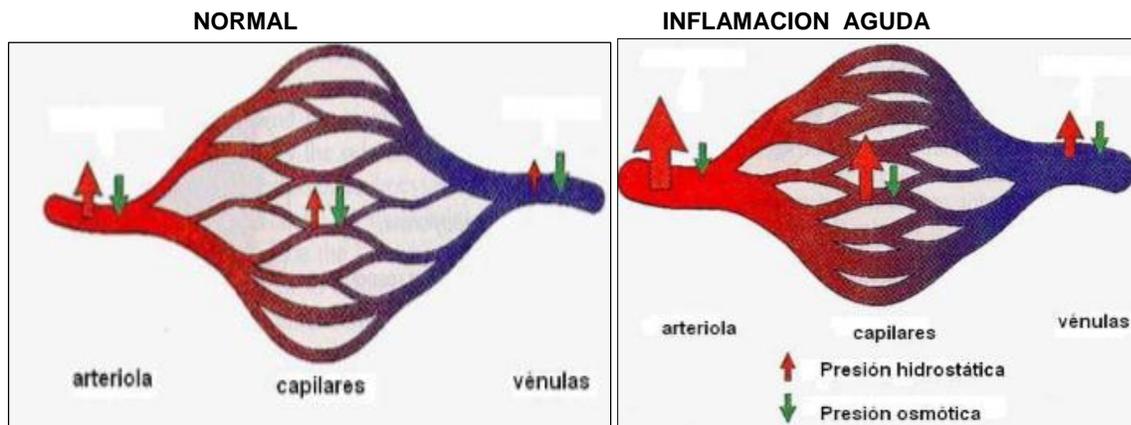
Cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumenta la permeabilidad vascular e induce la formación de exudado inflamatorio.

Paso de los leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones.

El resultado de todo ello es el acumulo de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos. (59)

En los primeros 10-15 minutos se produce una hiperemia por dilatación de arteriolas y vénulas y apertura de los vasos de pequeño calibre. Tras esta fase aumenta la viscosidad de la sangre, lo que reduce la velocidad del flujo sanguíneo. Al disminuir la presión hidrostática en los capilares, la presión osmótica del plasma aumenta, y en consecuencia un líquido rico en proteínas sale de los vasos sanguíneos originando el exudado inflamatorio. (59)

Cambios vasculares:



FUENTE: GUADARRAMA, B. TESIS 2006.

FIGURA NO 2. INFLAMACION AGUDA

## 1.2 INFLAMACIÓN CRÓNICA

La inflamación crónica tiene factores etiológicos distintos y un patrón histológico diferente a la inflamación aguda. Es una respuesta inflamatoria de curso prolongado en el tiempo (semanas, meses e incluso años). (21)

La inflamación crónica puede evolucionar de una inflamación aguda, cuando el proceso agudo no es capaz de eliminar al agente causal, o se ve impedido el proceso de reparación. En una gran cantidad de casos, la inflamación crónica se inicia como un proceso primario. Los agentes etiológicos son de baja toxicidad, en relación a los que originan inflamaciones agudas. Existen diversos agentes como:

1. Microorganismos intracelulares que producen una infección prolongada, como por ejemplo el bacilo de Kock de la tuberculosis, algunos hongos, o el Treponema pallidum agente etiológico de la Sífilis.

2. Sustancia o materiales inerte no degradables como por ejemplo la sílice, material de sutura, polvo talco, cuerpos extraños, etc.
3. Enfermedades de autoinmunidad como la Artritis reumatoidea, liquen plano, etc. (21).

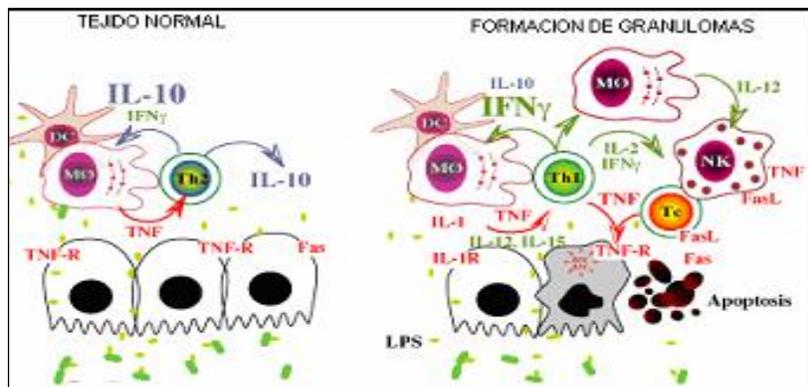
### 1.3.1 INFLAMACIÓN CRÓNICA GRANULOMATOSA

Este es un tipo específico de inflamación crónica, se da en varias enfermedades como: TBC, Lepra, Sífilis, Sarcoidosis. También puede ser producida por agentes inorgánicos no digeribles, polvos talcos, hilos de sutura quirúrgica, sílice, etc. (6)

Lo típico de esta inflamación es la formación de un granuloma. Son nódulos bien ordenados formados por células provenientes del sistema mononuclear fagocitario: macrófagos, células gigantes multinucleadas, con cierta frecuencia se observan linfocitos y fibroblastos. Puede haber o no necrosis. Existen dos tipos de granuloma: los complejos que tienen necrosis y los granulomas puros que no presentan necrosis. (59)

Las diferencias entre una inflamación aguda y una crónica es más que el tiempo; pero, existen diferencias en los cambios vasculares, en el infiltrado celular, en los mediadores químicos, y por último en la resolución de ellas.

Debemos dejar establecido que ninguna de ellas es excluyente entre sí, ya que en un mismo órgano pueden existir los dos tipos y un proceso crónico puede reagudizarse. (6) (59)



FUENTE: GUADARRAMA, B. TESIS 2006

### FIGURA No. 3 INFLAMACIÓN CRÓNICA

## 1.4. MECANISMOS QUE INTERVIENEN EN LA INFLAMACIÓN

### 1.4.1 MIGRACIÓN LEUCOCITARIA

La migración de los leucocitos se hace a través del endotelio de las vénulas post capilares. Los leucocitos emigran hacia el sitio de la lesión atraídos por factores quimiotácticos. (6)

Los leucocitos se desplazan por movimientos ameboides. Por un proceso activo, ellos migran, principalmente a través de las uniones interendoteliales. Toman una posición entre la célula endotelial y la membrana basal, finalmente atraviesan la membrana basal y llegan al tejido perivascular. Usan esta vía los neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos. (4) (6)

Los linfocitos además pueden abandonar el vaso por un fenómeno de emperipolesis ya que pasan en vacuolas citoplasmáticas de la célula endotelial. Los eritrocitos salen de los vasos en forma pasiva ya que son empujados por el agua que sale por el aumento de la presión hidrostática intravascular.

Las primeras células en migrar son los neutrófilos, después los monocitos, y por último los linfocitos.

### 1.4.2 MEDIADORES CELULARES

Los leucocitos son un conjunto de células sanguíneas móviles carentes de pigmento por lo que se les denomina glóbulos blancos. Son células con núcleo, capaces de moverse libremente mediante pseudópodos. Tradicionalmente se les clasifica en: 1) polimorfonucleares o granulocitos que agrupan, a su vez, neutrófilos, eosinófilos, y basófilos; 2) células mononucleares que comprenden a los monocitos y linfocitos, estos últimos, son responsables de las respuestas inmunitarias. (15)

### 1.4.3 MEDIADORES QUÍMICOS

Además de las células directamente implicadas en la inflamación, como son los neutrófilos, macrófagos y linfocitos, los basófilos, mastocitos, plaquetas y células endoteliales también producen mediadores químicos. (60)

Los mediadores químicos son sustancias endógenas que se encuentran en el plasma y los tejidos, son relevantes en el proceso inflamatorio. En el plasma hay sistemas enzimáticos que juegan un papel importante en la homeostasis y el control de la inflamación, éstos son el sistema de las cininas, el sistema del complemento, el sistema de coagulación y el sistema fibrinolítico.

Con excepción del sistema del complemento, los otros sistemas utilizan al factor Hageman (Fc XII) como agente que dispara la serie de reacciones en cascada, característica para cada sistema. Por otra parte en los tejidos hay mediadores químicos de la inflamación tales como aminas, lípidos ácidos, componentes lisosomales y productos generados por los linfocitos. (55)

TABLA No.1 MEDIADORES DE LA INFLAMACION Y SUS EFECTOS.

<b>Efectos</b>	<b>Mediadores</b>
Vasodilatación	Óxido nítrico Histamina
Aumento de permeabilidad vascular	Aminas vasoactivas C3a-C5a Brdicininina Leucotrienos C4,D4,E4 PAF Sustancia P
Quimiotaxis, reclutamiento y activación leucocitaria	C5a Leucotrieno B4 Quemokinas IL-1,TNF Productos bacterianos
Fiebre	IL-1,TNF Prostaglandinas
Dolor	Prostaglandinas Brdicininina
Daño tisular	Enzimas Lisosómicas Radicales libres de Oxígeno Óxido Nítrico

FUENTE: <http://www.slideshare.net/halvio/clase-mediadores-quimicos-de-la-inflamacion>

#### 1.4.4 EL FACTOR ACTIVADOR DE PLAQUETAS (FAP)

Se trata de un lípido, proveniente de las membranas celulares que tiene una potente actividad biológica, actúa sobre varias células diana.

Es un mediador bioactivo derivado de los fosfolípidos. Desde el punto de vista químico el FAP es una acetil-gliceril-eterfosforilcolina. Realiza sus efectos a través de un receptor acoplado a proteína G ligadas a los receptores de superficie. Diversas células como plaquetas, basófilos y mastocitos, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales pueden elaborar FAP en forma secretada y en forma intracelular. (16)

Es un potente vasodilatador y agregador plaquetario provoca también la liberación de superóxidos, tromboxanos y por sí mismo es un factor quimiotáctico.

#### **14.5 EL ÓXIDO NÍTRICO (NO)**

Es un mediador pleiotrópico de la inflamación. Es sintetizado por las células endoteliales, macrófagos y grupos neuronales específicos del cerebro. El NO tiene un mecanismo de acción paracrino sobre las células dianas mediante la inducción de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) que, a su vez, inicia una serie de acontecimientos intracelulares que dan lugar a una respuesta como la relajación de las células musculares lisas de la pared vascular. (16) (42)

El NO se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular, nicotinamín adenín dinucleótido fosfato hidrogenado (NADPH) y otros cofactores por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa. Se ha comprobado que la activación del FNkB está implicado en el incremento de la expresión del óxido nítrico sintetasa inducida (NOSi). (16)

El NO desempeña un papel importante en la función vascular durante las respuestas inflamatorias y provoca aumento de la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la quimiotaxis. (42)

#### **1.4.6. ENZIMAS LISOSOMALES.**

Las enzimas lisosomales contenidas en neutrófilos y monocitos pueden ser liberadas y contribuir a la respuesta inflamatoria, su liberación es consecuencia de la lisis celular. Los neutrófilos presentan dos tipos de gránulos: los gránulos específicos o secundarios y los gránulos azurófilos o primarios. (42)

Los gránulos específicos contienen lisozima, colagenasa, gelatinasa, lactoferrina, activador del plasminógeno, histaminasa y fosfatasa alcalina; los gránulos azurófilos contienen mieloperoxidasa, factores bactericidas (lisozima, defensinas), hidrolasas ácidas, proteasas neutras (elastasa, catepsina G, colagenasas inespecíficas y Proteinasa).

Las proteasas neutras pueden degradar colágeno, membranas basales, fibrina, elastina, y cartílago dando lugar a la característica destrucción tisular de los procesos inflamatorios purulentos y deformantes. Los monocitos y los macrófagos contienen hidrolasas ácidas, colagenasa, elastasa, fosfolipasa, y activador del plasminógeno. (42)

#### 1.4. 7 LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO).

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son especies químicas muy reactivas, a partir de las cuales se producen reacciones en cadena que provocan la alteración de biomoléculas, incrementan la peroxidación de los lípidos de membrana, dañan células y tejidos. Las especies reactivas del oxígeno son los radicales libres radicales aniones superóxido ( $O_2^-$ ), y radical hidroxilo (OH) y las especies no radicales peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno singlete ( $1 O_2$ ). (42) (50)

Estas especies reactivas se forman en el organismo como parte de procesos metabólicos entre los que se encuentran: la cadena de transporte electrónico, la descarga respiratoria de los fagocitos, la reacción de la xantina oxidasa y el sistema enzimático del citocromo P450. (50)

Cuando por determinadas razones los procesos de oxidación que generan radicales libres en el organismo se incrementan o disminuyen las defensas antioxidantes, se produce lo que se conoce con el nombre de estrés oxidativo.

Este está vinculado a un grupo de enfermedades, de hecho la producción de radicales libres forma parte de la fisiopatología de las mismas entre las cuales se encuentran: Parkinson, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, daño por isquemia reperfusion, choque circulatorio, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, diabetes, cataratas, daño por radiaciones, el síndrome de respuesta inflamatoria y envejecimiento. (40)

Las ERO pueden ser liberadas al espacio extracelular por los leucocitos tras la exposición a agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o estimulación fagocitaria. Su producción depende de la activación del sistema oxidativo NADPH y provocan:

Aumento de la expresión de las citoquinas, las quimioquinas (IL-8) y de las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial.

Lesión de las células endoteliales con el aumento de la permeabilidad vascular provocado por el aumento de la producción de superóxido. La inactivación de antiproteasas. (61)

Se ha comprobado que el incremento de las ERO está relacionado con la activación del FNkB el cual es muy importante en la inflamación, ya que controla la transcripción de genes que codifican la expresión de IL-1, TNF- $\alpha$ , citoquinas, proteínas de la fase aguda, factores de crecimiento, y la expresión Cox-2, NOSi y FLA2s. (40)

## **1.5 TRATAMIENTOS EMPLEADOS EN PROCESOS INFLAMATORIOS**

Entre las enfermedades que se manifiestan en la población mundial, las que involucran procesos inflamatorios representan un importante grupo. La mayoría de las infecciones ocurridas involucran procesos inflamatorios como respuesta natural ante traumas físicos y alergias, las que en muchos casos incapacitan a quienes la padecen, en determinadas enfermedades infecciosas importantes, la respuesta inflamatoria puede causar más daño que el agente agresor. (60)

En el tratamiento de los procesos inflamatorios, no solo tiene importancia conseguir una buena analgesia, sino poder controlar otros aspectos derivados de este proceso, como por ejemplo, la formación de edema, la extravasación plasmática y la migración leucocitaria que caracterizan la zona inflamada. Hasta el momento se han utilizado de manera común aunque muy controvertida los antiinflamatorios esteroideos y los antiinflamatorios no esteroideos, que inhiben los efectos vasculares (vasodilatación, formación de edema, migración leucocitaria), aunque los efectos colaterales son frecuentes. (60)

## **1.6 FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS.**

Los antiinflamatorios son fármacos diseñados para combatir la inflamación. Este es un grupo de medicamentos para tratar la inflamación y las enfermedades que se derivan de problemas como el reumatismo, fracturas estomatitis y lesiones urinarias y genitales. (39)

Los medicamentos antiinflamatorios se dividen en dos categorías:

Medicamentos antiinflamatorios no esteroideos

Medicamentos antiinflamatorios esteroideos. (19)

### 1.6.1 ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES (AINES)

Constituyen un grupo farmacológico muy heterogéneo que tiene en común su mecanismo de acción, caracterizado por inhibir la síntesis de prostaglandinas las cuales se liberan cuando hay daño tisular, presentes en los exudados inflamatorios, ejerciendo así un papel tanto en la sensibilización de los nociceptores, como en la mediación de procesos de inflamación, fiebre e interferencia en los mecanismos de agregación plaquetaria. (17) (39)

Los AINES, además de ser un grupo de medicamentos más consumido en el mundo, son los causantes de la mayoría de los efectos adversos de acuerdo a reportes elaborados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos. Los Efectos adversos indeseables más comunes son los daños gastrointestinales y renales que con frecuencia son peligrosos. (39)

Los AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) son la elección para el manejo del dolor inflamatorio agudo, pero su empleo debe limitarse en el tiempo y se deben emplear con la dosis mínima efectiva, pues a pesar de su capacidad para reducir la inflamación y el dolor, provocan una amplia gama de efectos secundarios, muchos de importancia clínica como sangrado gastrointestinal, daño renal, infarto y accidentes cerebrovasculares (Antman 2007). (39)

### 1.6.2 ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDEOS (AIES)

El representante natural es el cortisol, hormona glucocorticoide. Estos agentes antiinflamatorios inhiben la producción de moléculas proinflamatorias, derivadas del ácido araquidónico vía la

inhibición de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, inhiben la activación de moléculas de adhesión ICAM-1, ELAM-1, citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ,  $\gamma$ -interferón y Factor Estimulante de Colonias (GM-CSF).

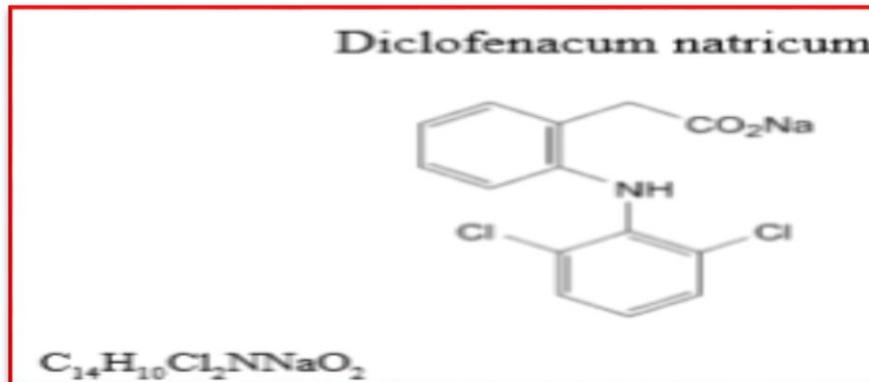
A pesar de la potente acción antiinflamatoria que le es atribuida, estos fármacos presentan numerosos efectos adversos. (46)



FUENTE: SÍNANI, G. 2009.

FIGURA NO. 4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDEOS Y NO ESTEROIDEO

## 1.7 DICLOFENACO SÓDICO.



FUENTE REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA 2da edición 2002 pp.1188

## FIGURA NO 5. ESTRUCTURA DEL DICLOFENACO SÓDICO

El diclofenaco sódico es un AINE no selectivo, derivado del ácido acético, en uso clínico desde 1974. Considerando su amplio uso, es frecuentemente revisado para rechequear su eficacia y seguridad (Derry P. Cochrane 2009). El diclofenaco está registrado y en uso en más de 120 países. Tiene actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética basada tres mecanismos de acción bien documentados: (19)

### 1.7.1 ACCIÓN SOBRE PROSTAGLANDINAS.

Diclofenaco inhibe en forma balanceada las ciclooxigenasas (COX 1 y COX 2) con reducción en la producción de prostaglandinas y tromboxanos (Skoutakis1988). Ahora sabemos que hay dos moléculas COX distintas (COX-1 y COX- 2). La molécula COX-1 está involucrada en la homeostasis celular. Su expresión constitutiva en la mayoría de los tejidos lleva a la síntesis de las prostaglandinas en respuesta a los estímulos fisiológicos en proporción con la disponibilidad del sustrato, ácido araquidónico.

