

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y ANALGÉSICO DEL EXTRACTO DE *Culcitium canescens* (HUMB. & BONPL.) “VIRA VIRA” EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN”

Tesis presentada por los bachilleres:

Carbajal Inca, Catherine Lizet

Ramírez Añasco, Ingrid Julissa

Para optar el título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesor:

Mgter. Paredes Fuentes Julitza

Arequipa – Perú

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20180000022111

N° Trámite en Fac. 1748-2018

Fecha 09-05-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: CARBAJAL INCA, Catherine Lizet
RAMIREZ AÑASCO, Ingrid Julissa

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO TOPICO DE LA ASOCIACION DEL
EXTRACTO DE *Senecio graveolans* "CHACHACOMA" Y *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.)
Cuatrec. "WIRA WIRA" EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION. AREQUIPA-2018"

DICTAMINADORES: 1) Dr. José Villanueva Salas 2) Q. F. Fernando Torres Vela

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por las recurrentes, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, sugerimos se cambie el título a: "EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y ANALGESICO DEL EXTRACTO DE *Culcitum canescens* (Huss. & Bonpl.) "Vira-vira" EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION", después de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Firmas:   (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 12/06/18

ASESOR: Mgter. Julitza Paredes Fuentes

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: "EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y ANALGESICO DEL EXTRACTO DE *Culcitum canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira" EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION" y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Firma  Fecha 09/11/18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas
- 2) Dra. Gaby Velasco Lozano
- 3) Q. F. Fernando Torres Vela

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrentes, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Firma    (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 26-11-2018

JURADOS: Presidente DR. JOSE VILLANUEVA SALAS
Vocal Dra. GABY VELASCO LOZANO
Secretario Q. F. FERNANDO TORRES VELA

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 6/12/18 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)

DECANO



DEDICADO A:

A Dios que siempre guía mis pasos y me da las fuerzas necesarias para salir adelante.

A mis queridos padres, Lucia y Wilfredo por los valores que me han inculcado, por su constante amor y apoyo durante toda mi vida y desarrollo profesional.

A mis hermanos David y Daniel por ser parte importante de mi vida, por su fraternidad, por los momentos compartidos.

A Eduardo por brindarme todo su amor y comprensión, y siempre motivarme a seguir adelante.

Ingrid.J.Ramírez.Añasco

DEDICADO A:

A Dios quién siempre guía mi camino, me da fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentan, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres Gumercindo y Serapia quienes me enseñaron lo que es la perseverancia y constancia en lograr lo que te propones pese a los obstáculos que puedan presentarse, gracias por sus consejos, enseñanza, apoyo y amor durante toda mi vida y desarrollo profesional.

A mis hermanos Leonel y Marco quienes me motivaron y creyeron en mí, brindándome su apoyo incondicional, dándome palabras de aliento y buenos deseos para seguir adelante con mis sueños, gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada una de mis metas.

A mi tío Luis quien me apoyo constantemente a pesar de las adversidades, este logro también es tuyo y eres como un padre para mí.

A Cristina y Alexandra quienes siempre me ayudaron y motivaron a seguir adelante. Gracias a todos los angelitos que Dios puso en mi camino.

Catherine L Carbajal Inca

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Católica De Santa María en particular a la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica a donde quiera que estemos llevaremos en alto el honor de haber sido estudiantes de tan ilustre institución.

Nuestro profundo y sincero agradecimiento a nuestros docentes y jurados de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, PhD José Villanueva Salas, QF. Fernando Torres Vela, Dra. Gaby Velazco Lozano y a nuestra asesora Mgter. Julitza Paredes Fuentes y a quienes nos brindaron su apoyo desinteresado e incondicional durante la realización de nuestro trabajo de investigación, para ustedes nuestra eterna gratitud.

Expresar también nuestro agradecimiento al personal de laboratorio por su apoyo y colaboración durante la realización de nuestro trabajo de investigación.

Catherine L. Carbajal Inca
Ingrid J. Ramírez Añasco

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix
INTRODUCCIÓN.....	xxi
OBJETIVOS.....	xxiii
HIPÓTESIS	xxiv

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”	1
1.1. Descripción Botánica.....	1
1.2. Clasificación Taxonómica	1
1.3. Distribución	2
1.4. Nombres Comunes.....	2
1.5. Hábitat.....	2
2. USOS DE LA PLANTA	3
3. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN PLANTAS MEDICINALES	3
3.1. Métodos de extracción	3
3.1.1. Extracción Mecánica.....	3
3.1.2. Destilación:	3
3.1.3. Extracción con gases	4
3.1.4. Extracción con disolventes.....	4
4. SELECCIÓN DEL SOLVENTE.....	5
5. EXTRACTOS ETANÓLICOS	6
5.1. Definición	6
6. INFLAMACIÓN	6

6.1. Causas Generales	7
6.2. Alteraciones principales de la inflamación	7
6.3. Clases de inflamación	8
6.3.1. Inflamación Aguda.....	8
6.3.2. Inflamación Crónica.....	11
6.4. Mediadores químicos de la inflamación	12
6.4.1. Aminas Vasoactivas	13
6.4.2. Proteasas Plasmáticas.....	14
6.4.3. Neuropeptidos	15
6.4.4. Ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas.....	15
6.4.5. Factores activadores de plaquetas	15
6.4.6. Citocinas.....	16
6.4.7. Interleucina I (IL – 1) y factor de necrosis tumoral (TNF).....	16
6.4.8. Quimiocinas	16
6.4.9. Óxido Nítrico	16
6.5. Fármacos Antiinflamatorios	17
6.5.1. Fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE)	17
7. EL DOLOR	18
7.1. Tipos de dolor	19
7.1.1. Según su duración	19
7.1.2. Según su origen	20
7.1.3. Según su localización.....	20
7.2. Fisiología del dolor	21
7.3. Tratamiento Farmacológico.....	22
7.4. Paracetamol y antiinflamatorios no esteroideos.	22
7.5. Opioides	23