Las prostaglandinas tienen un papel protector importante en el tracto gastrointestinal en la conservación de la integridad microvascular, la regulación de la división celular y la producción de moco. La molécula COX-2 es indetectable en la mayoría de los tejidos en condiciones fisiológicas normales. Se puede inducir en los sitios de inflamación a través de la acción de las citocinas y las endotoxinas (Hayllar 1995). El diclofenaco inhibe en forma balanceada el sistema de ciclooxigenasas con una proporción COX-2/COX-1 de 0.7 en cuanto al IC50 (concentración del fármaco necesaria para alcanzar una inhibición del 50%). (19)

### 1.7.2 ACCIÓN SOBRE LEUCOTRIENOS.

La producción de leucotrienos disminuye después de la administración de diclofenaco, por un efecto inhibitor de la lipooxigenasa. El leucotrieno B4, y en menor grado los otros leucotrienos son potentes sustancias proinflamatorias que promueven la quimiotaxis, liberan enzimas líticas y aumentan la agregación de leucocitos (Skoutakis 1988). (46)

### 1.7.3 ACCIÓN DIRECTA SOBRE EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Diclofenaco reduce la disponibilidad del ácido araquidónico mediante la inhibición de su liberación y la estimulación de su reabsorción (Ogle 1989). (44)

Las reacciones adversas principales con diclofenaco son similares en naturaleza a aquéllas de otros AINEs que incluyen, irritación gastrointestinal (21%) o sangrado (0.17%), efectos en el sistema nervioso central (6.4%) como cefalea, somnolencia, vértigo, insomnio, perturbación y disminución de la función renal durante la terapia (Catalano 1986). (46).

Una evaluación reciente (Estudio MEDAL) comparó diclofenaco (150 mg día) con etoricoxib (60 o 90 mg diarios) en 34.701 pacientes con osteoartritis o artritis reumatoidea. La tasa de eventos gastrointestinales serios fue similar con ambos productos (0.91, 0.67-1.24;  $p=0.561$ ) en cuanto al riesgo de eventos trombóticos 320 pacientes en el grupo con etoricoxib y 323 en el grupo con diclofenaco sufrieron eventos trombóticos con tasas estimadas de 1.24 y 1.30 por 100 pacientes/año (Laine 2007). (46)

Esto permite entender que luego de 30 años de uso, diclofenaco es considerado un AINE estándar, contra el cual se comparan las nuevas moléculas, sin demostrar que sean superiores, ni en eficacia, ni en seguridad. (46)

### 1.8 MODELO DE INFLAMACIÓN AGUDA INDUCIDA CON CARRAGENINA

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. El nombre de carragenina se deriva de la costa Irlandesa Irish de Carragheen. (44)

**Preparación:** Es el hidocoloide extraído con agua o álcali acuoso de ciertas algas marinas rojas de la clase Rhodoficeas y separado de la solución por precipitación con alcohol (metanol, etanol o isopropanol) o por secado con rodillos o congelación. (44)

**Constituyentes** Es una mezcla variable de ésteres de sulfato de potasio, sodio, calcio, magnesio y amonio con copolímeros de galactosa y 3,6-anhidrogalaactosa, de manera que las hexosas están unidas alternativamente  $\alpha$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 en el polímero. Los tres tipos principales de copolímeros presentes son la kappa-carragenina, la iota-carragenina y la lambda-carragenina, que difieren en su composición y modo de enlace de las unidades monoméricas y el grado de sulfatación (el contenido de éster sulfato de las carrageninas varía de 18 a 40%). La kappa-carragenina y la iota-carragenina son las fracciones gelificantes; la lambda-carragenina es la fracción no gelificante. Las fracciones gelificantes pueden separarse de la fracción no gelificante por agregado de cloruro de potasio a una solución acuosa de carragenina. La Carragenina, separada por secado en tambores puede contener mono-y di-glicéridos o hasta el 5% de polisorbato 80 usado como agente mucilaginoso. (44)

**Descripción** Polvo grueso a fino, amarillo pardusco a blanco; inodoro, insípido. (44)

**Solubilidad** Todas las carrageninas se hidratan con rapidez en agua fría, pero sólo la lambda-carragenina y las Carrageninas de sodio se disuelven por completo. Las carrageninas gelificantes necesitan calentamiento a unos 80 para su completa disolución cuando están presentes iones de potasio y de calcio. (44)

**Usos:** En las industrias farmacéutica y alimentaria como emulsionante, agente suspensión y gelificante. (44)

La diferencia estructural de cada uno de los tipos de carragenina, determina la diferencia en sus actividades biológicas. Todos los tipos de carrageninas son considerados agentes flogísticos, aunque los mecanismos que participan en la formación del edema suplantar en el animal de laboratorio no se conocen con certeza.

En la rata, se ha descrito que durante las primeras tres horas después de la administración vía plantar de la carragenina tipo lambda, se produce un comportamiento bifásico en la formación del edema plantar. (44)

En la primera fase se registra un incremento gradual del edema en el transcurso de la primera hora, seguido de una segunda fase que dura hasta tres horas después de la administración de la carragenina, y que se caracteriza por un incremento abrupto que presenta el edema a partir de los 90 minutos. (44)

## **1.9 EXTRACCIONES BOTÁNICAS**

La extracción, cuando el término es usado farmacéuticamente, implica la separación de fracciones medicinalmente activas de tejidos vegetales de componentes inactivos o inertes con la ayuda del agua, alcohol, mezclas de alcohol-agua u otros disolventes apropiados. Este proceso de extracción involucra la remoción del componente deseado del material vegetal con un solvente apropiado, la evaporación de todo o casi todo el disolvente, y el ajuste de los fluidos residuales, masas o vehículos a los estándares prescritos. (49)

Los métodos de extracción con disolventes pueden ser continuos y discontinuos. Los métodos continuos son la percolación y el soxhlet, en ellos el disolvente actúa en una dirección y permite la extracción prácticamente total de los principios activos de la droga. Los métodos discontinuos son la maceración, la infusión, la decocción y la digestión, y en ellos el disolvente actúa en todas las direcciones sobre la droga. (49)

Los extractos pueden ser sometidos a procesos que incrementan el contenido de constituyentes característicos, disminuye el contenido de compuestos no deseados, o ambos. Los extractos a los que no se le añaden sustancias inertes y no están sometidos a ningún proceso, excepto de la extracción, se les conoce como “extractos nativos” o “crudos”. En algunas formulaciones, el material vegetal puede ser pretratado para inactivar las enzimas y contaminantes microbianos, molido, desgrasado o a un proceso similar. (49)

### **1.9.1 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Los dos métodos principales de producción de extractos vegetales son la percolación y la maceración. El RFE describe con detalle cada uno de ellos. (49)

### **Maceración**

A menos que se especifique lo contrario, el material crudo que se va a extraer, es reducido a pedazos de tamaño apropiado, mezclando con el disolvente específico y dejado en reposo a temperatura ambiente en un recipiente en un tiempo apropiado, con frecuente agitación hasta que la materia soluble se disuelva. La mezcla se filtra, el material insoluble se lava con el mismo disolvente utilizado para la maceración y los filtrados se concentran a la consistencia deseada, bajo presión reducida y temperatura controlada. (49)

### **Percolación**

En la manufactura de los extractos la percolación es el método más común. La materia cruda se reduce en pedazos de un tamaño apropiado, si es necesario luego se mezcla íntimamente con una porción con el disolvente especificado y se deja reposar por 15 min. La mezcla se transfiere a un percolador (un recipiente estrecho en forma de cono con ambos extremos abiertos) y se añade cantidad suficiente del disolvente especificado para cubrir toda la masa sólida. (22)

Se deja que la droga macere 24 horas o durante el tiempo especificado. Si no se lleva a cabo ningún ensayo se deja que la percolación proceda lentamente o a la velocidad especificada agregando de forma gradual una cantidad suficiente de solvente para complementar un volumen de solución de 1000mL. (9) El percolado es concentrado, generalmente por destilación bajo presión reducida, de manera que los constituyentes de interés sean sometidos a la menor cantidad de calor posible. (22)

### **Digestión**

Este proceso consiste en forma de maceración en la cual se calienta con suavidad durante el proceso de extracción. Este procedimiento se utiliza cuando una temperatura moderadamente alta no es objetable y de este modo aumenta la eficiencia del menstruo como solvente. (22)

### **Infusión**

Es una solución diluida de los componentes fácilmente solubles de las drogas crudas. Las infusiones frescas se preparan macerando las drogas por un lapso breve con agua fría o en ebullición. Durante algún tiempo, los compendios oficiales de Estados Unidos no incluyeron infusiones. (22)

### **Decocción**

Este proceso, antiguamente muy popular, consiste en extraer los componentes hidrosolubles y termoestables de drogas crudas hirviendo en agua durante 15 minutos; después el extracto se deja enfriar y se filtra y se pasa suficiente agua fría a través de la droga para completar el volumen requerido. (22)

## 1.9.2 CLASIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Hay tres tipos de extractos: fluidos (preparaciones líquidas), blandos (de consistencia intermedia) y secos (de consistencia sólida). (22)

### **Extractos fluidos (1:1)**

Los extractos fluidos, también conocidos como extractos líquidos, son preparaciones de material vegetal que contiene alcohol como disolvente o como preservante, o ambos, preparados de tal manera que cada mililitro contiene los constituyentes extraídos de 1 g del material crudo que representa, a menos que se especifique lo contrario en la monografía individual. Los extractos fluidos también pueden ser preparados a partir de extractos apropiados y pueden contener antimicrobianos y otros preservantes apropiados. (22)

Los extractos fluidos farmacopéicos son preparados por percolación, generalmente después de un período de maceración. El disolvente requerido está especificado en la monografía individual. El

procedimiento de manufactura más común incluye la concentración de la porción más diluida del percolado por evaporación o destilación al vacío a temperaturas por debajo de los 60. El tiempo de maceración y la tasa de flujo durante la percolación pueden variar para ajustar la cantidad y naturaleza del material vegetal bajo extracción, siempre y cuando la composición de los constituyentes de interés extraídos no se vea comprometida. (22)

La tasa de flujo del percolado puede ser lenta, moderada o rápida. En referencia a la extracción de 1000g del material original, a una tasa lenta, no más de 1 mL del percolado producido por minuto; a una tasa moderada entre 1 y 3mL/min y a una tasa rápida, entre 3 y 5 mL/min. Un extracto fluido que tienda a depositar sedimento puede estar viejo, se debe decantar o filtrar la porción clara, siempre y cuando el resultante líquido clarificado cumpla con los estándares farmacopéicos. (22)

### **Extractos semisólidos o blandos**

Los extractos semisólidos, se conocen también como extractos blandos o pilulares. Estas son preparaciones que tienen consistencias entre aquellas de los extractos fluidos y los extractos pulverizados, son obtenidos por evaporación parcial del disolvente (agua, alcohol o mezcla hidroalcohólica) utilizada en la extracción. Puede tener algún antimicrobiano apropiado u otro preservante. Un extracto semisólido y extracto pulverizado obtenido a partir del mismo material son intercambiables como drogas o como suplementos, pero cada uno tiene sus ventajas. (22)

### **Extractos pulverizados o secos**

Los extractos pulverizados son preparaciones sólidas con consistencia de polvo obtenidas por la evaporación del disolvente utilizado para la extracción. Puede contener sustancias apropiadas añadidas, tales como excipientes, estabilizantes y preservantes. Los extractos pulverizados estandarizados son ajustados al contenido definido de los constituyentes, utilizando materiales inertes apropiados o un extracto pulverizado del material vegetal utilizado para la preparación. Donde se requiere, se debe especificar un límite para el disolvente utilizado durante la extracción en la monografía individual. (22)

### 1.9.3 FUNDAMENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Consiste en la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (extracto y el residuo). (22)

Al embeber la droga con el líquido de extracción se disuelven primero las sustancias a las que el disolvente puede llegar sin obstáculos. Al triturar la droga se destruyen varias células donde el grado de finura creciente favorece la disolución. Las sustancias que están contenidas en la droga son lavadas y arrastradas de los fragmentos celulares por los disolventes mediante un proceso denominado “lavado celular”, simultáneamente, transcurre el proceso de difusión celular. El tiempo necesario para el equilibrio de concentraciones es, parcialmente, dependiente del tipo de droga, raíz u hoja y del grado de trituración. (22)

La extracción termina cuando se produce un equilibrio de concentraciones. Para cada extracción se necesita una droga y un líquido de extracción o disolvente que deben cumplir una serie de exigencias. La calidad del extracto vegetal depende de la calidad del material de partida. (22)

El contenido en sustancia activa de una droga viene determinado, generalmente, por factores previos a la cosecha y que pueden tener su origen en el tiempo de recolección, el lugar, el tipo de abono, suelo y factores climáticos, así como a los procesos de envejecimiento o degradación que puedan ocurrir durante el secado y almacenamiento de la droga, es por ello necesario la estabilización de los mismos. (22)

#### **Extracción de sólidos con líquidos: Lixiviación**

Se denomina a la separación preferencial de uno o más componentes de una mezcla sólida por disolución en un solvente líquido. En la industria farmacéutica los dos procedimientos de extracción básicos son maceración y percolación, sumamos a esto la extracción por Soxhlet. (32)

El intercambio de materia entre una fase sólida y una líquida interviene en numerosos procesos de interés químico-técnico. La disolución de materias sólidas, con o sin transformaciones químicas,

constituye uno de los primeros pasos en un buen número de industrias, en las que se trata de utilizar un componente valioso presente entre los sólidos. (22)

En otros casos, la operación tiene por objeto eliminar las impurezas indeseables: lavado de materiales diversos, desimpregnación de fibras celulósicas, etc. En determinados procesos y operaciones el intercambio de materia tiene lugar de forma inversa: por paso de la fase líquida a la sólida, cristalización, adsorción, cromatografía o intercambio iónico. (22)

En el caso de la lixiviación, se trata de la disolución en un disolvente apropiado de un componente o grupo de componentes que forman parte de un sólido, el cual contiene otros componentes insolubles. Existen, por tanto, dos fases, la sólida y la disolución. Las variables son temperatura, presión y concentración de soluto en la disolución. Todas ellas variables independientes. (22)

### **Variables de la extracción sólido-líquido**

Como en el estudio de otras muchas operaciones, hay que considerar aquí el equilibrio que se tiende a alcanzar durante la operación y la velocidad con que se alcanza, en función de los diversos factores que pueden afectar a uno y a otra.

El conocimiento que se posee de la interfase líquido-sólido es escaso y por ello el mecanismo primario del cambio de fase de un soluto presente, inicialmente, en forma sólida, de la cual depende como es lógico, la cinética del proceso, permanece oscuro, haciendo difícil el desarrollo de una teoría general para esta operación. (32)

Los factores que influyen en el equilibrio son: La naturaleza del soluto, la naturaleza del disolvente, la presión, la temperatura.

En cambio, en la cinética del proceso, influyen además de los anteriores, la forma en que está dividido los sólidos, la presencia de restos de organización celular cuando se trata de tejidos animales o vegetales y las características propias del aparato y sistema de extracción que se emplee. (22)

## 1.10 ESCORZONERA (*Perezia multiflora*)



FUENTE: <http://es.scribd.com/doc/45810978/VIAS-RESPIRATORIAS>

### FOTOGRAFIA No. 1 ESCORZONERA

#### 1.10.1 TAXONOMÍA DE LA ESCORZONERA

Reino: Plantae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Perezia*

Especie: *Perezia multiflora* (Humb.y Bonpl.)Less.

#### Nombre vulgar

Escorzonera, chancoruma, chacorma.

#### Descripción

Hierba perenne, acaule, de 5-35 x 30 cm de diámetro, escapo florífero de 10-30 cm. Raíz axonomorfa. Hojas basales y caulinares: las basales con pecíolo abrazador, alargadas, de 10-15 cm, fuertemente dentadas hasta laceradas, con terminaciones espiniscentes. Capítulos discoideos-acampanados de 2,5-3 cm x 1,5-2 cm; involucreo con 3-4 series de brácteas oblongo-lanceoladas, de ápice acuminado-espiniscente. Flores hermafroditas, bilabiadas: labio superior tridentado y el

inferior bidentado. Cáliz plumoso, de color pardo. Fruto, un aquenio cilíndrico, hispido-pubescente. (47) (73)

### **Uso**

Medicinal, diurético, febrífugo y sudorífico. Tapia y Aguirre la señalan poco deseable por el ganado (Tapia y Flores 1984). (48)

### **Ecología**

Planta geófito, se desarrolla foliar y floralmente con la llegada de las lluvias. Crece en laderas con suelos arenoso-arcillosos, pedregosos, y bordes de las carreteras. 3500-4500 m (Weberbauer 1945). Bajada a Chivay, 3700-3800 m (47) (52)

### **Farmacología**

Es utilizado para la tos, enfermedades de los pulmones, así como su capacidad expectorante, antiasmática y también tiene actividad reductora de la temperatura

### **Fitoquímica**

En su composición presenta metabolito como: esteroides, alcaloides saponinas, taninos, aceites esenciales, flavonoides, compuestos fenólicos derivados del Catecol. (79)

### **Estudio toxicológico**

En ratas se observó muy buena tolerancia sin ningún efecto tóxico considerable a dosis de 2.000 mg/ kg. Se puede administrar usando 15 a 20 gramos (un puñado y medio a dos puñados) de hojas para preparar un decocto con un litro de agua y tomarlo cuatro veces al día. La buena cantidad de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y aceites esenciales le dan propiedades antisépticas y antibacterianas para evitar complicaciones de resfríos. Se puede hacer gárgaras para evitar

faringitis y amigdalitis, puesto que los flavonoides (asparagina) presentes permiten buena acción antiinflamatoria y, al mismo tiempo, actúa como diurético y ante malestares musculares. (78)

#### 1.10.2 ESTUDIOS REALIZADOS EN LA PEREZIA MULTIFLORA.

Por otra parte se han realizado estudios como el “Estudio de la viabilidad comercial de plantas medicinales en zonas rurales altas del valle del Mantaro (Perú).” En las cuales identificaron la presencia de taninos, fenoles y flavonoides en la escorzonera, lo que podría constituir la causa de la actividad farmacológica a nivel de sistema respiratorio superior, incluyendo la capacidad antiinflamatoria de los bronquios. (52)

Es así que en estas zonas utilizan la Escorzonera para la tos, enfermedades de los pulmones, así como su capacidad, expectorante y antiasmática, entre otras, permite inferir la importancia que posee tanto en esta especie como en las demás la presencia de fenoles simples y complejos. (51)  
(56)

Otra investigación se realizó en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga durante los meses de julio a diciembre del 2007 con el tema: Actividad antipirética del extracto acuoso de las hojas *Perezia multiflora* (H & B) Less “escorzonera” Ayacucho 2007.