7.5.1. Opioides Menores	25
7.5.2. Opioides Mayores	26
8. Formas farmacéuticas semisólidas de aplicación tópica	26
9. Geles	28
9.1. Lipófilos (oleogeles):	28
9.2. Hidrófilos (hidrogeles):	28
10. SUSPENSIONES	28
10.1. Concepto y aplicación	28
11. HUMECTACIÓN	30
12. TAMAÑO DE PARTICULA Y CRECIMIENTO DE CRISTALES	31
13. FORMULACIÓN Y ESTABILIDAD DE SUSPENSIONES . REOLOGÍA	31
14. CONSIDERACIONES ÉTICAS EN EL ESTUDIO DEL DOLOR EN ANIMALES	31
15. MODELO DE LA FORMALINA	33
16. MODELOS DE DOLOR AGUDO Y CRÓNICO	33

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DURACIÓN DEL ESTUDIO	35
2. LUGAR DE INVESTIGACIÓN	35
3. MATERIALES	35
3.1. Unidades de estudio	35
3.1.1. Unidad Botánica	35
3.1.2. Unidad Biológica	36
3.2. Material de laboratorio, equipos y reactivos	36
3.2.1. Material de vidrio	36
3.2.2. Aparatos y equipos de laboratorio	37

3.2.3. Material Anexo.....	37
3.2.4. Reactivos	38
4. MÉTODOS.....	39
4.1. Tratamiento de la unidad vegetal.....	39
5. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.....	41
5.1. Extracción con el equipo de percolación	41
5.2. Determinación del rendimiento de extracción	43
5.2.1. Método	43
6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	44
6.1. Cromatografía en capa fina (CCF O TLC)	44
6.2. Procedimiento	46
6.2.1. Preparación de la fase móvil	46
6.2.2. Preparación de la placa cromatográfica	46
7. MÉTODOS BIOLÓGICOS.....	47
7.1. Etapas de ambientación y alimentación de los animales.	47
7.2. Diseño Experimental.....	47
8. PREPARACIÓN DEL GEL.....	48
9. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONDUCTORA.....	49
10.INDUCCIÓN DEL EDEMA PLANTAR POR CARRAGENINA	50
11. MEDICIÓN DEL EDEMA PLANTAR.....	51
12. PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES.....	52
12.1 Cálculo de la dosis de los tratamientos	52
12.2. Formulación de las suspensiones de los extractos blandos de <i>Culcitium</i> <i>canescens</i> “Vira Vira”	52
.....	55
13. MODELO DE LA FORMALINA.....	55

13.1. Unidad biológica.....	55
13.2. Preparación de la solución de formalina al 2 %.....	55
13.3. Administración de la formalina	56
13.4. Administración oral de las suspensiones del extracto etanólico <i>Culcitium canescens</i> “Vira Vira”	56
14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
14.1. Análisis de varianza (ANOVA).....	57
14.2. Prueba de comparación múltiple de tukey (HSD).	57

CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	58
2. INFORMACIÓN GEOGRÁFICA	58
3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	59
4. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS BLANDOS.....	61
5. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.	62
5.1. Corrida General.....	63
5.2.Determinación de flavonoides	64
5.3. Determinación de terpenos	65
5.4. Determinación de alcaloides.....	66
5.5. Detección de saponinas.....	67
6. PRUEBA PILOTO	67
7. ETAPA EXPERIMENTAL EVALUACIÓN DEL EFECTO	70
ANTIINFLAMATORIO	70
7.1. Determinación del porcentaje antiinflamatorio	70
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO INFERENCIAL DE ANOVA Y TUKEY.....	73

8.1. Análisis estadístico una hora después de administrar el agente flogógeno (carragenina 1%).....	73
73	
8.2. Análisis estadístico dos horas después de administrar el agente flogógeno (carragenina 1%).....	74
8.3. Análisis estadístico tres horas después de administrar el agente flogógeno (carragenina 1%).....	75
8.4. Análisis estadístico cuatro horas después de administrar el agente flogógeno (carragenina 1%).....	76
9. ETAPA EXPERIMENTAL - EVALUACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO.....	78
10. DETERMINACIÓN DEL DOLOR.....	79
CONCLUSIONES.....	83
RECOMENDACIONES	84
ANEXOS.....	90
ANEXO N° 01: Identificación y tipificación del espécimen vegetal.....	90
ANEXO N° 02: Recolección y tratamiento de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> “Vira Vira”	91
ANEXO N° 03: Preparación de extractos de <i>Culcitium canescens</i> “Vira Vira”	92
ANEXO N° 04: Proceso de aplicación de carragenina 1% y tratamientos para el efecto antiinflamatorio	93
ANEXO N° 05: Resultados en mililitros dados por el equipo pletismómetro digital durante la etapa experimental.....	94
ANEXO N° 06: Fórmula para hallar el porcentaje de inflamación.....	95
ANEXO N° 07: Proceso de aplicación de formalina 2% y tratamientos para el efecto analgésico	96
ANEXO N° 08: Cálculo de dosis del extracto etanólico de <i>Culcitium canescens</i> “Vira Vira” y tramadol	97

ANEXO N° 09: Fórmula para preparar las suspensiones del extracto etanólico de <i>Culcitium canescens</i> “Vira Vira”	98
ANEXO N° 10: Resultados del efecto antiinflamatorio	100
ANEXO N° 11: Resultados del efecto analgésico	101



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Culcitium canescens</i> “Vira Vira”	1
Figura 2: Distribución de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	2
Figura 3: Mediadores químicos de la inflamación	13
Figura 4: Estructura química del diclofenaco.....	17
Figura 5: Tramadol mezcla racémica	25
Figura 6: Crecimiento de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira" en roquedales	35
Figura 7: Separación y limpieza de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira".	39
Figura 8: Estabilización de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira".	40
Figura 9: Proceso de pulverización de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> “Vira Vira”. .	40
Figura 10: Esquema del equipo de percolación.....	41
Figura 11: Equipo de percolación artesanal con muestra de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	42
Figura 12: Equipo de pletismómetro	50
Figura 13: Calibración del equipo de pletismómetro	50
Figura 14: Aplicación de carragenina al 1 % a los animales de experimentación	51
Figura 15: Presentación de los 4 grupos usados en la prueba experimental.....	55
Figura 16: Colocación de las ratas en envases de plástico transparentes para facilitar la observación de las conductas nociceptivas.....	56
Figura 17: Separación y limpieza de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	59
Figura 18: Análisis cromatográfico - corrida general del extracto etanólico de <i>Culcitium canescens</i> “Vira Vira”	64
Figura 19: Análisis cromatográfico - flavonoides del extracto etanólico de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	65
Figura 20: Análisis cromatográfico - terpenos del extracto de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	66
Figura 21: Análisis cromatográfico de alcaloides del extracto de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	67
Figura 22: Prueba piloto de los extractos etanólico, clorofórmico y éter de petróleo de <i>Culcitium canescens</i> sobre volumen de inflamación.....	69
Figura 24: Interacción de volumen inflamatorio por tratamiento y tiempo	72

Figura 25: Efecto antiinflamatorio después de 1 hora de tratamiento	73
Figura 26: Efecto antiinflamatorio después de 2 horas de tratamiento	75
Figura 27: Efecto antiinflamatorio después de 3 horas de tratamiento	76
Figura 28: Efecto antiinflamatorio después de 4 horas de tratamiento	77
Figura 29: Comparación del número de sacudidas por tiempo	79
Figura 30: Comparación del número de sacudidas por tratamiento	81



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 : Métodos extractivos más usados	5
Cuadro 2: Características de la inflamación aguda y crónica.....	8
Cuadro 3: Selección de formas farmacéuticas, según características y tratamientos	27
Cuadro 4: Fórmula para hallar el porcentaje de rendimiento	44
Cuadro 5: Fórmula para hallar el factor de retención	45
Cuadro 6: Fases móviles y reveladores usados en las pruebas cromatográficas	46
Cuadro 7: Formulación del gel al 5 y 10 % de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	48
Cuadro 8: Suspensiones del extracto de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira", grupo control negativo, grupo control positivo (tramadol) y suspensiones de extracto etanólico al 0.08 % p/v y 0.13 % p/v	53
Cuadro 9: Hábitat de <i>Culcitium canescens</i> " Vira Vira"	58
Cuadro 10: Clasificación taxonómica de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	59
Cuadro 11: Características del extracto etanólico de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	60
Cuadro 12: Características del extracto clorofórmico de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	60
Cuadro 13: Características del extracto éter de petróleo de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	61
Cuadro 14: Porcentajes de rendimiento de los extractos de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	62
Cuadro 15: Cromatografía de capa fina, resultados del extracto etanólico de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> " Vira Vira"	62
Cuadro 16: Volúmenes del edema plantar a diferentes tiempos luego de la inducción del edema y aplicación de los extractos blandos de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	68
Cuadro 17: Resultados del volumen inflamatorio de la prueba piloto	69
Cuadro 18: Descripción organoléptica del gel base, gel de <i>Culcitium canescens</i> y gel diclofenaco 1%	70
Cuadro 19: Porcentaje de inflamación del grupo control negativo, control positivo (gel diclofenaco 1 %) y gel al 5 % y 10 % de los extractos blandos de etanol de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira", en la etapa experimental.....	71
Cuadro 20: Análisis de varianza (anova) para el porcentaje de inflamación una hora después del agente flogógeno	73

Cuadro 21: Test de tukey al 95,0 % de confianza para el porcentaje de inflamación por tipo de tratamiento una hora después del agente flogógeno	73
Cuadro 22: Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de inflamación dos horas después del agente flogógeno	74
Cuadro 23: Test de tukey al 95.0% de confianza para el porcentaje de inflamación por tipo de tratamiento dos horas después del agente flogógeno.....	74
Cuadro 24: Análisis de varianza (anova) para el porcentaje de inflamación tres horas después del agente flogógeno	75
Cuadro 25: Test de tukey al 95.0% de confianza para el porcentaje de inflamación por tipo de tratamiento tres horas después del agente flogógeno	76
Cuadro 26: Análisis de varianza (anova) para el porcentaje de inflamación cuatro horas después del agente flogógeno	77
Cuadro 27: Test de tukey al 95.0% de confianza para el porcentaje de inflamación por tipo de tratamiento cuatro horas después del agente flogógeno	77
Cuadro 28: Tabla ANOVA para el número de sacudidas de la pata de los animales de experimentación por tratamientos	80
Cuadro 29: Pruebas de múltiple rango de Tukey para el número de sacudidas de la pata de los animales de experimentación por tratamientos	80
Cuadro 30: Efecto de las suspensiones tramadol 3 mg/kg v.o , suspensión de Vira Vira 13 mg/kg v.o y 8 mg/kg y control negativo en el ensayo de la formalina.....	82

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal evaluar el efecto antiinflamatorio y analgésico de un gel y una suspensión a base del extracto de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” en animales de experimentación y fue realizado en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María.

Con tal fin se procedió a la recolección de la planta medicinal en la localidad de Pucará en el departamento de Puno, fue identificado en el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín, posteriormente se seleccionaron las hojas de toda la planta, se limpió y trituro para proceder con la extracción de principios activos, se aplicó el método de percolación con el cual obtuvimos extractos con solventes de diferente polaridad, siendo el extracto etanólico el de mayor rendimiento con 18.89%, seguido del cloroformo con 1.32 % y éter de petróleo con 0.36 %. Se llevó a cabo el análisis por cromatografía en capa fina de los grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, terpenos y alcaloides en la muestra. Se hizo un estudio preliminar para la evaluación del efecto antiinflamatorio de los 3 extractos obtenidos dando como resultados la elección del extracto etanólico que presentó mejor efecto antiinflamatorio. Luego se elaboraron los geles al 5% y 10 % relacionándolas con el grupo control (vehículo) y un grupo con gel de diclofenaco 1%, para inducir el edema plantar se utilizó carragenina al 1%. Los datos se compararon mediante pruebas estadísticas de ANOVA y test de TUKEY al 95 % de confianza, evidenciándose que después de haber transcurrido 4 horas existe diferencia estadísticamente significativa al 95 % de confianza en el porcentaje de

inflamación del grupo gel diclofenaco 1 % y gel de “Vira Vira” al 10% siendo este más eficaz.