Los metabolitos secundarios presentes en las hojas fueron: flavonoides, fenoles y taninos, cumarinas, triterpenos y esteroides, saponinas y mucílagos; el porcentaje de humedad fue 41,5% y de cenizas 2,8% respectivamente. El extracto acuoso a las concentraciones de 100 mg/Kg, 200 mg/Kg y 400 mg/Kg demostró tener actividad reductora de la temperatura en función del tiempo, siendo la mejor 200 mg/Kg y de 100 mg/Kg. Se concluye que el extracto acuoso a la concentración de 200 mg/Kg y de 100 mg/Kg tiene mejor actividad antipirética con 55,2% y 53,2% respectivamente que el metamizol. Pero son estadísticamente menores al Metamizol que presenta la actividad antipirética de 65,2% ( $p < 0,05$ ). (63)

### 1.11 TAMIZAJE FITOQUIMICO

El tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico es la etapa inicial de la investigación. Para determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una

planta y a partir de allí realizar la extracción para el aislamiento de los grupos de mayor interés, utilizando los solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración.

Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiado y la aplicación de reacciones de coloración, debe permitir la evaluación rápida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo, los resultados del mismo constituyente únicamente una orientación y deben interpretarse. (22) (62)

## **1.12 CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA.**

Definición: I.U.P.A.C lo define como el “método más usado principalmente para la separación de los componentes de una muestra, en el cuales componentes son distribuidos entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido soportado en un sólido o en un gel (matriz). La fase estacionaria puede ser empaquetada en un columna, extendida en una capa, distribuida como una película etc.” (47)

### **Concepto de R<sub>f</sub>.**

R<sub>f</sub> es el registro y se define como la distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación distancia que recorre el disolvente hasta el frente de eluyente.

El valor de R<sub>f</sub> depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de absorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc.). Tiene una reproducibilidad de 20 %, por lo que es mejor correr duplicados de la misma placa. (47)

### **1.12.1 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (CCf o TLC)**

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivos que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de absorbente y una cámara en al que se desarrollan las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas.

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán menos polares. (47)

#### 1.12.2 REVELADORES MÁS COMUNES PARA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras o pueden revelarse mediante:

Luz UV: si la sustancia absorbe la luz ultravioleta, se puede usar una fase estacionaria impregnada con un indicador fluorescente (F254 ó F366)

La introducción de la placa en vapores de yodo.

El roció de una solución de magnesio  $H_2SO_4$  1:1 (dentro de un compartimiento especialmente protegido y bajo una campana de extracción de gases).

Después calentar intensamente, por ejemplo, con un mechero hasta carbonizar los compuestos. (47)

### 1.13 ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO

#### 1.13.1 ESPECTROMETRIA

La espectroscopia surgió con el estudio de la interacción entre la radiación y la materia como función de la longitud de onda ( $\lambda$ ).

La espectrometría es la técnica espectroscópica para tasar la concentración o la cantidad de especies determinadas. En estos casos, el instrumento que realiza tales medidas es un espectrómetro o espectrógrafo.

La espectrometría a menudo se usa en física y química analítica para la identificación de sustancias mediante el espectro emitido o absorbido por las mismas. (53)

#### 1.13.2 ESPECTROMETRIA ULTRAVIOLETA-VISBLE

La espectroscopia ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible yadyacente (el ultravioleta UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano). En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas.

Esta técnica es complementaria de la espectrometría de fluorescencia, que trata con transiciones desde el estado excitado al estado basal, mientras que la espectrometría de absorción mide transiciones desde el estado basal al estado excitado. (53)

### **Aplicaciones**

La espectrometría UV/Vis se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados.

Soluciones de iones metálicos de transición: las soluciones de iones metálicos de transición pueden ser coloreadas(es decir, adsorben la luz visible) debido a que los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro.

El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por l presencia de otras especies, como algunos aniones o ligados.

Compuestos orgánicos: los compuestos orgánicos, especialmente aquellos con un alto grado de conjugación, también absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles.

Los disolventes orgánicos pueden tener una significación absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. El etanol absorbente muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico.

La ley de Beer-Lambert establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. (53)

## 1.14 RATAS (*Rattus norvegicus*)

### 1.14.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

**Superreino:** Eucariota

**Reino:** Animalia

**Subreino:** Eumetazoa

**Superphylum:** Deuterostomia

**Phylum:** Chordata

**Subphylum:** Vertebrata

**Infraphylum:** Gnathostomata

**Superclase:** Tetrapoda

**Clase:** Mammalia

**Subclase:** Theria

**Infraclase:** Placentalia

**Orden:** Rodentia

**Suborden:** Myomorpha

**Superfamilia:** Muroidea

**Familia:** Muridae

**Subfamilia:** Murinae

**Género:** *Rattus*

**Especie:** *norvegicus*

**Nombre binomial:** *Rattus norvegicus*

**Subspecies:** *R. n. albinicus* - *R. n. albus* - *R. n. norvegicus*. (75)

### 1.14.2 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

La rata noruega presenta un pelaje áspero y grueso con prominentes orejas desnudas y cola prácticamente desnuda, que generalmente es más corta que el cuerpo y cabeza. De color blanco.

Las hembras tienen 12 mamas. Posee cuatro incisivos, dos superiores y dos inferiores, carece de caninos y premolares anteriores lo que ocasiona que haya un diastema. (75)

Sus incisivos crecen durante toda su vida a partir de la base, que va sustituyendo la porción desgastada por la actividad de cortar y roer materiales duros. La parte exterior del diente es más dura y carece de nervio, salvo en la base. (75)

## MEDIDAS

Longitud total: 80 a 480 mm.

Longitud de la cola: 187 mm en promedio 153 a 218 mm.

Longitud de la pata trasera: 37 a 44 mm promedio.

Peso: 200 a 300 g. (75)

## CICLO REPRODUCTIVO

Puede ser a lo largo de todo el año, aunque se han reportado picos en primavera y otoño; las hembras son poliéstricas y pueden tener entre 1 y 12 camadas al año; presentan estro posparto. Las hembras son receptivas por un período de 20 horas, cada 4 a 6 días (51)42 Tiempo de gestación: De 21 a 26 días. (75)

## TAMAÑO DE LA CAMADA

Desde 2 hasta 22 crías; promedio 8 a 9. Las crías nacen ciegas y desnudas, pero pueden ver y están completamente cubiertas de pelo a los 15 días, dejando el nido a los 22 días, aproximadamente. Madurez sexual: Entre 2 y 3 meses. (75)

## HÁBITOS ALIMENTICIOS

Omnívora, comiendo desde materia vegetal, hasta animal y en particular semillas, granos, nueces, vegetales y frutas, aunque también comen insectos y otros invertebrados. Esta especie come todo lo que el ser humano y más, incluyendo papel, cera de abejas, jabón, etc.

La comida comúnmente es llevada para almacenar a sus guaridas. En particular prefiere alimentarse de productos animales, tales como pájaros y huevos, y es excelente cazadora de peces. También se pueden alimentar de ratones, pollos y crías de cerdos y borregos, atacando en ocasiones animales mayores. La principal limitante es la presencia de agua. (75)

## **CAPÍTULO II**

### **2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica y en el Bioterio perteneciente a la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

## 2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

### 2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

En la experimentación se usaron ratas wistar albinas de laboratorio.

A continuación se exponen las características del reactivo biológico de la colonia del Bioterio de la Escuela de Bioquímica y Farmacia.

### 2.2.2. MATERIA PRIMA

Como materia prima se utilizaron la raíz, el tallo, las hojas y la flor de la Escorzonera (*Perezia multiflora*). La materia prima fue recolectada en la comunidad de Sanjapamba- Tambuloma Parroquia San Andrés, Cantón Guano, Provincia de Chimborazo. (Mayo 2012).

### 2.2.3 EQUIPOS

1. Balanza analítica (BOECO)
2. Estufa (MEMMERT)
3. Mufla (OPTIC IVYMEN SYSTEM)
4. Espectrofotómetro
5. Rotavapor (HEIDOLPH TYPE HEIZBAD HEI-VAP)
6. pH-metro (HANNA INSTRUMENT)
7. Refrigeradora
8. Refractómetro
9. Bomba de vacío
10. Cabina extractora de gases (MEMMERT)
11. Cámara fotográfica (SONY)
12. Computadora HP
13. Balanza técnica (SARORIUS UNIVERSAL)

### 2.2.4 MATERIALES DE LABORATORIO Y OTROS

- Balones aforados de 10, 25, 50 y 100 mL
- Balones esmerilados de 500 mL
- Vasos de precipitación de 100 y 250 mL
- Probetas de 25 y 50 mL
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Matraz Erlenmeyer 250 mL
- Capsulas de porcelana
- Crisol
- Piseta
- Embudos
- Trípodes
- Espátulas
- Papel filtro
- Varilla de vidrio
- Papel aluminio
- Cánulas
- Cinta métrica

### 2.2.5 REACTIVOS

- Acetato de etilo
- Metanol
- Sílica gel
- Reactivo de fehling
- Alcohol amílico
- Magnesio metálico
- Ninhidrina 5%
- Cloruro de sodio
- Cloruro férrico
- Solución de carbonato de calcio

- Reactivo de sudan III
- Reactivo de Baljet
- Amonio 5% agua
- Hidróxido de potasio
- Hidróxido de sodio
- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico
- Cloroformo
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Dragendorff
- Ácido acético
- Éter etílico
- Agua destilada
- Alcohol potable
- Carragenina
- 

### **2.3 FACTORES DE ESTUDIO**

Los factores de estudio de esta investigación son:

- Composición química del vegetal y el contenido de quercetina.
- Evaluación in vivo de la actividad antiinflamatoria del extracto hidro-alcohólico de la Escorzonera (*Perezia multiflora*).
- Provocar con carragenina el edema plantar en un lote de 15 ratas de 250-270g de peso y analizar la actividad que posee el extracto hidro-alcohólico y sus sub-extractos de *Perezia multiflora*.
- Evaluación del diámetro y volumen de la pata de la rata relacionado con la concentración del vegetal utilizado y sus sub-extractos.

### **2.4 TÉCNICAS Y MÉTODOS**

#### 2.4.1 RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA

La Escorzonera (*Perezia multiflora*) fue recolectada en la provincia de Chimborazo, Cantón Guano, Parroquia San Andrés, en la comunidad de Sanjapamba-Tambuloma el día 23 de Mayo del 2012 con el criterio que se halle con flores y su extracción debe ser vegetal completo con raíz.

#### 2.4.2 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La comprobación e identificación taxonómica de la Escorzonera fueron realizadas por el Ing. Caranqui, curador del herbario de la ESPOCH.

#### 2.4.3 PROCESAMIENTO DE MATERIA PRIMA: MUESTREO

- Se tomó una muestra representativa del total de plantas de la Escorzonera, para el análisis. El contenido de sustancia depende de factores como la edad, la disponibilidad de nutrientes del suelo y el estado fitosanitario.
- La Escorzonera fue sometido a una limpieza, eliminando impurezas y cuerpos extraños, manualmente.
- Posteriormente se lavó con agua y cepillo, sumergiéndolas en un recipiente con agua.
- Dejar secarlas sobre un recipiente limpio, no exponiéndolas directamente al sol.
- Una vez secas, moler raíz, tallos, hojas y flores hasta obtener pequeñas partículas.
- Se almacenó la droga evitando la exposición a la luz y humedad en bolsas de papel si es posible estéril o de plástico.

#### 2.4.4 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

En esta investigación el método utilizado para realizar el extracto fue por maceración.

1. A un recipiente de vidrio con su respectiva tapa, se transfiere la droga cruda triturada y pesada, se humedece directamente con el etanol a 70%, procurando que el solvente cubra

completamente la muestra, generalmente se emplea por cada gramo de droga, 2mL de alcohol para la humectación). Macerar por 3-5 días.

2. Se transfiere a un vaso de precipitación de 1000mL toda la solución líquida por decantación.
3. Filtrar la solución, para eliminar los sólidos.
4. El filtrado se coloca en un balón esmerilado, pesado para concentrar a presión reducida.
5. Recoger el extracto hidro- alcohólico y poner en un recipiente de vidrio etiquetado. Si es necesario se refrigera a 4°C y se mantiene fuera del alcance de la luz y humedad.

#### 2.4.5 CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO

##### DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS

###### 1. Determinación de Olor

Se toma una tira de papel filtro de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina el olor característico del producto.

###### 2. Determinación de Color

En un tubo de ensayo limpio y seco, se llena hasta los 2cm con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas.

###### 3. Determinación del sabor

Colocar una pequeña cantidad de muestra en el borde de la palma de la mano o en el dedo índice e inmediatamente al contacto con la punta de la lengua se realiza la identificación de su sabor.

## DETERMINACIÓN DEL pH.

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno, pH. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógenos. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$\text{pH} = - \log a [\text{H}^+]$$

$$[\text{H}^+] = \text{actividad de los iones hidrógeno}$$

En la práctica la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea igual o analógico. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.

Se ajusta el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizará la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH de la muestra.

## DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA

Se entiende por densidad relativa a la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

Primeramente pésese el picnómetro vacío y secos 2° C y llénese con la porción de ensayo, manténgalo a la temperatura de 25 °C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 15 min y ajústesele el líquido al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso secar exteriormente el picnómetro. Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repite la operación con el agua destilada a 25 °C, después de limpio el picnómetro.

### **Expresión del resultado:**

La densidad relativa se calcula por la siguiente fórmula:

$$D = \frac{\text{peso de la muestra (de volumen determinado)}}{\text{Volumen}}$$

FÓRMULA N° 1.

## DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Esta relación viene dada por la siguiente ecuación: }

$$\eta = \frac{\text{Seni}}{\text{Sen}r_r}$$

FÓRMULA N° 2

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente.

Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada. Utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajusta el equipo seleccionado la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

Se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002. Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia se emplea la fórmula siguiente:

$$Nd_{25} = Ndt + 0.00044 (t-25)$$

**FÓRMULA N° 3.**

Nd<sub>25</sub> = índice de refracción a 25 °C.

Ndt = Valor leído en la escala del aparato a la temperatura.

T = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C).

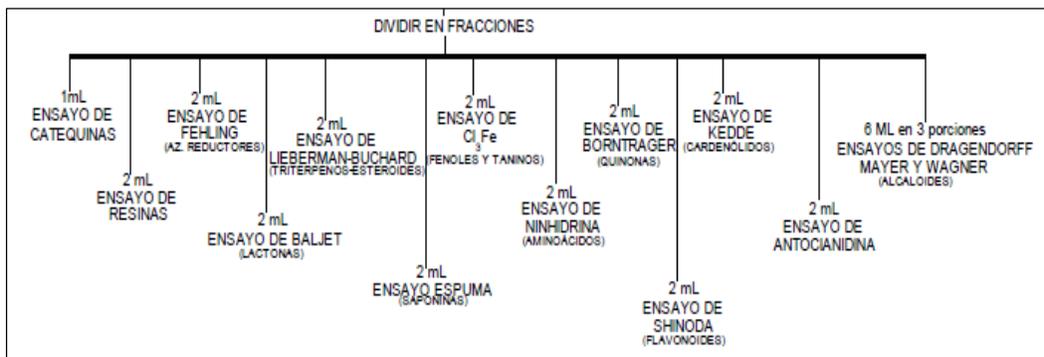
0.00044 = factor de correlación por Grados Celsius.

Los valores se aproximan hasta las milésimas.

## 2.5 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

La planta fresca, seca o el residuo de una extracción; es sometida a una extracción sucesiva según el esquema de la Figura. 8, al extracto se le mide el volumen obtenido y se le calcula su concentración, esto es, gramos de sustancias extraídas por mL de extracto.

Al extracto hidro-alcohólico se procede de la siguiente manera ilustrada en la figura 8.



FUENTE: NORMAS RAMALES. DROGAS CRUDAS Y EXTRACTOS Y TINTURAS. NRSP 309, 311 Y 312. MINSAP 1992.

**FIGURA No. 6 ESQUEMA DE LAS REACCIONES A REALIZAR EN EL EXTRACTO ALCOHÓLICO.**

### 2.5.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

### 2.5.2 ENSAYO DE LIEBERMANN-BURCHARD

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

**IMPORTANTE:** Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Liebermann-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso,

mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

### 2.5.3 ENSAYO DE BORNTRAGER

Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

### 2.5.4 ENSAYO DE BALJET

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.

### 2.5.5 ENSAYO DE CATEQUINAS

Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.

### 2.5.6 ENSAYO DE RESINAS

Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

#### 2.5.7 ENSAYO DE LA ESPUMA

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

#### 2.5.8 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos.

1. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
2. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
3. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

#### 2.5.9 ENSAYO DE SHINODA

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

#### 2.5.10 ENSAYO DE ANTOCIANIDINAS

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.

#### 2.5.11 ENSAYO DE FEHLING

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua

5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: Se pesan 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Solución B: Se pesan 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelven con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

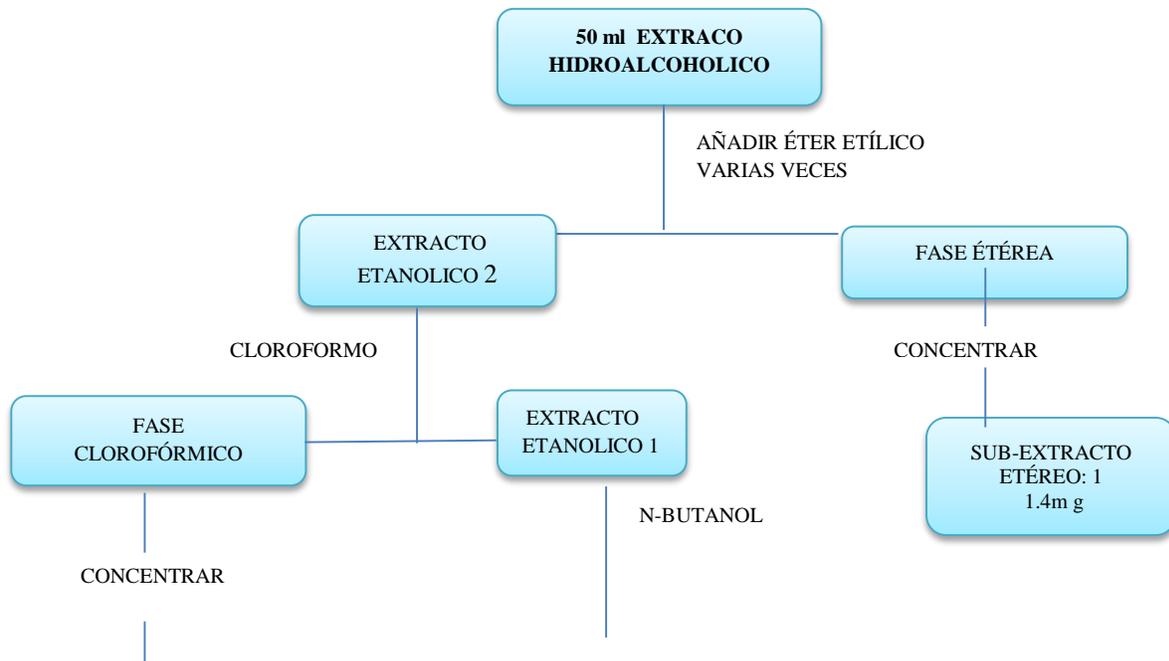
Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar. También pueden realizarse otros ensayos no comprendidos en este esquema de tamizaje, para la detección de otros compuestos.