Para evaluar el efecto analgésico se realizó el test de formalina generando dolor a través de un estímulo químico, empleando suspensiones del extracto etanólico de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” por vía oral a dosis 8 mg/kg y 13 mg/kg, las cuales fueron comparadas con el grupo control negativo (vehículo) y un grupo control positivo de tramadol (3 mg/kg). Para valorar la actividad analgésica se aplicaron dos concentraciones de formalina al 2 % y 3 %, descartando la concentración mayor dado que produjo la muerte del animal de experimentación a los 20 minutos de ser administrado, los resultados obtenidos se cuantificaron mediante las sacudidas de la pata y fueron agrupadas en dos fases, fase I, correspondiendo a las sacudidas de los 10 primeros minutos y fase II, correspondiendo hasta los 50 minutos siguientes.

Los datos se compararon mediante pruebas estadísticas de ANOVA y test de TUKEY al 95 % de confianza, dando como resultado diferencias altas estadísticamente significativas en el número de sacudidas por animal sometidos a tratamientos.

El Test de Tukey evidencia que con el tramadol (3 mg/kg) se obtiene el mejor efecto en el control del dolor puesto que con este tratamiento se obtiene el menor promedio de sacudidas, seguido del tratamiento de suspensión (13 mg/kg).

En conclusión, el extracto etanólico de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, demostró que podría ser utilizado como una alternativa natural en el tratamiento de la inflamación y la analgesia.

Palabras claves: Inflamación, analgesia, *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.), carragenina, formalina.

ABSTRACT

The main objective of this research work was to evaluate the inflammatory and analgesic effect of a gel and a suspension based on the extract of *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira" in experimental animals and was carried out in the laboratories of the Catholic University of Santa Maria.

To this end, the medicinal plant was collected in the locality of Pucara in the Department of Puno, it was identified in the Herbarium Arequipense (HUSA) of the National University of San Agustín, then the leaves of the whole plant were selected, It was cleaned and mashed to proceed with the extraction of active ingredients, the Percolation method was applied with which we obtained extracts with solvents of different polarity, being the extract ethanolic the highest yield with 18.89%, followed by chloroform with 1.32% and petroleum ether with 0.36%. We carried out the analysis by thin layer chromatography of the groups of secondary metabolites: flavonoids, terpenes and alkaloids in the sample. A preliminary study was made for the evaluation of the antiinflammatory effect of the 3 extracts obtained giving as results the choice of the ethanolic extract that presented better antiinflammatory effect. Then the gels were developed at 5% and 10%, relating them with the control group (vehicle) and a group with diclofenac 1% gel, to induce the plantar edema, 1% carrageenan was used. The data were compared by statistical tests of ANOVA and TUKEY test at 95% of confidence, demonstrating elapsed 4 hours that there is statistically significant difference to 95% of

confidence in the percentage of inflammation of the group gel diclofenac 1 % and "Vira Vira" gel to 10% being this more effective.

In order to evaluate the analgesic effect the formalin test was performed generating pain through a chemical stimulus, using suspensions of the ethanolic extract of *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira", orally at doses 8 mg/kg and 13 mg/kg, which were compared with the negative control group (vehicle) and a Tramadol positive control group (3 mg/kg). To assess the analgesic activity two concentrations of formalin were applied to 2% and 3%, discarding the higher concentration since it produced the death of the experimental animal within 20 minutes of being administered, the results obtained were quantified By shaking the leg and were grouped in two phases, phase I, corresponding to the shakes of the first 10 minutes and phase II, corresponding to the following 50 minutes.

The data were compared by statistical tests of ANOVA and TUKEY test at 95% of confidence, resulting in statistically significant high differences in the number of shakes per animal subjected to treatments.

The Tukey Test evidence that with Tramadol (3 mg/kg) The best effect is obtained in the control of pain since with this treatment the lower average of shakes is obtained, followed by the suspension treatment (13 mg/kg).

In conclusion, the ethanolic extract of the leaves of *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira", showed that it could be used as a natural alternative in the treatment of inflammation and analgesia.

Keywords: Inflammation, analgesia, *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.), Carrageenan, formalin.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, la riqueza de las plantas medicinales es muy amplia y está enmarcada dentro de más de 4400 especies de usos conocidos por las poblaciones locales, de las cuales un gran porcentaje se presenta en la región andina y solamente se ha llegado a estudiar el 60% de la flora peruana.⁽¹⁾

Una planta medicinal es un recurso, cuya parte o extractos se emplean como drogas en el tratamiento de alguna afección. La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de droga vegetal y puede suministrarse bajo diferentes formas galénicas: cápsulas, comprimidos, crema, geles, suspensión, entre otras.⁽²⁾

Culcitium canescens (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” conocido popularmente como “Vira Vira”, “Oreja de Conejo”, “Wila Wila”, “Anchosh”, “Wira Wira” es una especie herbácea, de amplia distribución en el Perú a lo cual se le atribuye tradicionalmente efectos curativos como antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos.⁽³⁾

De acuerdo a las referencias bibliográficas, se ha demostrado en estudios realizados por Chilquillo T y Cervantes M. (2017) quienes efectuaron una investigación que tenía como objetivo conocer el efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante del *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. basónimo de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.). Por vía oral posee mayor eficacia antiinflamatoria a la dosis de 500 mg/kg (37,52 %) en comparación con los patrones de ibuprofeno 120 mg/kg (41,16 %) y prednisona 1,2 mg/kg (48,04 %). Presenta mayor efecto analgésico a una dosis de 1 200 mg/kg (28,55 %) en comparación con la solución de referencia tramadol (39,67 %).⁽⁴⁾

Okuyama E. et al. (1994) determinaron la actividad analgésica del extracto metanólico de Huira-Huira *Culcitium canescens* donde se mostró efectos analgésicos en las pruebas de contracción inducida por ácido acético y de presión de cola y también produjo una potente prolongación de la hipnosis inducida por el pentobarbital. Determinaron también la presencia de metabolitos secundarios como cacalonol, dehidrocacalohastina y cacalohastina (compuestos sesquiterpénicos).⁽⁵⁾

En tal sentido en esta investigación se propone obtener el extracto de “Vira Vira” y así darle un valor agregado e incrementar su valor económico como comercial en los mercados nacionales y orientar su uso futuro como agente antiinflamatorio y analgésico, así como también obtener productos ecológicos a bajo costo y accesible para su uso en la población de bajos recursos.



OBJETIVOS

1. Obtener extractos de las hojas *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, empleando solventes de diferente polaridad (etanol, cloroformo y éter de petróleo) y establecer cuál de los extractos presenta mayor efecto antiinflamatorio y analgésico en animales de experimentación concluyendo las pruebas piloto.
2. Identificar por cromatografía en capa fina los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.
3. Evaluar el efecto antiinflamatorio tópico en forma de gel del extracto obtenido de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” en ratas mediante edema plantar inducido con carragenina al 1 % y comparar el efecto antiinflamatorio de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” con gel de diclofenaco 1 %.
4. Evaluar el efecto analgésico del extracto obtenido de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, en ratas al ser administrado por vía oral en forma de suspensión con inducción del dolor mediante el test de formalina al 2 % y comparar el efecto analgésico de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” con una suspensión de tramadol.

HIPÓTESIS

Dado que la población le atribuye ciertas propiedades farmacológicas a *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, es probable que los preparados farmacéuticos a base de un extracto etanólico de dicha planta posea un efecto antiinflamatorio y analgésico en animales de experimentación.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”

1.1. Descripción Botánica

Según Sagástegui (1999), la describen como hierba perenne muy tomentosa con hojas arrosetadas, propia de la región Jalca o Puna, rizomatosa de hasta 45.0 cm. de alto, hojas reunidas sólo en la base de la planta, subarrosetadas, numerosas, sésiles, lineal o lineal lanceoladas de ápice subagudo, de 20.0 a 30.0 cm. de largo, densamente lanoso-pubescentes en ambos lados como se observa en la Figura 1. Inflorescencia en cabezuela, flores numerosas, isomorfas tubulares, de 15.0 a 16.0 mm de largo; fruto aquenio.⁽⁶⁾⁽⁴⁾



Figura 1: *Culcitium canescens* “Vira Vira”

Fuente: Elaboración Propia

1.2. Clasificación Taxonómica

Su clasificación según Bonpland, realizada el 1 de enero de 1983.

Reino	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Género	<i>Culcitium</i>
Epíteto específico	<i>canescens</i>
Autor	<i>Bonpl.</i>
Fecha determinación	1 de Enero de 1983

Fuente: Díaz-Piedrahita, Santiago⁽³⁾

1.3. Distribución

Se puede encontrar en las zonas altas, zonas de la sierra de Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú como se observa en la Figura 2, crece aproximadamente entre los 2800 y 4500 metros sobre el nivel del mar.⁽⁶⁾⁽⁴⁾



Figura 2: Distribución de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Fuente: Elaboración Propia

1.4. Nombres Comunes

"Vira Vira", "Ancosh", "Wila Wila" o "Oreja de Conejo".⁽⁶⁾

1.5. Hábitat

Crece en pequeñas áreas. Ocasionalmente se la puede encontrar en suelos rocosos e incluso en roquedales, donde su crecimiento es muy limitado. Crece en suelos degradados, así como en suelos con abundante materia orgánica. Sagástegui et al. (1999), manifiesta que habita en suelos rocosos y pedregosos de la Puna especialmente del centro y sur del Perú por encima de los 4300 msnm.⁽⁶⁾⁽⁴⁾

2. USOS DE LA PLANTA

Uno de los usos populares que le atribuye la población andina es como desinflamante en los procesos respiratorios infecciosos. Se prepara un cocimiento de las hojas y se toma dos veces al día, los habitantes de la zona recomiendan tomarla hervida, por otro lado, también es utilizada en emplastos para disminuir la inflamación y dolor en articulaciones. ⁽⁶⁾⁽⁴⁾

3. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN PLANTAS MEDICINALES

Los métodos de extracción más simples empleados se dividen de acuerdo al disolvente utilizado en:

- Extracción con agua: infusión, destilación por arrastre con vapor de agua y decocción. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾
- Extracción con solventes orgánicos: maceración, lixiviación o percolación, extracción Soxhlet, digestión y por fluido supercrítico. ⁽⁷⁾⁽⁸⁾

La selección de uno de cada método dependerá de las necesidades y facilidades tanto técnicas como económicas con las que se cuentan. En el Cuadro 1 se muestran los métodos extractivos más utilizados.

3.1. Métodos de extracción

3.1.1. Extracción Mecánica

Permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios de la planta, los cuales una vez extraídos se denominan jugo, el cual puede realizarse por expresión que consiste en ejercer una presión sobre la droga, por calor. ⁽⁹⁾

3.1.2. Destilación:

Es una técnica que permite separar los componentes volátiles de una planta medicinal de aquellos activos que son menos o nada volátiles. En este método se utiliza una fuente de calor, por lo que no es aplicable a principios activos sensibles al calor. El líquido obtenido se compone de dos fases inmiscibles. ⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

3.1.3. Extracción con gases

Es un proceso selectivo, es relativamente sencillo eliminar el gas extractor, se puede controlar la temperatura y presión que se ejerce en la extracción.⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

3.1.4. Extracción con disolventes

Consiste en poner en contacto la parte de la planta que contiene el principio activo, que es la droga medicinal con un disolvente que es capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos pasan de la droga al disolvente.⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾