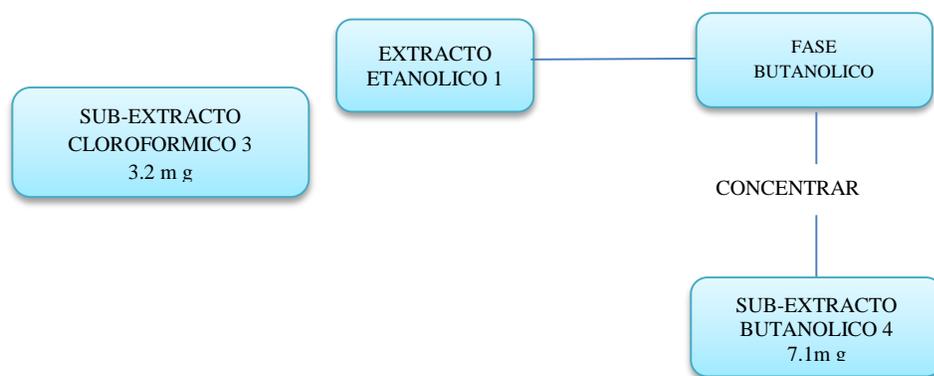
## 2.6 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO

En un embudo de separación colocar 50 ml del extracto hidro- alcohólico, adicionar éter etílico en un volumen de 30 ml, agitar, y dejar en reposo hasta obtener dos fases. Separar las fases superior etérea en un balón esmerilado previamente pesado. A la fase inferior extracto acuoso, agregar éter las veces necesarias hasta que el éter sea incoloro, eliminar el solvente, enfriar en el desecador y pesar, dando como resultado sub-extracto etéreo 1.

La fase etanólica 2 en un embudo de separación se adiciona cloroformo se agitar y se deja en reposo, hasta la formación de dos fases. La fase inferior de cloroformo se recoge en un balón pesado, este proceso se repite, hasta la presencia de disolución incolora. Se concentra y se obtiene el sub-extracto clorofórmico 3

La fase etanólica 1 se trata con n-butanol generalmente  $\frac{1}{2}$  de volumen con relación al etanol, se agita y se deja en reposo hasta la formación de dos fases. La fase superior corresponde al butanol, el proceso se repite hasta color normal del butanol. Fase superior se recoge en balones previamente pesado para concentrar hasta sequedad por destilación directa, eliminar todo el solvente, y se obtiene el sub-extracto butanólico 4





## 2.7 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

1. Un volumen de extracto o sub-extracto equivalente a un 1g de muestra disolver en 1 ml de metanol se aplica 20 ul de la solución metanolica.
2. Con un capilar, en una placa de sílica Gel G<sub>F</sub> 254 a 0,5 cm del borde lateral y 1 cm del borde inferior, si son varias manchas con separación de 0,5 cm.
3. Colocar en la cuba cromatografía el solvente de corrido, tapar para saturar de vapor.
4. La placa cromatografía se coloca en forma ligeramente inclinada, el solvente de corrido debe estar debajo de los puntos de aplicación.
5. Se deja secar después de cada aplicación.
6. Tapar la cámara cromatografía y dejar correr el solvente hasta 1 cm. del borde superior.
7. Finalmente se revela la placa con reactivo cromogénico, dejar secar, calentar en la estufa y anotar los R<sub>f</sub>.

**TABLA No 02: SISTEMA DE SOLVENTES PARA CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA**

Grupo fitoquímico	Cumarinas	Flavonoides	Derivados fenólicos
Fase estacionaria	Sílica gel G <sub>F</sub> 254	Sílica gel G <sub>F</sub> 254	Sílica gel G <sub>F</sub> 254
Solvente corrido	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> :CHCl <sub>3</sub> :EtOAc 3:5:2	EtOAc:HCO <sub>2</sub> H: CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H: H <sub>2</sub> O 100:11:11:26	Cl <sub>3</sub> CH 100
Muestra	Sub-extracto etéreo	Sub-extracto butanólico	Sub-extracto clorofórmico
Revelador	KOH 5% en Etanol	Sulfato cerio	Sulfato cerio

## CÁLCULO DEL $R_f$

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{distancia recorrida del solvente}}$$

FÓRMULA No.5

## 2.8 DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES POR ESPECTROSCOPIA UV.

En un embudo de separación colocar 50 ml del extracto hidro-alcohólico, adicionar tolueno, agitar, se observara la formación de dos fases.

Fase superior extracto acuoso, fase inferior de tolueno, separar la fase inferior y recoger en un balón esmerilado pesado. La fase etanolica extraer las veces necesarias. Dejar el extracto acuoso en el embudo con tolueno y reunir en el mismo balón esta fase.

Adicionar n-butanol, con agitación se formaran dos fases. Fase superior n-butanol, fase inferior extracto acuoso, extraer las veces que sean necesarios, hasta que el butanol este transparente.

Recoger la solución n-butanolica en un balón esmerilado y previamente tarado, para concentrar a sequedad, por destilación directa y así obtener el residuo seco de flavonoides totales.

Al residuo seco Butanólico (8,202 mg) disolver en metanol. Posteriormente se preparó diluciones 2:25 usando metanol como disolvente.

Se llevó las diluciones a lectura en el espectrofotómetro para determinar su absorbancia, a una longitud de onda ( $\lambda$ ) 254 nm.

Preparar una curva de concentración de flavonoide quercetina (Absorbancia vs Concentración).

## 2.9 PRUEBA DE EDEMA PLANTAR EN RATA INDUCIDO POR CARRAGENINA

La técnica utilizada para evaluar la actividad antiinflamatoria fue la del edema de pata en rata, inducido por carragenina (Método de Wintter y col.). (12) (18)

El método de edema plantar inducido por carragenina consiste en la administración subcutánea de una solución de carragenina a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por la liberación de diversos autacoides (histamina, serotonina,

bradicinina, prostaglandinas) además diversos factores del complemento que están implicados en la amplificación de la respuesta. El producto a ensayar se puede administrar vía oral, etc. (81)

Una hora después de la administración de la sustancia problema, la histamina y la serotonina tienen un papel principal como mediadores. De una hora y media a dos y media horas después de la inyección de carragenina, intervienen las cininas como mediadores. La última fase esta mediada por prostaglandinas (PGE1 y PGE2, PGF2). (8)(37)

La respuesta vascular máxima ocurre aproximadamente a las 6 horas de la administración de carragenina y coincide con la fase mediada por las prostaglandinas. La extravasación de proteínas ocurre durante toda la respuesta al agente edematógeno. La migración celular, fundamentalmente leucocitos polimorfonucleares, comienza a las 2 horas de haberse inyectado el agente. (37)

Es muy importante la estandarización del ensayo: hora, temperatura, etc. Se prefiere la carragenina ante otros irritantes porque el edema producido esta menos modificado por factores ajenos a los propiamente característicos de la inflamación y además, porque la actividad antiinflamatoria de este ensayo guarda una buena correlación con la actividad anti-inflamatoria en clínica. (37)

Se utilizaron grupos de 3 ratas por cada formulación. Se midieron los volúmenes normales de la pata derecha posterior de las ratas con una cinta métrica. Las formulaciones a ensayar se administraron por vía oral empleando jeringas con aguja adaptada para ser usadas como sonda orogástrica. El vehículo utilizado fue agua destilada. Un grupo recibió una dosis del agente antiinflamatorio (Fármaco de referencia) Diclofenaco sódico 50 mg (3,85 mg/Kg).

Media hora después de la administración de las sustancias de ensayo, se indujo el edema inyectando 0,1mL de una disolución acuosa al 0,5% de carragenina en la aponeurosis plantar derecha de las ratas. La medida del volumen de la pata derecha inflamada se realizó con una cinta métrica (largo y diámetro). La inflamación se cuantificó midiendo el volumen de las patas a las 0, 1, 2, 4, 6, 8,10 y 12 horas después de la inyección de carragenina. La diferencia de volumen entre la pata derecha inflamada y la misma pata derecha normal antes de la inyección de carragenina es indicativa del grado de inflamación.

Se calculó el volumen de inflamación producido, con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen} = \pi/4d^2h$$

FÓRMULA No.6

Dónde:

d = diámetro de la pata

h = largo de la pata

Los resultados se determinaron como porcentaje de inflamación utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inflamación} = \frac{V_{\text{control positivo}} - V_{\text{normal}}}{V_{\text{normal}}} \times 100$$

FÓRMULA No.7

Dónde:

V control positivo = volumen de la pata inflamada a un tiempo x

V normal = volumen normal (antes de la aplicación de Carragenina). (68)

Nota: Las ratas se encontraban en un estado de salud óptimo y en ayuno de 12 horas.

El porcentaje de Inhibición de la reacción inflamatoria de la Carragenina, se calcula en la fase aguda a las 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas de la inyección de la misma.

$$\% \text{ Inhibición fase aguda} = \frac{V_{\text{control problema}} - V_{\text{control positivo}}}{V_{\text{control problema}}} \times 100$$

FÓRMULA No.8

Dónde:

V control problema = volumen de la pata inflamada sin antiinflamatorio

V control positivo = volumen de la pata inflamada con antiinflamatorio

V normal = volumen normal (antes de la aplicación de Carragenina).

## 2.10 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon 15 animales de experimentación (12 machos y 3 hembras). Aplicando el principio de las 3R (reducción, refinamiento y reemplazo), se utilizan 15 animales de experimentación para la primera ronda de administración y se realizarán 3 repeticiones para verificar la reproducibilidad y se valide la investigación. En total se necesitan como máximo 40 animales de experimentación.

Procedimiento:

### FASE 1: ACLIMATACIÓN

- Aislamiento de las ratas (machos y hembras) una semana previo a la experimentación.
- Peso de las ratas: 250-270g.
- Edad: Dos meses
- Temperatura: 18°C
- Comida: 3g de pellets/100g peso de la rata; agua *ad libitum*

### FASE 2: DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS

- Grupo negativo: 3 ratas
- Grupo positivo: 3 ratas
- Grupos experimentales: 15 ratas, divididas en grupos de 3 para cada dosis del extracto de Escorzonera.
- Medir de cada grupo los volúmenes normales de la pata derecha posterior de las ratas con una cinta métrica.
- El grupo control recibió solamente el vehículo (agua *ad libitum*).

### FASE 3: INDUCCIÓN DEL EDEMA PLANTAR

#### **Control Negativo:**

Inducción con carragenina 0,5%

- Dosis: A partir del octavo día de experimentación administramos 0,1 mL de una disolución acuosa de carragenina 0,5% por vía subcutánea a nivel de la aponeurosis plantar derecha de la

rata, posteriormente se mide el volumen de la pata desde el inicio hasta el final de la investigación.

- Intervalos: Medir el volumen (largo y diámetro) de las patas a las 0, 1, 2, 4, 6, 8,10 y 12 horas después de la inyección de carragenina.

La diferencia de volumen entre la pata derecha inflamada y la misma pata derecha normal antes de la inyección de carragenina es indicativa del grado de inflamación.

#### FASE 4: TRATAMIENTO

##### **Control Positivo:**

- Dosis: Administrar 1 mL de solución de Diclofenaco sódico de 50mg a una concentración 3,85mg/kg por vía oral empleando jeringas con aguja adaptada para ser usadas como sonda orogástrica. El vehículo utilizado fue agua destilada. Media hora después administramos 0,1 mL de carragenina 0,5%. Posteriormente se mide el volumen de la pata desde el inicio hasta el final de la investigación.
- Intervalos: Medir el volumen (largo y diámetro) de las patas a las 0, 1, 2, 4, 6, 8,10 y 12 horas.

#### FASE 5: GRUPOS EXPERIMENTALES

- Dosis: Administrar 0.8 mL; 0.4mL; 1.7mL; 1.7 ml; 1,7 ml de extracto y sub-extracto de la Escorzonera a concentraciones de 92.07mg/kg; 46.03mg/kg; 5.30 mg/kg; 11,77 mg/kg y 2.32 mg/Kg de peso. Por vía oral empleando jeringas con aguja adaptada para ser usadas como sonda orogástrica. El vehículo utilizado fue agua destilada. Media hora después
- administramos 0,1 mL de carragenina 0,5%. Medir el volumen de la pata desde el inicio hasta el final de la investigación.
- Intervalos: Medir el volumen (largo y diámetro) de las patas a las 0, 1, 2, 4, 6, 8,10 y 12 horas.

#### **2.11. MODELO EXPERIMENTAL**

**CUADRO No. 1 ESQUEMA DE ENSAYO UTILIZADO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE 5 TRATAMIENTOS.**

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>REPETICIONES</b>		
<b>T1</b>	R1	R2	R3
<b>T2</b>	R1	R2	R3
<b>T3</b>	R1	R2	R3
<b>T4</b>	R1	R2	R3
<b>T5</b>	R1	R2	R3
<b>T6</b>	R1	R2	R3
<b>T7</b>	R1	R2	R3

DONDE:

T1 = Extracto hidro-alcoholico 92,07 mg/kg (0.010 mg de Quercetina)

T2 = Extracto hidro-alcoholico 46,03 mg/Kg

T3 = Sub-extracto Clorofórmico 5,30 mg/Kg

T4= Sub-extracto Butanolico 11,77 mg/Kg (1.29x10<sup>-3</sup> mg de Quercetina)

T5= Sub-extracto etéreo 2,32 mg/Kg

T6 = Medicamento de Referencia Diclofenaco sódico 3.85 mg/Kg

T7 = Grupo Control Carragenina 0,5%

Al extracto hidro-alcohólico de la Escorzonera (*Perezia multiflora*) se le evaporó el etanol hasta sequedad y se le reconstruyó con agua destilada para evitar gastritis a las ratas. Se les administró en dosis de 92,07 mg/Kg; de 46,03 mg/Kg de extracto hidroalcoholico y de 5,30 mg/Kg; 11,77 mg/Kg y de 2,32 mg /Kg de los subextractos, clorofórmico, butanolico y etéreo respectivamente, para comprobar la actividad antiinflamatoria en ratas (*Rattus novergicus*) con edema plantar inducido con carragenina 0,5%.

El Diclofenaco sódico 50mg fue administrado en dosis (3,85 mg/Kg), utilizada como droga control positivo para reducir la inflamación provocada por carragenina 0,5%. Mientras que el grupo control negativo recibió solo el vehículo agua destilada.

El volumen del edema plantar de la rata se evaluó al inicio de la investigación y al término de la misma para esto se toma en cuenta tanto el diámetro como el largo de la pata derecha, con el fin de conocer de qué manera actúa el extracto administrado.

Las mediciones se realizaron a las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas después de la inyección de la carragenina, posteriormente se calcula el volumen de cada medición y se realiza un promedio de las tres replicas.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección se mostrará en cuadros, los datos experimentales y los resultados obtenidos al aplicar todo lo descrito en los capítulos anteriores.

#### 3.1 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA FRESCA DE LA ESCORZONERA

*(Perezia multiflora).*

Para la utilización de la droga vegetal en la investigación del efecto antiinflamatorio, se recomienda la realización del control de calidad de la planta, esta debe estar sana, libre de impurezas para que no existan interferencias. La Escorzonera (*Perezia multiflora*) fue adquirida en la Parroquia de San Andrés en el mes de Mayo del 2012

### 3.2 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La comprobación taxonómica e identificación botánica fue realizada por el Herbario de la Escuela de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH, por el Ing. Caranqui.

Se confirmó que la Escorzonera, *Perezia multiflora* ya que pertenece a la Orden *Asterales*; Familia *Asteraceae*; Genero *Perezia* y Especie *Perezia multiflora*.