3.1.4.1. Extracción Discontinua

Se sumerge la droga en el solvente, por lo que la totalidad de la droga contacta con el solvente utilizado para la extracción y la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio.⁽⁹⁾⁽¹¹⁾

- **Maceración**

La droga seca y triturada se coloca en contacto con el disolvente (agua, mezclas hidroalcohólicas, glicerina) esto a temperatura ambiente por horas o días.⁽⁹⁾⁽¹¹⁾

- **Digestión**

En este proceso se agrega solvente caliente (con temperaturas no mayores a los 50°C) al material vegetal molido colocado en un material de vidrio de boca pequeña, la temperatura del solvente permite una mayor extracción de 6 compuestos ya que la solubilidad de la mayoría de las especies aumenta con la temperatura.⁽⁷⁾⁽⁸⁾

- **Infusión y decocción**

Tanto la infusión como la decocción son procesos simples de extracción con agua, en el primer caso se agrega agua caliente o fría al material molido y luego se filtra; en el segundo el material se hierve por espacio de 15 minutos con el agua.⁽⁷⁾⁽⁸⁾

3.1.4.2. Extracción continua o progresiva

El solvente utilizado para la extracción se va renovando y actúa en una sola dirección.

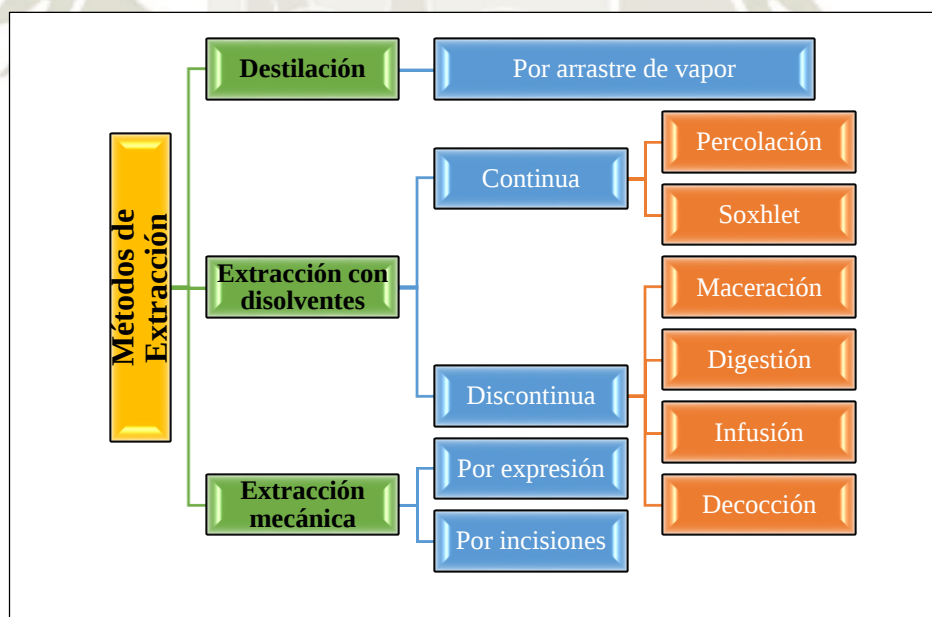
• Extracción Soxhlet

Método en caliente, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas.⁽⁷⁾⁽⁸⁾

• Percolación

También conocido como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. Se requiere agregar solvente constantemente.⁽⁷⁾⁽¹²⁾

Cuadro 1 : Métodos extractivos más usados



Fuente: Elaboración Propia

4. SELECCIÓN DEL SOLVENTE

La elección del disolvente dependerá de los parámetros técnicos y económicos:

Selectividad, estabilidad, inercia química, temperatura de ebullición no demasiado elevada para permitir su eliminación total, no demasiado baja para evitar las pérdidas; seguridad de manipulación (si es posible no tóxico ni inflamable).

Los disolventes más utilizados son los hidrocarburos alifáticos: éter de petróleo, hexano y también propano o butano líquido (a presión). Aunque el benceno es un buen disolvente, su toxicidad limita cada vez más su utilización. Igualmente, se ha recurrido a disolventes halogenados y al etanol. También se utilizan otros solventes como soluciones ácidas o alcalinas para la extracción selectiva de algunos compuestos, sin embargo se debe tener precaución con el pH de las mezclas para prevenir hidrólisis o reordenamiento de compuestos sensibles.⁽⁷⁾

5. EXTRACTOS ETANÓLICOS

5.1. Definición

Extracto con olor característico, obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado.⁽⁷⁾

6. INFLAMACIÓN

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas.⁽¹³⁾

Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a localizar la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia e inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, además, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes, para poder reparar el daño tisular producido.⁽¹⁴⁾⁽¹³⁾

Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos de Celso: calor, rubor, tumor y dolor. Como veremos posteriormente, 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.⁽¹⁴⁾⁽¹³⁾

6.1. Causas Generales

- Reacciones de hipersensibilidad de mecanismo inmunitario (vasculitis inmunomediada, rinitis alérgica).⁽¹⁵⁾
- Operación quirúrgica,
- Agentes físicos (traumatismo, radiación, calor, frío, etc).
- Irritación por tóxicos (sustancias químicas).
- Invasión por parte de un agente infeccioso (infecciones microbianas).
- Necrosis tisular.⁽¹⁵⁾

Causas de la inflamación crónica:

- Algunas enfermedades autoinmunes (tiroiditis de Hashimoto, artritis reumatoidea).⁽¹⁵⁾
- Cuerpos extraños: endógenos (tejido adiposo, cristales de ácido úrico) o exógenos (prótesis, material quirúrgico).⁽¹⁵⁾
- Microorganismos resistentes a la fagocitosis o mecanismos de destrucción intracelular (tuberculosis, lepra).⁽¹⁵⁾

La destrucción simultánea del tejido es producida cuando la inflamación crónica se extiende por un periodo prolongado, por persistencia del agente causante.⁽¹⁵⁾

6.2. Alteraciones principales de la inflamación

- Aumento del aporte sanguíneo provocando vasodilatación, responsable de los signos inflamatorios rubor y calor.⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

- Se eleva la permeabilidad vascular ocasionando escape de líquido desde los vasos sanguíneos dando como resultado acumulación de líquido (edema) o tumor inflamatorio.⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾
- Los polimorfonucleares neutrófilos y células mononucleadas (monocitos y macrófagos) juegan un papel clave en la defensa del huésped contra las bacterias invasoras, cuando se emiten las señales atractoras y quimioatractores.⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

6.3. Clases de inflamación

Diferencias entre la inflamación aguda y la inflamación crónica como se observa en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Características de la inflamación aguda y crónica

	Inflamación aguda	Inflamación crónica
Inicio	Rápido	Progresivo
Respuesta	inmediata	Persistente
Inmunidad	Innata	Mediada por células
Células predominantes	Neutrófilos	Macrófagos y Linfocitos
Duración	Corta (horas – días)	Larga (semanas-meses-años)
Produce	Edema	Fibrosis, necrosis tisular

Fuente: Elaboración Propia

6.3.1. Inflamación Aguda

6.3.1.1. Signos Comunes

Llamada también tetrada de Celso

- Tumefacción (edema)
- Rubor (vasodilatación)
- Calor (vasodilatación)

- Dolor (prostaglandinas)

6.3.1.2. Respuesta Vascular

- **Vasodilatación Generalizada (hiperemia)**

Este cambio vascular, inducido principalmente por las sustancias inflamatorias: histamina, bradisinina, eicosanoides, triptasas, que son secretadas desde los primeros segundos por los mastocitos locales, los basófilos y las células endoteliales activadas, aumentan el flujo de sangre hacia el área inflamada, lo que genera elevación de la temperatura y enrojecimiento local (calor y rubor).⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

- **Aumento de la permeabilidad vascular**

La dilatación capilar permite el paso de líquido y proteínas sanguíneas (entre las que se encuentran complemento e inmunoglobulinas), éstos al acumularse producen edema (tumor). La distensión de los tejidos, la acción de la bradisinina y el estímulo que todo lo anterior ejerce sobre las terminaciones nerviosas, originan el dolor, última de las cuatro manifestaciones clínicas cardinales de la inflamación: calor, rubor, tumor y dolor, descritas por Celsus.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

- **Edema Inflamatorio**

La presión hidrostática y la reducción de la presión oncótica (fuga de proteínas a espacios intersticiales), influyen en el desplazamiento de líquidos desde el plasma a los tejidos, lo cual se conoce como edema inflamatorio.

Disminuye la velocidad de flujo de sangre y su viscosidad aumenta.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.3.1.3. Acontecimientos Celulares

Los polimorfonucleares neutrófilos migran hacia la zona de la lesión, donde fagocitan los agentes patógenos, destruyen las bacterias y otros

microorganismos y degradan el tejido necrótico y los antígenos extraños. Así mismo también pueden prolongar la inflamación e inducir lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y radicales tóxicos del oxígeno.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

La secuencia de acontecimientos que se produce desde que los leucocitos salen de la luz vascular hasta que alcanzan el tejido intersticial (extravasación) se puede dividir en los siguientes pasos:

- **Marginación:** A medida que disminuye la velocidad del flujo sanguíneo en las fases iniciales de la inflamación (debido al incremento de la permeabilidad vascular), se modifican las condiciones hemodinámicas (disminuye la fuerza de cizallamiento sobre la pared) y un número cada vez mayor de leucocitos se sitúa en la periferia, a lo largo de la superficie endotelial.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾
- **Rodamiento:** Los leucocitos de forma individual y en filas, se colocan sobre el endotelio y se adhieren al mismo de forma transitoria.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾
- **Adhesión (pavimentación):** Descansan en algún punto en el que se adhieren firmemente al endotelio. Con el tiempo, el endotelio puede quedar literalmente revestido por leucocitos.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾
- **Transmigración:** Una vez adheridos los leucocitos dirigen sus pseudópodos hacia las uniones que existen entre las células endoteliales, se introducen apretadamente a través de las mismas y quedan situados entre la célula endotelial y la membrana basal.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾ Finalmente, atraviesan la propia membrana basal y salen al espacio extravascular. Este mecanismo es utilizado por neutrófilos, monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

- **Quimiotaxis:** Los leucocitos migran en los tejidos hasta alcanzar la zona de lesión, se puede definir como la locomoción orientada según un gradiente químico.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

Todos los granulocitos, monocitos y en menor grado linfocitos responden a los estímulos quimiotácticos con grados diferentes de velocidad.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.3.1.4. Fagocitosis y destrucción intracelular

La fagocitosis y la liberación de enzimas por los neutrófilos y macrófagos constituyen dos de los principales efectos beneficiosos de la acumulación de leucocitos en el foco de inflamación, estos fagocitan bacterias y cuerpos extraños los cuales no son reconocidos hasta que están recubiertos de factores naturales denominados opsoninas, que se unen a receptores específicos situados en los leucocitos. Las opsoninas más importantes como Inmunoglobulina G (IgG), complemento (C3b) proteínas plasmáticas de fijación de carbohidratos.⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

La destrucción de las bacterias o degradación se consigue principalmente por mecanismos dependientes del oxígeno (peróxido de hidrogeno) mecanismos independientes del oxígeno (lactoferrina, lisozima e hidrolasas, peróxido).⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.3.2. Inflamación Crónica

Se caracteriza por la presencia de:

- Linfocitos
- Células plasmáticas (producción de anticuerpos)
- Macrófagos (fagocitosis), células multinucleadas (macrófagos fusionados).⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

Los macrófagos del tejido inflamado aumentan gradualmente durante la inflamación aguda hasta que llegan a ser el tipo celular dominante en la

inflamación crónica se activan por el interferón gamma ($\text{INF}\gamma$) el cual es producido por linfocitos activados.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

En la fagocitosis, los leucocitos liberan sus productos no sólo al interior del fagolisosoma si no también hacia el espacio extracelular. Entre los productos liberados se incluyen enzimas lisosomales, por regurgitación durante la alimentación, endocitosis inversa o liberación citotóxica, metabolitos activos derivados del oxígeno, productos del metabolismo del ácido araquidónico como prostaglandinas y leucotrienos. Estos productos son potentes mediadores de la lesión tisular y amplifican los efectos del estímulo inflamatorio inicial.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.4. Mediadores químicos de la inflamación

Una de las fases clave del proceso inflamatorio constituye el conjunto de eventos bioquímicos que conducen a la secreción liberación de sustancias biológicamente activas, denominadas “mediadores químicos de la inflamación” que son responsables de los cambios metabólicos, vasculares y celulares que caracterizan propiamente la inflamación. Su clasificación se observa en la Figura 3.