### 3.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA ESCORZONERA.

**CUADRO No 2 RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA.FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA AGOSTO 2012**

Ensayo	Metabolito	Especificación	Resultados
FeCl <sub>3</sub>	Compuestos fenólicos Taninos	y/o -Coloración rojo-vino (compuestos fenólicos en general). -Coloración verde intensa (taninos del tipo pirocatecólicos). -Coloración azul, (taninos del tipo pirogalotánicos).	Compuestos fenólicos en general Coloración: Vino (++) +)
Shinoda	Flavonoides	Coloración, Amarillo, Naranja, Carmelita o rojo intensos en todos los casos.	Carmelita (+++)
Dragendorff	Alcaloides	Opalescencia (+) Turbidez(++) Precipitado (+++)	Precipitado de color café: (+++)
Mayer	alcaloides	Opalescencia (+) Turbidez (++) Precipitado coposo(+++)	Turbidez (++)
Baljet	Compuestos agrupamiento Lactónico ( cumarinas)	con Coloración rojo (++) precipitado rojo( +++)	Color rojo (++)
Borntrager	quinonas	Coloración rosada (++) Coloración roja (+++)	Coloración roja (+++)

Liebermann-Burchard	Triterpenos y/o esteroides	Rosado-azul Verde intenso-visible Verde oscuro-negro-final	Coloración. Verde oscuro-negro-final (++)
Fehling	Azucares reductores	Solución de color rojo o aparece precipitado rojo	Color rojo (++)
Antocianidinas	Flavonoides de estructura(C6-C3-C6)	Color rojo a marrón en la fase amílca,	Carmelita (++)

Dónde:

(+) Baja intensidad de la reacción

(++) Intensidad moderada de la reacción

(+++) Intensidad de alta de la reacción

### 3.4 PROPIEDADES FISICO QUIMICAS DEL EXTRACTO.

**CUADRO No 3. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS EN EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Perezia multiflora*. LABORATORIO DE FITOQUIMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.RIOBAMBA AGOSTO 2012**

PARÁMETROS	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Peso muestra	300g	226,18 g
Rendimiento	90 %	77,8%
Aspecto	Liquido	Liquido
Color	Verde oscuro	Verde oscuro
Olor	Amargo	Amargo
Sabor	Amargo	Amargo
pH	-	5.10
Densidad	-	1.029 g/ml
Índice de refracción	-	1,345
Tamizaje fitoquímico	Flavonoides, fenoles, taninos, cumarinas, triterpenos y esteroides; saponinas y mucilagos	Alcaloides (+++), Compuestos lactonicos (++) , triterpenos y/o esteroides (++) , compuestos fenólicos y/o taninos (+++), quinonas (+++), flavonoides (+++).
Marcador químico	Flavonoides	Flavonoides +++
Cromatografía	8-metoxipereflorina	Rf: 0.05
Placa sílica Gel G <sub>F</sub> 254	3,8-dimetoxipereflorina, pereflorina y	0.25
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> :Cl <sub>3</sub> CH:EtoAc 3:5:2	3, 4,8-trimetoxi-6-hidro-5-formil-2H-	0.33
KOH 5% Etanólico	benzopiran-2-ona.	0.63 0.83 0.93
		Rf:

Cromatografía Flavonoides	Placa sílica Gel G <sub>F</sub> 254	0.15
	EtOAc:HCO <sub>2</sub> H:H <sub>3</sub> CCO <sub>2</sub> H:H <sub>2</sub> O	0.35
	100:11:11:2	0.49
	Sulfato de cerio	0.68
		0.74
		0.86
Cromatografía Compuestos fenólicos	Placa sílica Gel G <sub>F</sub> 254	R <sub>f</sub>
	Cl <sub>3</sub> CH 100	0.05
	Sulfato cerio	0.12
		0.18
		0.57
		0.74
Rendimiento sub-extractos etéreo	-	2 %
Rendimiento sub-extracto butanólico	-	14 %
Rendimiento sub-extracto clorofórmico	-	7%

El porcentaje de rendimiento del extracto concentrado de la Escorzonera (*Perezia multiflora*) es de 77,8%, este valor puede variar por el método utilizado para la recuperación del solvente. En este caso se utilizó el método de destilación directa, también influye la relación entre el vegetal con el Etanol al 70% que aumenta de acuerdo al tiempo de maceración.

Las características organolépticas del extracto hidro-alcohólico de la escorzonera (*Perezia multiflora*), siendo líquido en su aspecto, de color verde oscuro, sabor amargo y olor característico de la planta.

El pH expresa la concentración de iones hidronio [H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>] presentes en determinadas sustancias. En el extracto de Escorzonera (*Perezia multiflora*) el pH es de 5.10. Sugiere, que los compuestos químicos presentes son con características ácidas débiles (fenoles, taninos, flavonoides, entre otros).

Comparándolo con la densidad del solvente empleado en la preparación de la misma (etanol), siendo de 0.789 g/ml; se observa que es mayor. Este valor es indicativo de que en el extracto existen sustancias en disolución.

El índice de refracción es de 1.345 este valor nos indica la presencia de sustancias disueltas, pues al compararlo con el del agua (1,333), podemos observar que es mayor.

El tamizaje fitoquímico, realizado, identificó la presencia de los siguientes metabolitos secundarios, como Lactonas y Cumarinas, Triterpenos y Esteroides, Compuestos fenólicos y Taninos, Flavonoides, Azúcares reductores, Alcaloides y Antocianidinas. Y según Segundo Gibaja en pigmentos naturales dice que la especie de *Perezia multiflora* que crece en Ecuador contiene las cumarinas 8-metoxipereflorina, 3,8dimetoxipereflorina, pereflorina y 3,4,8-trimetoxi-6-hidro-5-formil-2H-benzopiran-2-ona.

Estos datos coinciden con el estudio de compuestos fitoquímicos de la Escorzonera realizado por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Perú en el 2007)

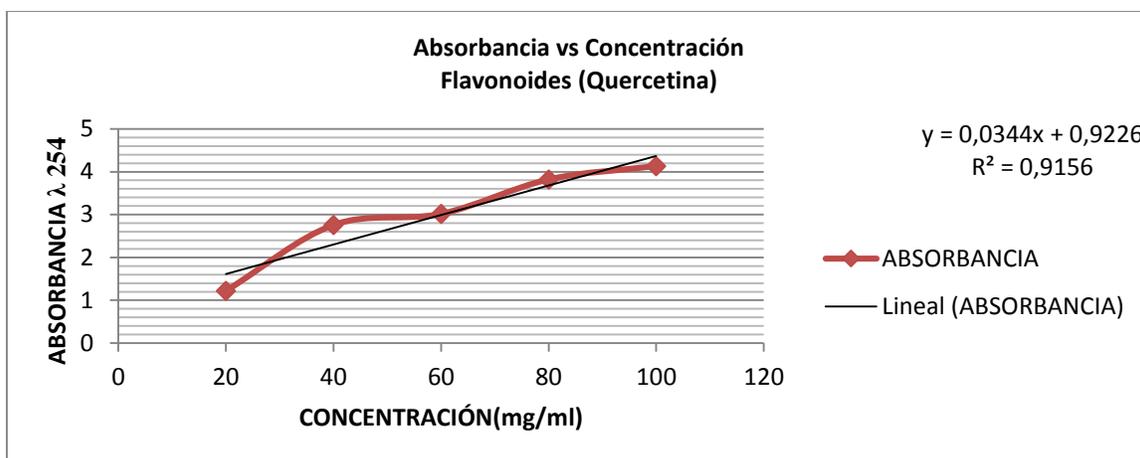
Los metabolitos encontrados en esta investigación fueron: flavonoides, fenoles y taninos, cumarinas, triterpenos y esteroides, saponinas y mucílagos.

La presencia de compuestos como flavonoides, compuestos fenólicos, Triterpenos y Esteroides, en su composición justifican las propiedades antiinflamatorias que registran estas especies en bibliografía. (31)

### 3.5 CURVA DE CALIBRACION DE QUERCETINA POR ULTRAVIOLETA

**CUADRO NO. 4 LECTURAS EN EL ESPECTROFOTOMETRO DE LA QUERCETINA. LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL.FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA SEPTIEMBRE 2012.**

Concentración (mg/mL)	Absorbancia $\lambda = 254 \text{ nm.}$
20.00	1,22
40.00	2,756
60.00	3,014
80.00	3,818
100.00	4,131



**GRAFICO No 01. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHOLICO DE LA ESCORZONERA. LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. RIOBAMBA SEPTIEMBRE 2012.**

En el cuadro No. 4 se indica que el extracto hidro-alcohólico de la Escorzonera (*Perezia multiflora*) que contiene flavonoides, presenta valores de absorbancia obtenidos a partir de la medición en el espectrofotómetro UV-Visible a 254 nm, ya que a esta longitud de onda se muestran excelentes cromóforos para su cuantificación. (200 a 400nm). Aplicando la ley de LAMBERT Y BEER.: se obtiene una concentración de 71.12 ppm y un porcentaje de 11.11%.

### 3.6 CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LOS SUBEXTRACTOS

Sílica gel 60 F254 (Merck) Acetato de Etilo, Ácido Acético, Acido Fórmico, Agua (100:11:11:26) Sub-extracto Butanólico Sulfato cerio	Sílica Gel G <sub>F</sub> 254 C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> :Cl <sub>3</sub> CH:EtoAc 3:5:2 Sub-extracto etéreo KOH 5% Etanólico	Sílica Gel G <sub>F</sub> 254 Cl <sub>3</sub> CH 100 Sub-extracto clorofórmico Sulfato cerio
---	---	---

		
Flavonoides	Cumarinas	Derivados fenólicos
Rf 1: 0.15	Rf 1: 0.05	Rf 1: 0.05
Rf 2: 0.35	Rf 2: 0,25	Rf 2: 0,12
Rf 3: 0.49	Rf 3: 0.33	Rf 3: 0,18
Rf 4: 0.68	RF 4: 0,63	Rf 4: 0,57
Rf 5: 0.74	RF 5 : 0.83	Rf 5: 0,74
Rf 6: 0.86	RF 6: 0,93	

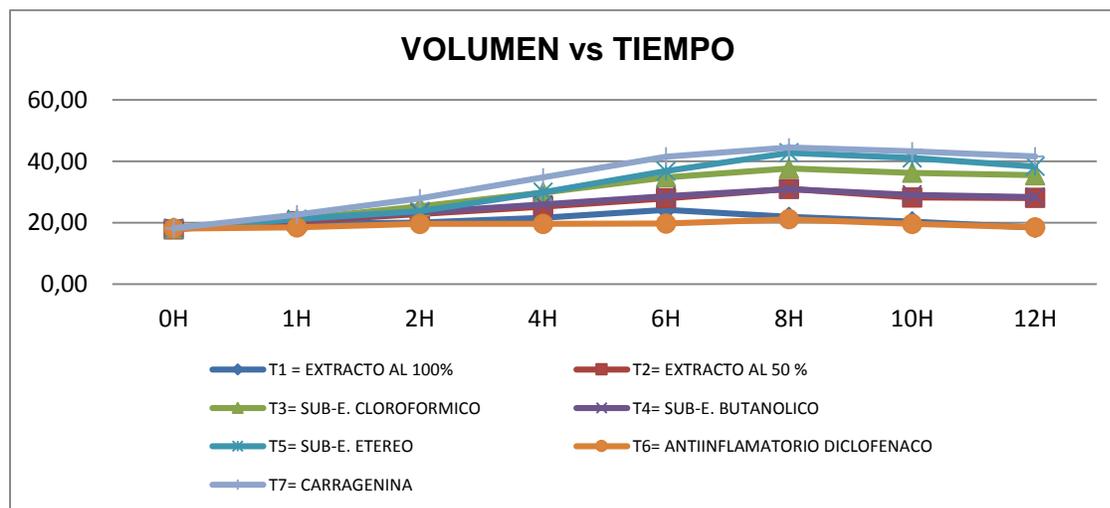
**FOTOGRAFIA No 02. PLACA CROMATOGRAFIA DE LOS SUB-EXTRACTOS. LABORATORIO DE FITOQUIMICA.FACULTAD DE CIENCIAS.EPOCH.RIOBAMBA SEPTIEMBRE 2012.**

### **3.7 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO CON LOS EXTRACTO Y SUB-EXTRACTOS EN EDEMA INDUCIDO.**

**CUADRO No 5: VOLUMENES REGISTRADOS DE LA REGIÓN SUBPLANTAR DE LAS RATAS A LOS DIFERENTES TIEMPOS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. RIOBAMBA SEPTIEMBRE 2012.**

<b>TRATAMIENTOS</b>	0H	1H	2H	4H	6H	8H	10H	12H
T1 = Extracto 92,07mg/Kg	18,36	19,67	20,07	21,59	24,14	21,89	20,36	18,36
T2= Extracto 46,03 mg/Kg	17,85	20,37	22,82	25,23	27,93	30,99	28,20	28,05
T3= Subextracto clorofórmico 5,30 mg/Kg	18,10	21,15	25,30	29,82	34,80	37,63	36,25	35,45

T4= Sub-extracto butanólico 11,77 mg/Kg	18,22	20,85	23,33	25,91	28,63	30,91	29,07	28,36
T5= Sub-extracto etéreo 2,32 mg/Kg	17,93	21,17	23,73	29,90	36,80	42,80	41,07	38,32
T6= Diclofenaco sódico 3,85 mg/Kg	18,12	18,45	19,59	19,59	19,69	21,10	19,58	18,44
T7= Carragenina 0.5%	18,16	22,66	27,89	34,74	41,54	44,50	43,25	41,60



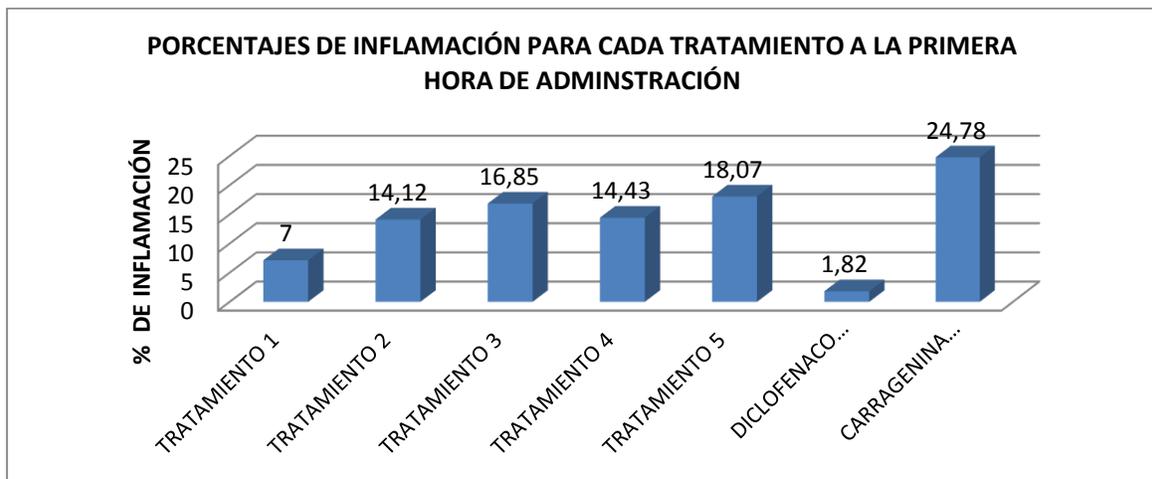
**GRÁFICO No. 02. VOLUMENES REGISTRADOS DE LA REGION SUBPLANTAR DE LAS RATAS A LOS DIFERENTES TIEMPOS CON LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS. RIOBAMBA ENERO 2013**

Los mayores volúmenes desarrollados durante todo el ensayo, se observaron en el grupo control, teniendo un valor máximo a la octava hora de 44,50 cm<sup>3</sup>. En cambio con el Diclofenaco sódico presenta un volumen de 21,10cm<sup>3</sup>.

Con respecto a los grupos con los Tratamientos: T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg (21,89 cm<sup>3</sup>); T2 extracto hidro-alcohólico 46,03 mg/Kg (30,99 cm<sup>3</sup>), T3 sub-extracto clorofórmico 5,30 mg/Kg (37,63 cm<sup>3</sup>), T4 sub-extracto butanólico 11,77 mg/Kg (30,91 cm<sup>3</sup>), T5 sub-extracto etéreo 2,32 mg/Kg (42,80 cm<sup>3</sup>) presentaron volúmenes inferiores a los desarrollados por el grupo control. Por lo que estos presentan actividad antiinflamatoria ya que disminuyen el edema producido por la Carragenina (0,5%).

### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

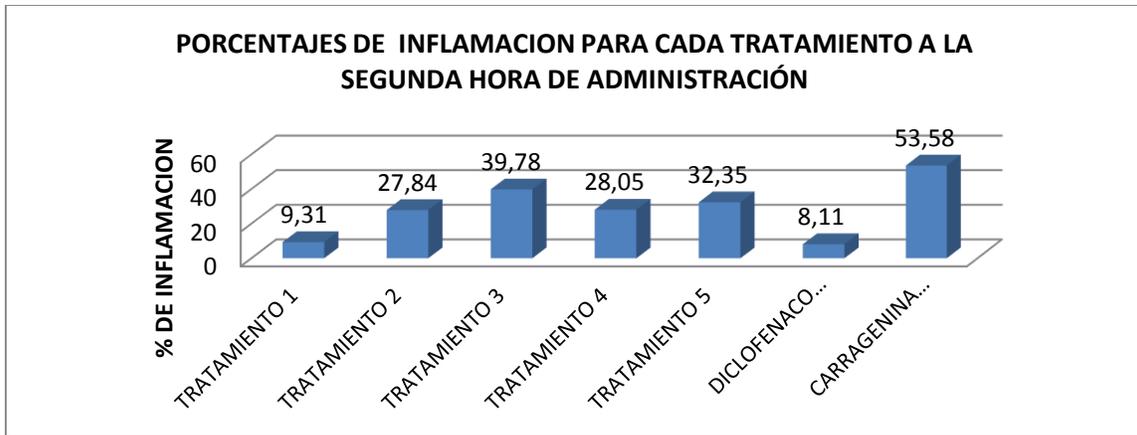
Todos los datos que se muestran a continuación se obtuvieron utilizando la fórmula de porcentaje de Inflamación, descrita anteriormente en la metodología. Para elaborar las gráficas se utilizó el programa Microsoft office Excel 2007. El análisis estadístico de los resultados se realizó comparando los promedios de cada uno de los grupos con sus respectivos grupos control utilizando la prueba de ANOVA y el test de Tukey para determinar qué valores presentaban una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control.



**GRÁFICO No. 03. EFECTO ANTIINFLAMATORIO A LA PRIMERA HORA DE ADMINSTRACIÓN. RIOBAMBA ENERO 2013.**

De los resultados anteriormente mostrados el porcentaje de inflamación a la primera hora se obtuvo un valor mayor en el grupo tratado solo con el agente inflamatorio Carragenina 0,5% (24,78%), el T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg (7 %) y un menor porcentaje de inflamación para el medicamento de referencia Diclofenaco sódico 3,85 mg/Kg (1,82%), T2 extracto hidro- alcohólico 46,03 mg/Kg (14,12%), T3 sub-extracto clorofórmico (16,85 %), T4 sub-extracto butanolico (14,43%) y T 5 etéreo (18,07%).

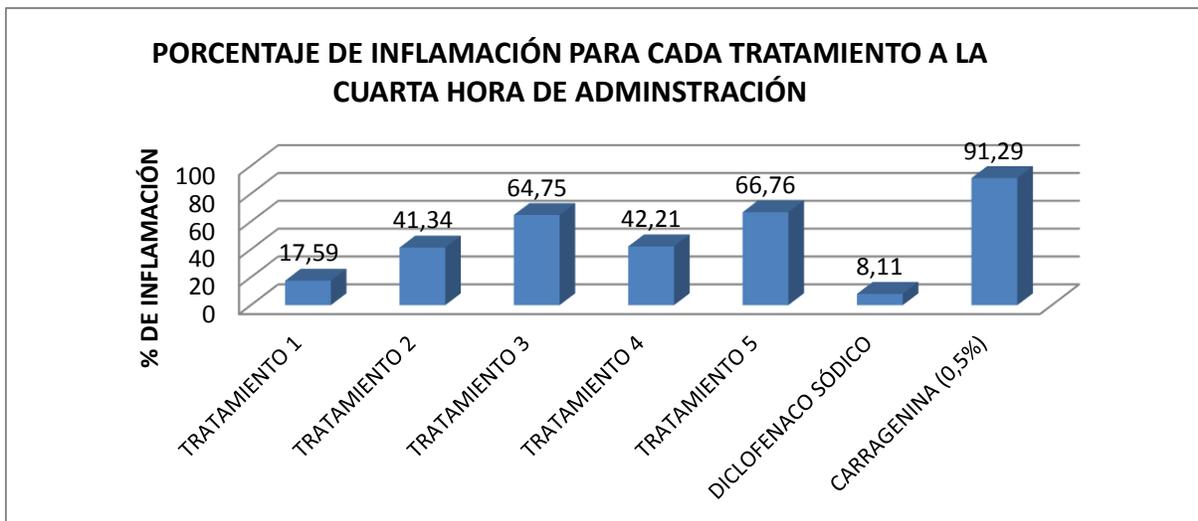
A la primera hora hay un efecto antiinflamatorio similar entre el Diclofenaco sódico y el T 1.



**GRÁFICO No. 04. EFECTO ANTIINFLAMATORIO A LA SEGUNDA HORA DE ADMINSTRACIÓN. RIOBAMBA ENERO 2013.**

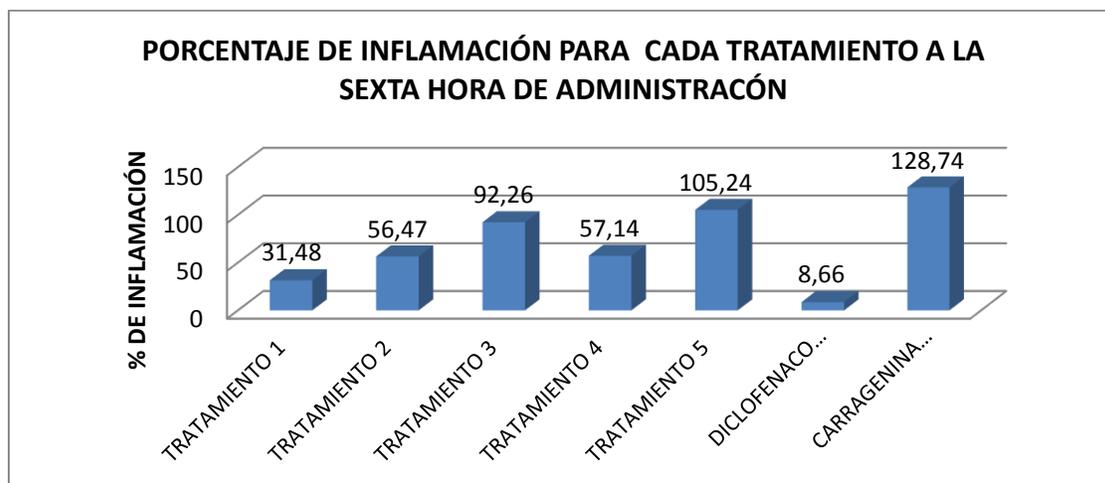
A la segunda hora de administración el porcentaje de Inflamación para el grupo control se incrementó (53,58 %), en comparación al grupo tratado con Diclofenaco sódico que mantuvo su efecto antiinflamatorio (8,11%), las formulaciones en estudio también mantuvieron su efecto antiinflamatorio registraron un 27,84 % para el T2 extracto hidro-alcohólico 46,03 mg/Kg; 39,78 % para el T3 sub-extracto clorofórmico ; 28,05 % para el T4 sub-extracto butanólico; 32,35 % para el T5 sub-extracto etéreo y para el T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg es de 9,31 % estos valores son similares al porcentaje de inflamación del grupo control.

Se puede apreciar que el T1 presentó un porcentaje de inflamación menor en comparación con los demás Tratamientos, esta es similar al porcentaje de Inflamación que presentó el medicamento de referencia.



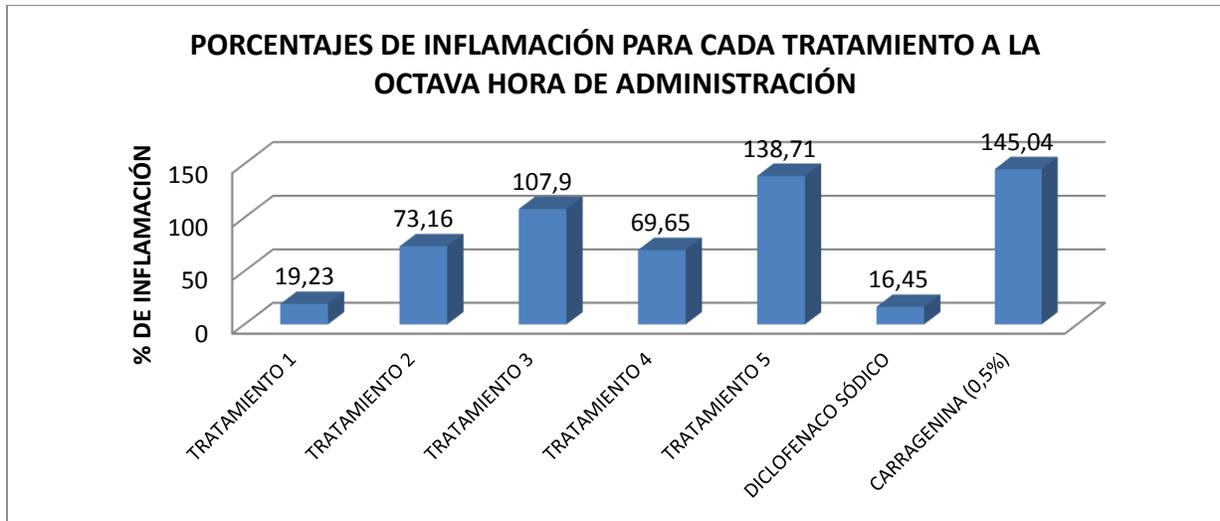
**GRÁFICO No. 05. EFECTO ANTIINFLAMATORIO A LA CUARTA HORA DE ADMINISTRACIÓN. RIOBAMBA ENERO 2013**

A la cuarta hora el porcentaje de Inflamación para el grupo control aumento a 91,29%, en comparación al Diclofenaco sódico que registra tan solo un 8,11% seguido de 17,59 %; 41,34 %; 42,21 %; 64,75%; 66,76 % de inflamación para los tratamientos 1, 2, 4, 3 y 5 respectivamente.



**GRÁFICO No.06 EFECTO ANTIINFLAMATORIO A LA SEXTA HORA DE ADMINISTRACIÓN.RIOBAMBA ENERO 2013**

El porcentaje de inflamación del medicamento de referencia (8,66 %). Los demás tratamientos que presentaron porcentajes de inflamación mayores de 31,48 % para la T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg; de 56,47% de inflamación para el T2 extracto hidro-alcohólico 46,03 mg/Kg; de 57,14 % para el T 4 sub-extracto butanólico; para T3 sub-extracto clorofórmico de 92,26 %; y para el T 5 sub-extracto etéreo de 105,24 %, este tiene un comportamiento similar al grupo control que presento un porcentaje de inflamación de 128,74 %.

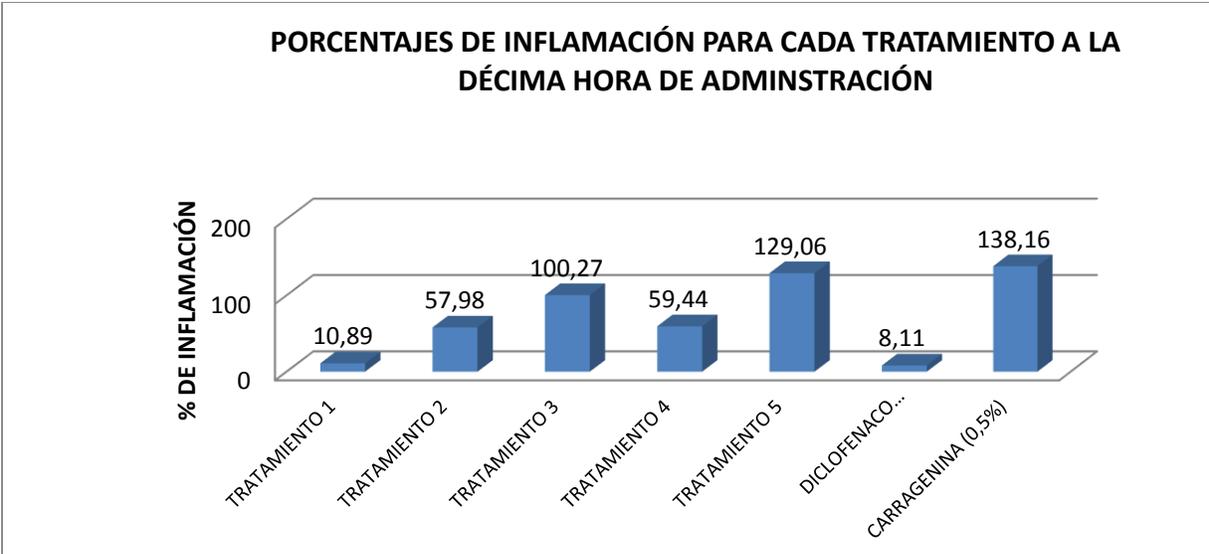


**GRÁFICO No. 07. EFECTO ANTIINFLAMATORIO A LA OCTAVA HORA DE ADMINSTRACIÓN.RIOBAMBA ENERO 2013.**

A la octava hora de administración se manifiesta en forma marcada los cuatro signos de la inflamación ya que aumenta el rubor (coloración roja); tumor (hinchazón); calor y dolor. El calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor se produce por el edema y acumulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor.

Se mantiene el efecto antiinflamatorio en los grupos tratados con Diclofenaco sódico (16,45 %), porcentaje de inflamación del T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg (19,23 %), quiere decir que tiene un similar efecto.

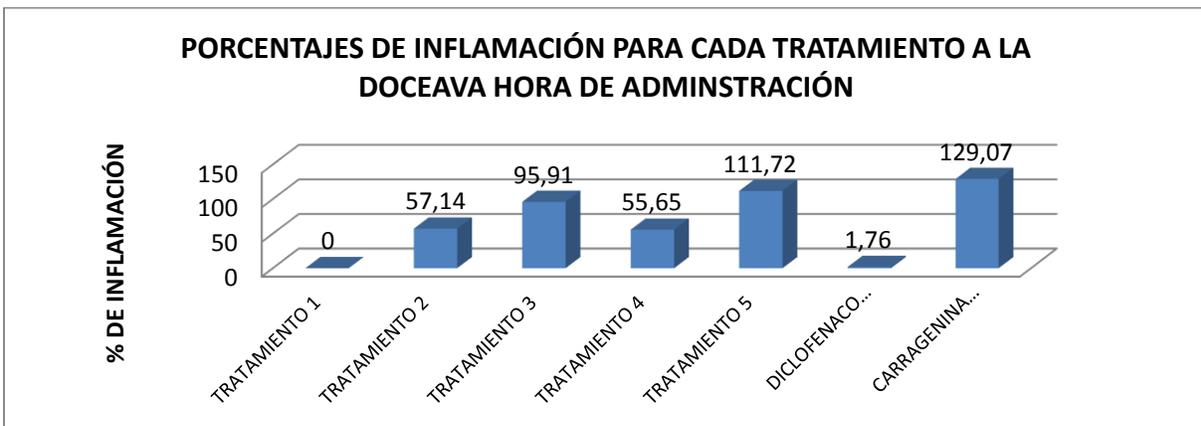
En cambio la actividad antiinflamatoria en el T2 extracto hidro-alcohólico 46,03 mg/Kg (73,16%); T3 sub-extracto clorofórmico (107,90%); T4 sub-extracto butanólico (69,65%) y T5 sub-extracto etéreo (138,71%), hay decrecimiento, pero es más marcada el tratamiento 1, la inflamación producida en el grupo control (145,04 %).



**GRÁFICO No. 08. EFECTO ANTIINFLAMATORIO A LA DÉCIMA HORA DE ADMINSTRACIÓN. RIOBAMBA ENERO 2013.**

A partir de la décima hora de administración no hay incrementos, más bien comienza a disminuir el edema producido por la Carragenina 0,5%.

Se observa que el porcentaje de inflamación del grupo control es menor que la hora anterior (138,16 %) de igual manera comienza a disminuir el efecto antiinflamatorio del Diclofenaco sódico ( 8,11%), pero el efecto de los tratamientos también disminuyen T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg (10,89 %), T2 extracto hidro-alcohólico 46,03 mg/Kg (57,98 %) , T3 sub-extracto clorofórmico (100,23 %), T4 sub-extracto butanólico (59,44%); T5 sub-extracto etéreo (129,06).



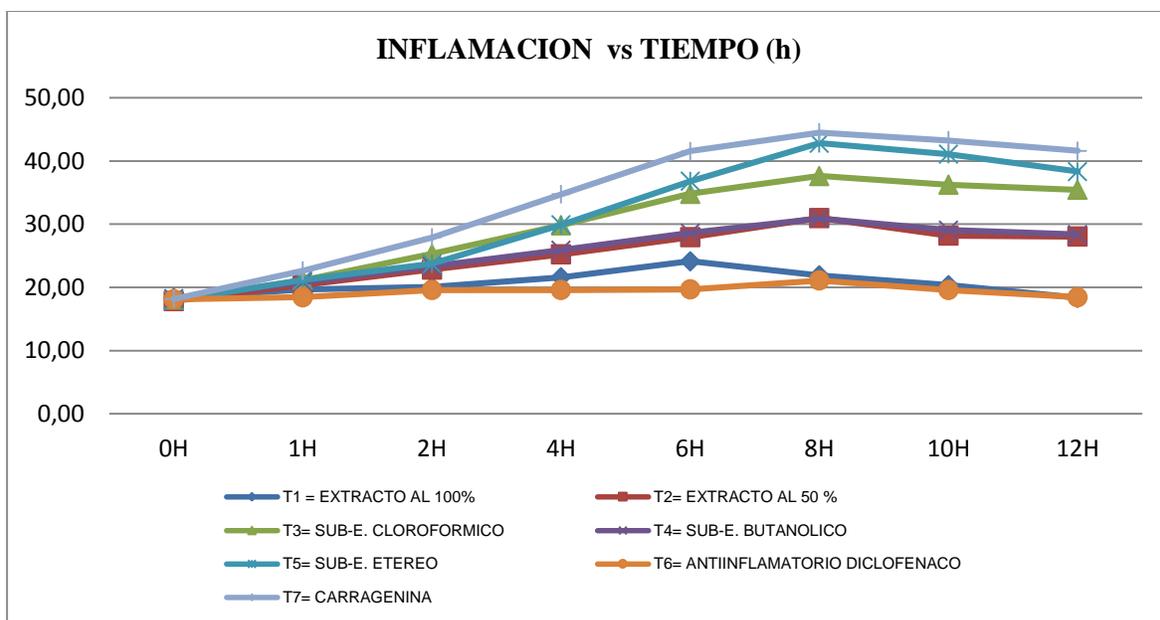
**GRÁFICO No. 09 EFECTO ANTIINFLAMATORIO A LA DOCEAVA HORA DE ADMINISTRACIÓN. RIOBAMBA. ENERO 2013.**

Sigue disminuyendo el volumen de la región sub-plantar de la rata como en la hora anterior. No hay incrementos, se observa que el porcentaje de inflamación del grupo control es menor (129,07 %) de igual manera comienza a disminuir el efecto antiinflamatorio del Diclofenaco sódico (1,76 %), pero el efecto del T1 extracto hidro-alcohólico es de 0,0 % es decir regresa a un volumen normal, mientras que los tratamientos son T2 extracto hidro-alcohólico (57,14%), T3 sub-extracto clorofórmico (95,91 %); T4 sub-extracto butanólico (55,65%) y T5 sub-extracto etéreo (111,72 %).

En las plantas medicinales se encuentran un grupo importante de metabolitos secundarios con propiedades antiinflamatorias entre los que se encuentran fenoles, flavonoides y esteroides. Estos compuestos ejercen su acción farmacológica interfiriendo en la producción o disminución de los diferentes mediadores químicos del proceso inflamatorio. (29)

Por lo que se establece que el T1 extracto hidro-alcohólico 92.07 mg/Kg produjo un porcentaje de inhibición del edema de 50,81%, se puede concluir que presentó un efecto antiinflamatorio moderado, pero sin causar reacciones adversas por su consumo sobre todo daños en la mucosa gástrica. Los resultados del tamizaje fitoquímico reportaron, metabolitos de actividad antiinflamatoria, por la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos.

Es importante el reconocimiento de los metabolitos esenciales para intentar establecer posibles correspondencias entre sustancias y acciones farmacológicas de la planta. En el caso específico de la acción antiinflamatoria, pudiera relacionarse con la presencia de los mismos. (44).



**GRÁFICO No.10 PORCENTAJES DE INFLAMACIÓN VS TIEMPO DEL EDEMA SUBPLANTAR.RIOBAMBA ENERO 2013**

Los mayores porcentajes de inflamación durante todo el ensayo, se observaron en el grupo control al cual se le administró solo agua destilada, teniendo su respuesta vascular máxima a la octava hora, se puede decir existe la liberación de las prostaglandinas con un 145,04 % de inflamación. En el grupo tratado con Diclofenaco sódico 3,85 mg/Kg, fármaco de referencia, se observó una disminución del porcentaje de inflamación en todos los tiempos evaluados, a la octava hora presenta tan solo un 16,45% de Inflamación. La respuesta observada para el Diclofenaco sódico estuvo en correspondencia con lo informado en la bibliografía, según su mecanismo de acción. Esta sustancia inhibe la vía de las ciclooxigenasas y por tanto, inhibe la formación y liberación de las prostaglandinas que en esta fase adquieren la máxima manifestación principalmente por inhibición de PGE.

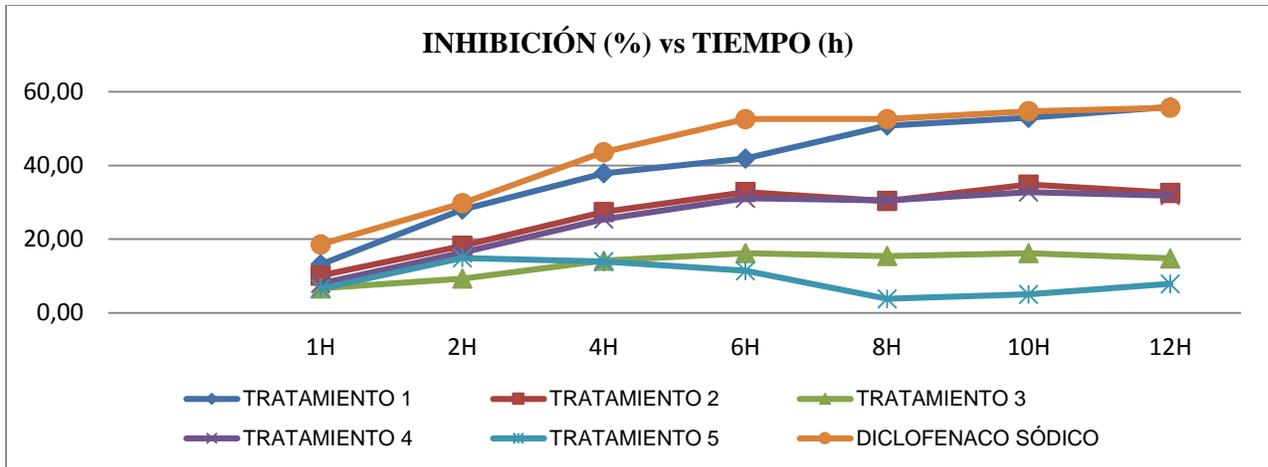
Con respecto a los tratamientos del Extracto de la Escorzonera T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg; T2 extracto hidro- alcohólico 46,03 mg/Kg; T3 sub-extracto clorofórmico 5,30 mg/Kg; T4 sub-extracto butanólico 11,77 mg /Kg; T5 sub-extracto etéreo 2,32 mg /Kg. Se observó que los valores de inflamación logrados, en todos los tiempos, fueron inferiores a los desarrollados por el grupo control, existiendo diferencia significativa ( $\alpha < 0,05$ ). El porcentaje de inflamación a la octava hora para el medicamento de referencia (16,45%), es similar al porcentaje de inflamación del T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg (19,23%), ya que es el extracto total y lleva en su

composición todos los metabolitos identificados en el tamizaje fitoquímico, como los flavonoides con sus efectos antioxidantes y a su capacidad de actuar contra las histaminas y otros mediadores de los procesos inflamatorios como son las prostaglandinas y los leucotrienos. es por esta razón podría deberse a su similar efecto antiinflamatorio. En comparación de las demás formulaciones que presentaron porcentajes de inflamación mayores de 73,16 % para la T 2 extracto hidroalcohólico 46,03 mg/Kg, de 107,90 % de inflamación para el T3 sub-extracto clorofórmico 5,30 mg/Kg, de 69,65 % para el T4 sub-extracto butanólico 11,77 mg/Kg y de 138,71 % para el T5 sub-extracto etéreo, este tratamiento tiene un comportamiento similar al grupo control que presento un porcentaje de inflamación de 145, 04%.

La habilidad de reducir el edema producido por la carragenina mostrada por el T1 es debido a que contienen en su composición sustancias que inhiben la síntesis de prostaglandinas y de esta manera disminuyen la respuesta inflamatoria. Por esta razón la T1 tiene un efecto antiinflamatorio mejor, ya que es el extracto en su totalidad y no en forma fraccionada como son el T3, T4 y T5 que son sub-extractos.

En forma descendente el efecto antiinflamatorio le sigue el tratamiento 2 que contiene el extracto al 50% y el tratamiento 4 (sub-extracto butanólico) que es su composición contiene flavonoides que presentan propiedades antiinflamatorios.

Y por último el T3 sub-extracto clorofórmico y el T5 sub-extracto etéreo que tienen similar porcentaje de inflamación, pero con un efecto antiinflamatorio poco eficaz ya que este grupo predominan porcentajes altos de inflamación semejantes a los desarrollados por el grupo control.



**GRÁFICO No. 11 PORCENTAJES DE INHIBICIÓN VS TIEMPO DEL EDEMA PLANTAR DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS. RIOBAMBA ENERO 2013**

A partir de los porcentajes de inhibición del edema obtenido con la Carragenina podríamos sugerir que los tratamientos de la Escorzonera, inhiben la liberación o acción de las prostaglandinas, resultando poseer un efecto antiinflamatorio similar al Diclofenaco sódico. Esta actividad podría estar relacionada con la presencia en estos tratamientos de flavonoides, compuestos fenólicos, identificadas en el tamizaje fitoquímico que se les atribuye actividad antiinflamatoria.

El grupo que presentó porcentajes de Inhibición similares al medicamento fue el T1 extracto hidroalcohólico 92,07 mg/Kg, luego el T4 sub-extracto butanólico 11,77 mg/Kg, el T2 extracto hidroalcohólico 46,03 mg/Kg, T3 sub-extracto clorofórmico 5,30 mg/Kg y por último el T5 sub-extracto etéreo 2,32 mg/Kg que presentó porcentajes de inhibición bajos.

### 3.9 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL PORCENTAJE DE INFLAMACIÓN

#### 3.9.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Variable respuesta: Porcentaje de actividad antiinflamatoria de los tratamientos (volumen en  $\text{cm}^3$ ).

Factor de interés: Actividad de los antiinflamatorios.

Unidades experimentales: Ratas.

Modelo:  $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$

$\mu$ : es la media global, asociada con un parámetro desconocido

$\alpha_i$ : efecto debido a la actividad de los antiinflamatorios utilizados

$e_{ij}$ : error asociado a la observación  $Y_{ij}$

**Hipótesis nula:** No existe diferencia significativa en el efecto antiinflamatorio entre los tratamientos, el control y el medicamento de referencia aplicado Diclofenaco sódico.

**Hipótesis alternativa:** Al menos dos tratamientos aplicados tienen efecto antiinflamatorio.

CUADRO No 6. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR PARA LOS PORCENTAJES DE INFLAMACIÓN CON RESPECTO AL TIEMPO. RIOBAMBA ENERO 2013

ANOVA				
FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	PRUEBA F
TRATAMIENTOS	1568,937	6	261,489	2252,924
ERROR	1,625	14	0,116	
TOTAL	1570,561	20		

VALOR CRÍTICO = 2,8477

Valor p= 4,56016E-20

**Interpretación:** Como el valor del estadístico de prueba (2252,9) es mayor que el valor crítico se procede a rechazar la Hipótesis nula, es decir que efectivamente aceptamos que hay diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de inflamación desarrollados de los 5 tratamientos, el medicamento de referencia y el grupo control.

**Decisión:** Ya que el valor p (4,560E-20) es menor que el nivel de significancia (0,05) se procede a rechazar Hipótesis nula y concluir que las dosis aplicadas no tienen el mismo efecto antiinflamatorio.

Aplicando la prueba de Tukey para ver cuál es el grupo con similar actividad antiinflamatoria con respecto al medicamento de referencia Diclofenaco sódico 3.85 mg/Kg.

**CUADRO No 07. COMPARACIÓN ENTRE PARES DE MEDIAS MÉTODO DE TUKEY PARA EL PORCENTAJE DE INFLAMACIÓN. RIOMBAMBA 2013**

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
% INFLAMACION DICLOFENACO SODICO	3	21,1000				
% INFLAMACION T1	3	21,8900				
% INFLAMACION T4	3		30,9067			
% INFLAMACIÓN T2	3		30,9933			
% INFLAMACION T3	3			37,6300		
% INFLAMACION T5	3				42,8000	
% INFLAMACION CARRAGENINA	3					44,5000

**Resultados:** Vemos que el grupo con actividad antiinflamatoria similar con el medicamento de referencia Diclofenaco sódico es el T1 extracto hidro- alcohólico 92,07 mg/Kg ya que presentó porcentajes de Inflamación menores al grupo control y similar al medicamento de referencia. Pero seguidamente los T2 extracto hidro- alcohólico 46,03 mg/Kg y T4 sub-extracto butanólico 11,77 mg/Kg presentan actividad antiinflamatoria menor ya que presentó porcentajes de Inflamación altos como los que se desarrollaron en el grupo control, lo que podemos decir también de los T3 sub-extracto clorofórmico 5,30 mg/Kg y T5 sub-extracto etéreo 2,32 mg/Kg.

La prueba de Tukey agrupa los tratamientos estadísticamente homogéneos con grado de significancia logrando establecer que el efecto antiinflamatorio del Diclofenaco sódico y el tratamiento 1 tiene la misma eficacia como antiinflamatorio.

**CUADRO No 8. ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR PARA LOS PORCENTAJES DE INHIBICIÓN RIOMBAMBA ENERO 2013.**

ANOVA				
FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	PRUEBA F
<b>TRATAMIENTOS</b>	5516,88133	5	1103,37627	2149,30155
<b>ERROR</b>	6,16038044	12	0,51336504	
<b>TOTAL</b>	5523,04171	17		

VALOR CRÍTICO =3,1058  
valor p = 2,82E-17

**CUADRO No 9. COMPARACIÓN ENTRE PARES DE MEDIAS MÉTODO DE TUKEY PARA EL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN RIOBAMBA 2013.**

TRATAMIENTOS	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
% INHIBICION T5	3	3,8200			
% INHIBICION T 3	3		15,4367		
% INHIBICION T2	3			30,3533	
% INHIBICION T4	3			30,5433	
% INHIBICION T1	3				50,8100
% INHIBICION DICLOFENACO SODICO	3				52,5867

Al aplicar la prueba de Tukey se puede observar que existen cuatro subconjuntos, dos de los cuales contienen dos tratamientos, los mismos que son los que tienen mayor porcentaje de inhibición.

El T5 sub-extracto etéreo es el que posee menor actividad inhibidora, seguido del T3 sub-extracto clorofórmico. Los T2 extracto hidro- alcohólico 46 mg/Kg y T4 sub-extracto butanólico son estadísticamente homogéneos al igual que los T6 diclofenaco sódico y T1 extracto hidro-alcohólico 92,07 mg/Kg, sin embargo estos últimos (T1 y T6) son los que inhiben en mayor porcentaje la inflamación.

A los resultados obtenidos se les aplicó un análisis de varianza de una vía y se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos y el control ( $p < 0.05$ ), posteriormente se realizó la prueba de Tukey, obteniéndose que el efecto antiinflamatorio de mayor a menor grado quedó de la siguiente manera: T1 extracto hidro-alcohólico (92,07mg/kg) > T4 sub-extracto butanólico (11,77 mg/kg) > T2 extracto hidro-alcohólico (46,03 mg/kg) > T3 sub-extracto clorofórmico (5,30 mg/Kg) > T5 sub-extracto etéreo (2,32mg/Kg ). El T1 extracto hidro-

alcohólico 92,07 mg/Kg presentó un efecto antiinflamatorio más pronunciado por lo que se podría emplear esta dosificación para realizar un fitofármaco de fácil administración.

## **CAPÍTULO IV**

#### 4. CONCLUSIONES

1. Se confirmó la hipótesis, pues el extracto hidro-alcohólico de la Escorzonera (*Perezia multiflora*), aplicados a ratas con edema plantar inducido con carragenina al 0.5%, presenta actividad antiinflamatoria según la comparación entre pares de medias por el método de Tukey. Cuadro No 09
2. La Escorzonera recolectada en Mayo del 2012 en la Comunidad de Sanjapamba-Tambuloma fue identificada en el herbario de la ESPOCH y corresponde a la *Perezia multiflora*.
3. El porcentaje de rendimiento del extracto hidro-alcohólico de la Escorzonera (*Perezia multiflora*) preparado por maceración es de 77,8% y mientras que para los sub-extractos etéreo, butanólico y clorofórmico es de 2, 14 y 7 % respectivamente, el aspecto del extracto es líquido, color verde oscuro, olor y sabor amargo, la densidad relativa 1.029 g/ml, índice de refracción 1.345 y pH 5.10. Cuadro No. 03
4. En el tamizaje fitoquímico los resultados obtenidos de la escorzonera (*Perezia multiflora*) nos demostró que tiene la presencia marcada de flavonoides, fenólicos, agrupamiento lactónico (cumarinas), alcaloides, quinonas, y triterpenos, pueden ser responsables. Cuadro No.02
5. Mediante la ley de Lambert y Beer se determinó una concentración de 11 % de quercetina en el extracto hidro-alcohólico de la escorzonera (*Perezia multiflora*), por lo tanto en el sub-extractos butanólico se lo encuentra en una cantidad de  $1,29 \times 10^{-3}$  mg de quercetina. Cuadro No 04 y Gráfico No. 01

6. Según la hipótesis planteada para el análisis estadístico y con un nivel de significancia de (0.05), podemos decir que las dosis aplicadas tienen diferente efecto antiinflamatorio y mediante la prueba de Tukey, se observa la formación de 5 grupos homogéneos. Cuadro No. 6 y 7
  
7. La concentración de 92,07 (mg/kg) del extracto de la Escorzonera (*Perezia multiflora*) presentó actividad antiinflamatoria frente al edema plantar en ratas inducida con carragenina, caracterizándose por disminuir la inflamación hasta valores similares a los del Diclofenaco sódico, mostrando un mayor efecto con respecto a las demás dosis. Gráfico No. 10

## CAPÍTULO V

## 5. RECOMENDACIONES

1. Incentivar al cultivo de este vegetal, ya que solo se le encuentra en forma silvestre, incrementando así el ingreso económico de los habitantes de este sector.
2. Debe realizarse más investigaciones con la Escorzonera ya que también se le atribuye propiedades diuréticas, febrífugas y sudoríficas. Sería un gran aporte a la ciencia ya que está en auge el uso de fitofármacos en el tratamiento de diversas patologías.

## CAPÍTULO VI

## 6. RESUMEN

La presente investigación pretende evaluar la actividad antiinflamatoria de la Escorzonera (*Perezia multiflora*) en ratas (*rattus novergicus*), realizado en los laboratorios de fitoquímica de la facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

La actividad antiinflamatoria del extracto y sub-extracto se evalúa mediante el método de Winter y col., mediante la inducción del edema a 15 ratas (*rattus novergicus*) a los cuales se les inyecta carragenina (0.5%) 0.1 ml en la región subplantar provocando inflamación, para la posterior aplicación de los 5 tratamientos siendo: T1, extracto 92.07 mg/Kg; T2, extracto 46.03 mg/Kg; T3, sub-extracto clorofórmico de 5.30mg/Kg ;T4, sub-extracto butanolico 11.77 mg/Kg y T5, sub-extracto etéreo 2.32 mg/Kg,T6 ( control positivo), tratados con diclofenaco sódico, T7 (control negativo), recibió solo el vehículo agua destilada, administración vía oral con el empleo de jeringas con aguja adaptada para ser usada como sonda orogástrica. Medir el volumen (longitud y diámetro) de la pata a las 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10,12 horas.

Con los datos obtenidos se realizaron gráficas, utilizando el programa Microsoft office Excel 2007, en la cual se observan que la máxima inflamación se obtuvo a la octava hora de administración, con un porcentaje de inflamación para T1 (extracto 92.07 mg/kg) 19.23; T2 (extracto 46.03 mg/kg) 73.16; T3 (sub-extracto clorofórmico 5.30 mg/kg) 107.9 ; T4 (sub-extracto butanolico 11.77 mg/Kg) 69.65; T5 (sub-extracto etéreo 2.32 mg/kg) 138.71; T6 (diclofenaco sódico) 16.45; T7(control negativo) 145.04. La concentración de 92.07 mg/Kg presento un % de inhibición de 50.8 y mientras que el Diclofenaco sódico presenta un % de inhibición de 52.5 y para T4, T2, T3, T5 fue de 30.5; 30.3; 15.4 y 3.8 respectivamente. Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico, para los cual se aplica el análisis de varianza, con un nivel de significancia de 0.05.

En la evaluación se concluyó que el tratamiento T1 (extracto 92.07 mg/kg) es efectivo, ya que lleva la totalidad de metabolitos secundarios y en mayor concentración con propiedades antiinflamatorias como los compuestos fenólico, flavonoides y esteroides.

Se recomienda elaborar un fitofármaco con la dosificación de la T1(extracto 92.07 mg/kg) para facilitar su almacenamiento y administración.

## **SUMARY**

This research aims to evaluate the anti-inflammatory activity of the salsify (*Perezia multiflora*) in rats (*rattus novergicus*), made in Phytochemical laboratories of the Science Faculty in Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.

The extract and sub-extract of the anti-inflammatory activity is evaluated using the Wintter and col method, by induction of edema in 15 rats (*rattus novergicus*) which were injected carrageenan (0,50 %) 0,1 ml in the sub plantar region causing inflammation, for the subsequent application of the 5 treatments being: T1, 92,07 mg/Kg extract, T2 46,03 mg/Kg; 5,30 mg/kg chloroform sub-extract; T4, 11,77 mg/Kg butane sub-extract and T5, 2,32 mg/Kg ethereal sub-extract, T6 (positive control), treated by sodium diclofenac, T7 (negative control), just received the vehicle of distilled water, oral administration with the use of syringes with an adaptable needles to be used as an oro-gastric catheter. Measure the volume (length and diameter) of the feed at 0, 1, 2, 4,6,8,10,12 hours.

Graphics were made with the obtained data, using Microsoft office Excel 2007 Program, which shows that the highest swelling was obtained at the eighth time of application, with a swelling percentage for T1 (92,07 mg/Kg extract) 19,93; T2 (46,03mg/Kg) extract) 76,16; T3 (5,30 mg/Kg chloroform sub-extract) 107,9; T4 (11,77 mg/Kg butane sub-extract) 69,65; T5 (2,32 mg/Kg ethereal sub-extract) 138,71; T6 ( sodium diclofenac) 16,45; T7 (negative control) 145,04. The concentration of 92,07 mg/Kg showed an % of inhibition of 50,8 while the sodium diclofenac show a % of inhibition of 52,5 and for T4, T2,T3,T5 were of 30,5 ;30,3;15,4;and 3,8 respectively. The results were subjected to statistical analysis, which is applied to the variance analysis, with a significance level of 0.05.

In the evaluation was concluded that the treatment T1 (92, 07 mg/Kg extract) is effective, is effective because it takes all of metabolic side with higher concentration and anti-inflammatory properties as phenolic compounds, flavonoids and steroid.

It is recommended to develop a Phytomedicine with dosage of T1 (92, 07 mg/Kg extract) in order to facilitate its storage and administration.

## CAPÍTULO VII

### 7. BIBLIOGRAFÍA

1. **ACOSTA, S.**, Planta medicinales del Ecuador., Quito- Ecuador., Aya- yala., 1992., Pp. 117.
2. **AGAPITO, T.**, Fitomedicina., Lima-Perú., Isabel I.R.L., Pp. 1-6.
3. **ARA, A.**, 100 Plantas Medicinales Escogidas., Madrid – España., Edaf. S.A., 1997., Pp. 14, 28-29.
4. **BERTRAM, G.**, Farmacología básica y clínica., 9a. ed., D. F. México - México., Editorial manual moderno., 2005., Pp.575-580
5. **CONTRAN, R.**, Patología Estructural y Funcional., 6ª.ed., Madrid-España., Mc Graw Hill Interamericana., 2000., Pp. 53-55
6. **CASCALES, M.**, Bioquímica y Fisiología del Sistema inmune., Instituto de España., Madrid – España., Realigraf S.A., 2007., Pp. 31-61
7. **CÁCERES, A.**, Plantas de Uso Medicinal., Ciudad de Guatemala- Guatemala., 2001., Pp. 5, 43,110
8. **CASTILLO, E.**, Manual de Fitoterapia., Barcelona – España., Elsevier Masson., 2007., Pp. 57-63, 69, 79-87

9. **DAWSON, L., Y OTROS.,** Lo esencial en farmacología., 2e. ed., Editorial Elsevier., 2001., Pp.58
10. **DOMINGUEZ, X.,** Métodos de fitoquímica., D.F. México –México., Limusa., 1979., Pp. 81-211
11. **FONNEGRA, R.,** Plantas medicinales aprobadas en Colombia., 2a.ed., Bogotá-Colombia., Ed. Universidad de Antioquía., 2007., Pp. 150- 152.
12. **GOODMAN, GILMAN.,** Las bases farmacológicas de la terapéutica., 10a ed., D.F. México- México., Editorial McGraw-Hill Interamericana., Volumen II., 2000., Pp. 599-643.
13. **GENNARO, A.,** Remington Farmacia., 20a.ed., Tomo 1., Buenos Aires – Argentina., Ed. Médica Panamericana S.A., 2003., Pp. 872, 873, 1198.
14. **HARRISON.,** Principios de Medicina Interna., 15a. ed., Mc Graw Hill, Interamericana de España, S.A., Volumen I., 2002., Pp. 345-362.
15. **HARDMAN, J.,** Bases farmacológicas de la terapéutica., 9a.ed. D.F. México- México., Editorial McGraw-Hill Interamericana., Volumen I., 1996., Pp. 352.
16. **ITZIK, A.,** Plantas curativas., Cali- Colombia., Arquetipo grupo Editorial., 2007., Pp.251.
17. **JANEWAY, CH.,** Inmunología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad., Madrid - España., Masson., 2003., Pp. 1233-1256
18. **LOCK, O.,** Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales., 2ª.ed., Lima – Perú., Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú., 1994., Pp. 22-28, 72-80, 114-117.

19. **MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO.**, Real Farmacopea Española., 2a. ed., Madrid – España., Imprenta Nacional del Boletín Oficial del Estado., 2002., Pp. 454-455, 548, 549, 553, 1735, 2263-2265; 2443-2445.
20. **MUÑOZ, F.**, Plantas Medicinales y Aromáticas: Estudio Cultivo y Proceso., Madrid-España., Grupo Mundi-Prensa., 1996., Pp. 15-18, 281-288, 311-318.
21. **MURIEL, C.**, Dolor crónico diagnóstico, clínica y tratamiento., Madrid – España., Arán Ediciones S.L., 2007., Pp. 158-163, 171.
22. **PAMPLONA, J.**, Enciclopedia de las Plantas Medicinales., 2a ed., Buenos Aires-Argentina., Editorial Safeliz., 2006., Pp. 365- 368.
23. **SAMANIEGO, R.**, Fundamentos de la Farmacología Médica., Quito – Ecuador., Universitaria., 2005., Pp., 427-443.
24. **VANACLOCHA, B.**, Fitoterapia vademécum de prescripción., 4a.ed., Barcelona – España., Masson S.A., 2003., Pp.310- 311, 431-432, 476-477.
25. **WAGNER, H.**, Plant drug analysis. A Thin layer chromatography atlas., 2a. ed., Berlín –Alemania., Ed. Springer- Verlag., 1996., Pp. 176, 178, 209, 296, 300.
26. **WHITE, A.**, Hierbas del Ecuador. Plantas Medicinales., Quito, Ecuador., Imprenta Mariscal., 1976., Pp.146.
27. **CENTRO DE FARMACOVIGILANCIA DE NAVARRA.** Interacciones fármacos hierbas medicinales., Boletín Informativo Farmacovigilancia N° 24., 2004., Pp.6-19
28. **CYTED.** Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el Desarrollo Manual de Técnicas de Investigación., 1995., Pp. 12-26, 81-86, 216-225. .

29. **SECRETARIA DE SALUD. COMISIÓN PERMANENTE DE LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.** Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos., D.F. México – México., 2001., Pp. 57-58.
30. **FUNDACIÓN HOGARES CAMPESINOS.** El milagro de las plantas aplicaciones medicinales y orofaríngeas., Bogotá– Colombia., Taller San Pablo., 2005., Pp. 111-112.
31. **GUADARRAMA, B.,** Determinación de la Actividad Antiinflamatoria de dos muestras de *Sphaeralcea angustifolia* y la interacción del extracto activo con fármacos de uso clínico., Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la salud., D.F. México – México., TESIS., 2006., Pp. 11-33, 39-42.
32. **RUÍZ, D.,** Validación farmacológica de la actividad antiinflamatoria de las infusiones acuosas de las hojas de *Acalypha guatemalensis* (hierba del cáncer), *Solanum mammosum* (chichitas) y *Rauvolfia tetraphylla* L. (chalchupa), Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Guatemala., TESIS., 2008., Pp. 5, 7-19.
33. **SIÑANI, G.** Determinación de la Actividad Antiinflamatoria e Interacción de Extractos de la Planta *Kiswara* (*Buddleja coriácea* Rémuy) con Dexametasona, mediante los ensayos de Edema plantar y Auricular en modelo murino., Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Carrera de Bioquímica., Bolivia., TESIS., 2009., Pp.18-20.
34. **VICET, L.,** Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*, L., Instituto Superior de Ciencias Médicas “Victoria de Girón”, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas., La Habana- Cuba., TESIS., 2009., Pp. 13-19

35. **ANTIINFLAMATORIOS**

<http://www.Javier-antiinflamtorios.blogspot.com/2008/12/definicin-de-antiinflamatorios.htm>

2012-05-10.

36. **ARTICULO EFECTO ANTIMICROBIANO**

<http://www.unapiquitos.edu.pe/oficinas/iunap/archivos/2009/biologia/ARTICULO-TERESAMORI.pdf>

2012-07-23

37. **ANTIINFLAMATORIOS**

<http://mvz.unipaz.edu.co/textos/lecturas/preclinica/antiinflamatorios-esteroideos.pdf>

2012-08-05

38. **ASOCIACIÓN COSTARRICENSE DE SALUD PÚBLICA**

[http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-14292007000200005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-14292007000200005&script=sci_arttext)

2012-09-15

39. **AINES**

<http://www.asamed.org.ar/PDF/AINEs%20presentaci%C3%B3n.pdf>

2012-10-05

40. **BIOLOGÍA MOLECULAR**

<http://www.medbook.es/profiles/blogs/inflamaci-n-vista-desde-la-medicina-biol-gica-molecular>

2012-05-12

41. **BORDÉS., R.** et al. El Proceso Inflamatorio

<http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>

2012-06-13

**42. CAPÍTULO 5**

<http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap54.htm>

2012-06-13

**43. CAPÍTULO 7 ANALGÉSICOS**

[http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas\\_farma/volumen4/cap7\\_aines.pdf](http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen4/cap7_aines.pdf)

2012-06-20

**44. CAPÍTULO PRUEBA DE EDEMA PLANTAR EN RATA INDUCIDO POR CARRAGENINA.**

[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/mbc/baez\\_cg/capitulo11.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbc/baez_cg/capitulo11.pdf)

2012-06-20

**45. CAPITULO 11**

[Catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/...c./capitulo11.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/...c./capitulo11.pdf)

2012-06-21

**46. CIMED ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDALES**

<http://sibdi.ucr.ac.cr/CIMED/cimed18.pdf>

2012-07-13

**47. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.**

[Depa.pquim.unam.mx/-fercor/dqo/manuales/1311/p7.pdf](http://Depa.pquim.unam.mx/-fercor/dqo/manuales/1311/p7.pdf)

2012-07-13

**48. EFECTO INMUNOMODULADOR**

[http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/cindoc/informes\\_tecnicos/36.pdf](http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/cindoc/informes_tecnicos/36.pdf)

2012-07-20

49. **EXTRACTOS VEGETALES.**

<http://www.sanopordentro.com/extractos-vegetales.html>

2012-06-06

50. **EFFECTOS SECUNDARIOS DE LOS AINES**

<http://www.noticiasmedicas.es/medicina/noticias/1959/1/El-uso-de-antiinflamatorios-naturales-evitaria-cientos-de-ingresos-en-urgencias-/Page1.htm>

2012-05-24

51. **ESTUDIO DE PLANTAS MEDICINALES EN LA AMAZONÍA PERUANA:**

<http://www.promamazonia.org.pe/SBiocomercio/Upload%5CLineas%5CDocumentos/239.pdf>

2012-08-08

52. **ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD COMERCIAL DE PLANTAS MEDICINALES EN ZONAS RURALES ALTAS DEL VALLE DE MANTARO (PERU).**

2013-02-06

53. **ESPECTROMETRÍA ULTRAVIOLETA.**

[http://www.espectrometria.com/espectrometria\\_ultravioleta-visible](http://www.espectrometria.com/espectrometria_ultravioleta-visible)

2013-01-25

54. **FLAVONOIDES**

[http://da.montes.upm.es/Trabajos%20y%20apuntes/QUIMICA%20DE%20LOS%20PRODUCTOS%20FORESTALES%20NO%20LE%20D1OSOS/Tema\\_13\\_Flavonoides.pdf](http://da.montes.upm.es/Trabajos%20y%20apuntes/QUIMICA%20DE%20LOS%20PRODUCTOS%20FORESTALES%20NO%20LE%20D1OSOS/Tema_13_Flavonoides.pdf)

2012-11-05

**55. FARMACOLOGÍA DE LOS ANALGÉSICOS**

[http://www.revistaiberoamericanadedolor.org/pdfs/vol\\_6\\_No\\_1\\_2011/farmacologia.pdf](http://www.revistaiberoamericanadedolor.org/pdfs/vol_6_No_1_2011/farmacologia.pdf)

2012-11-12

**56. FLORA SILVESTRE DE LOS ANDES CENTRALES DEL PERÚ**

<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.ht>

2012-11-04

**57. FÁRMACOS ANALGÉSICOS ANTITÉRMICOS Y ANTIINFLAMATORIOS  
NO ESTEROIDEOS**

<http://pocholinn.blogdiario.com/img/aines.pdf>

2012-11-21

**58. FLAVONOIDES**

<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001.pdf>

20121119

**59. INFLAMACIÓN AGUDA**

<http://es.scribd.com/doc/15769308/Seminario-Inflamación-Aguda>

2012-11-25

**60. INFLAMACIÓN.**

[www.idap.com.mx/apuntes/Patologia/INFLAMACION.doc](http://www.idap.com.mx/apuntes/Patologia/INFLAMACION.doc)

2012-11-10

**61. INMUNIDAD CELULAR Y MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN**

<http://www2.udec.cl/~gdelafue/web/mq.htm>

2012-12-06

**62. INVESTIGACIÓN ETNOBOTÁNICA.**

<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1373833>

2012-12-20

**63. INFO FARMA ,BOLETÍN INFORMATIVO**

<http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/farmacia-verde/plantas-medicinales.html>

2012-12-08

**64. LAS BASES MOLECULARES DE LA INFLAMACIÓN**

<http://www.uv.es/jcastell/Inflamacion.pdf>

2013-01-14

**65. LIBRO VERDE: GUÍA DE RECURSOS TERAPÉUTICOS VEGETALES**

[http://proyecto.ecofondo.org.co/index2.php?option=com\\_docman&task=doc\\_libroverde=36](http://proyecto.ecofondo.org.co/index2.php?option=com_docman&task=doc_libroverde=36)

2013-02-12

**66. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.**

<http://www.monografias.com/trabajos66/extractosplantas-medicinales/extractos-plantas-medicinales2.shtml>

2013-02-08

**67. PERFIL DE PLANTAS**

<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=pemu16>

2013-02-26

**68. PLANTA MEDICINALES**

<http://www.saludancestralcruzroja.org.ec/web/index.php/farmacia-verde/plantas-medicina.html>

2012-06-15

**69. PLANTAS**

<http://www.chlorischile.cl/Linares/apend4.htm>

2012-06-15

**70. PLANTAS MEDICINALES**

[http://www.siforestal.org.pe/Archivo/Est\\_Plant\\_Med.pdf](http://www.siforestal.org.pe/Archivo/Est_Plant_Med.pdf)

2012-06-18

**71. PLANTAS MEDICINALES EN LOS ANDES DE BOLIVIA**

<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2017.pdf>

2012-06-22

**72. PLANTAS MEDICINALES DE LA CORDILLERA NEGRA**

<http://www.ippn.org.pe/files/pdf/07%20Plantas%20Medicinales%20de%20la%20Cordillera%20Negra.pdf>

2012-07-02

**73. PLANTAS MEDICINALES DE LOS ANDES ECUATORIANOS.**

<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>

2012-05-10

**74. PROYECTO DE REAL DECRETO POR EL QUE SE REGULAN LOS  
MEDICAMENTOS DE PLANTAS.**

[http://www.plantasmedicinales.org/archivos/legislacion\\_espanola\\_sobre\\_plantas\\_medicinales.pdf](http://www.plantasmedicinales.org/archivos/legislacion_espanola_sobre_plantas_medicinales.pdf)

2012-05-05

**75. RATTUS NOVERGICUS**

<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Rattusnorvegicus00.pdf>

2012-05-09

76. **REVISTA CHILENA DE FLORA Y VEGETACIÓN**

[http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5\\_1\\_00/pla07100.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5_1_00/pla07100.pdf)

2012-12-09

77. **TEMA 25**

[http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas\\_nuevos\\_pdf/tema25.pdf](http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas_nuevos_pdf/tema25.pdf)

2012-12-09

78. **USOS CLÍNICOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES**

[http://portal.concytec.gob.pe/portalsinacyt/images/stories/corcytecs/ancash/ancash\\_plantasMedicinales.pdf](http://portal.concytec.gob.pe/portalsinacyt/images/stories/corcytecs/ancash/ancash_plantasMedicinales.pdf)

2012-12-05

79. **USOS MEDICINALES DE LAS PLANTAS**

<http://www.biologia.puce.edu.ec/imagesFTP/10455.Medicinal.pdf>

2012-12-15

## CAPÍTULO VIII

### 8. ANEXOS

#### 8.1 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS TRATAMIENTOS EN ESTUDIO

CUADRO No. 14 ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS Y DICLOFENACOSÓDICO SOBRE EL EDEMA PLANTAR INDUCIDO CON CARRAGENINA EN RATAS. A LAS DIFERENTES HORAS. BIOTERIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA. RIOBAMBA SEPTIEMBRE 2012.

TIEMPO DE ADMINSTRACION 0 HORAS				
TRATAMIENTOS	R1 (cm <sup>3</sup> )	R2 (cm <sup>3</sup> )	R3(cm <sup>3</sup> )	X volumen (cm <sup>3</sup> )
T1	18,36	18,35	18,37	18,36
T2	17,85	17,96	17,73	17,85
T3	17,95	18,12	18,22	18,10
T4	18,22	18,12	18,32	18,22
T5	17,93	17,88	17,97	17,93
T6	18,03	18,2	18,12	18,12
T7	18,25	18,08	18,16	18,16

TIEMPO DE ADMINSTRACION 1 HORAS				
TRATAMIENTOS	R1 (cm <sup>3</sup> )	R2 (cm <sup>3</sup> )	R3(cm <sup>3</sup> )	X volumen (cm <sup>3</sup> )
T1	19,5	19,67	19,84	19,67
T2	20,37	20,57	20,17	20,37
T3	21	21,3	21,15	21,15
T4	20,85	20,95	20,74	20,85
T5	21,2	21,17	21,14	21,17
T6	18,45	18,38	18,52	18,45

T7                      22,66                      22,6                      22,72                      22,66

TIEMPO DE ADMINSTRACION 2 HORAS				
TRATAMIENTOS	R1 (cm <sup>3</sup> )	R2 (cm <sup>3</sup> )	R3(cm <sup>3</sup> )	X volumen (cm <sup>3</sup> )
T1	20,15	20,07	20	20,07
T2	22,5	22,82	23,14	22,82
T3	25,25	25,35	25,3	25,30
T4	23,33	23,3	23,36	23,33
T5	23,53	23,73	23,93	23,73
T6	19,51	19,66	19,59	19,59
T7	27,8	27,98	27,89	27,89

TIEMPO DE ADMINSTRACION 4 HORAS				
TRATAMIENTOS	R1 (cm <sup>3</sup> )	R2 (cm <sup>3</sup> )	R3(cm <sup>3</sup> )	X volumen (cm <sup>3</sup> )
T1	21,59	21,51	21,67	21,59
T2	25,26	25,2	25,23	25,23
T3	29,82	29,72	29,92	29,82
T4	26	25,91	25,81	25,91
T5	29,9	30,1	29,7	29,90
T6	19,59	19,4	19,78	19,59
T7	34,6	34,88	34,74	34,74

TIEMPO DE ADMINSTRACION 6 HORAS				
TRATAMIENTOS	R1 (cm <sup>3</sup> )	R2 (cm <sup>3</sup> )	R3(cm <sup>3</sup> )	X volumen (cm <sup>3</sup> )
T1	24,14	24	24,28	24,14
T2	27,85	27,93	28,01	27,93
T3	34,8	34,7	34,9	34,80
T4	28,5	28,63	28,76	28,63
T5	36,8	36,75	36,85	36,80
T6	19,6	19,69	19,78	19,69
T7	41,5	41,58	41,54	41,54

TIEMPO DE ADMINSTRACION 8 HORAS				
TRATAMIENTOS	R1 (cm <sup>3</sup> )	R2 (cm <sup>3</sup> )	R3(cm <sup>3</sup> )	X volumen (cm <sup>3</sup> )
T1	21,9	21,75	22,02	21,89
T2	30,23	31,05	31,7	30,99
T3	37,53	37,63	37,73	37,63
T4	30,81	31	30,91	30,91
T5	42,8	42,6	43	42,80
T6	21	20,8	21,5	21,10
T7	44,5	44,25	44,75	44,50

TIEMPO DE ADMINSTRACION 10 HORAS				
TRATAMIENTOS	R1 (cm <sup>3</sup> )	R2 (cm <sup>3</sup> )	R3(cm <sup>3</sup> )	X volumen (cm <sup>3</sup> )
T1	20,36	20,16	20,56	20,36
T2	28,1	28,2	28,3	28,20
T3	36,25	36,05	36,45	36,25
T4	29	29,15	29,05	29,07
T5	41,07	41,1	41,04	41,07
T6	19,34	19,82	19,59	19,58
T7	43,25	43,15	43,35	43,25

TIEMPO DE ADMINSTRACION 12 HORAS				
TRATAMIENTOS	R1 (cm <sup>3</sup> )	R2 (cm <sup>3</sup> )	R3(cm <sup>3</sup> )	X volumen (cm <sup>3</sup> )
T1	18,36	18,2	18,52	18,36
T2	28	28,05	28,1	28,05
T3	35,18	35,7	35,46	35,45
T4	28,46	28,36	28,26	28,36
T5	38,32	38,22	38,42	38,32
T6	18,24	18,34	18,44	18,34
T7	41,6	41,3	41,9	41,60