La producción de mediadores activos esta desencadenada por productos microbianos o por proteínas del huésped, tales como las proteínas del complemento, cininas y sistema de coagulación que a su vez, son activadas por microbios y tejidos dañados.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

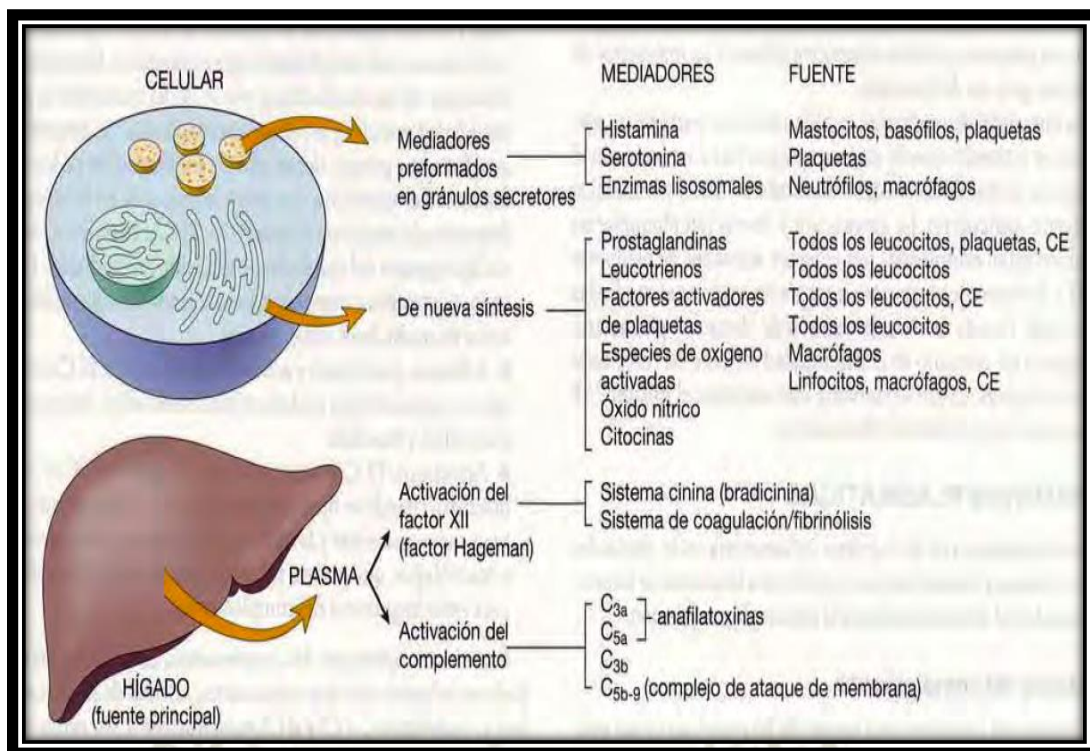


Figura 3: Mediadores químicos de la inflamación

6.4.1. Amino Vasoactivas

La histamina y la serotonina existen como sustancias preformadas en las reservas celulares y están entre los primeros mediadores que son liberados durante la inflamación. Se detectan en los mastocitos, los basófilos y las plaquetas y producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Su liberación a partir de los mastocitos, está producida por:

- Agentes físicos (traumatismo, calor)
- Reacciones inmunológicas en las que se produce la unión de anticuerpos IgE a los mastocitos.
- Fragmentos de C_{3a} y C_{5a} del complemento
- Neuropeptidos (sustancia P).
- Citocinas (IL-1 e IL-8) Factores de liberación de histamina derivados de los leucocitos.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.4.2. Proteasas Plasmáticas

Existen tres mediadores de origen plasmático que están relacionados entre sí y que desempeñan un papel clave en las respuestas inflamatorias:

- **Sistema del complemento:** La activación del complemento es un mecanismo de defensa del huésped frente a los agentes microbianos, que finaliza con el ensamblaje del complejo de ataque de membrana y la lisis del agente causante. Durante el proceso, se genera componentes del complemento que dan lugar a un aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis y opsonización. La activación del complemento se produce a través de dos mecanismos generales:

1.- **La vía clásica** iniciada por complejos antígeno-anticuerpo. ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

2.- **La vía alternativa**, activada por endotoxino, polisacáridos complejos y globulinas agregadas. Entre los componentes que presentan actividad inflamatoria son: C3a, que incrementa la permeabilidad vascular, C5a, que incrementa la permeabilidad vascular y presenta un elevado poder quimiotáctico para la mayor parte de los leucocitos y C3b y C3bi, u opsoninas, importantes en la fagocitosis. ^{(16) (17)}

- **Sistema de las cininas:** El sistema de las cininas es una cascada enzimática que se inicia cuando un factor de la coagulación del plasma, el factor de Hageman (factor XII), se activa después de la lesión tisular. Este factor activado a su vez activa la precalicreína para formar calicreína, que escinde el cininogeno para producir bradisinina. Este péptido potente que incrementa la permeabilidad celular produce vasodilatación e induce dolor y contracción del músculo liso. La calicreína actúa además de manera directa sobre el sistema del complemento mediante la escisión de su componente C5 en las fracciones C5a y C5b. ⁽¹⁶⁾

- **Sistema de los factores de la coagulación:** El factor Hageman activado o factor XIIa, inician cuatro sistemas implicados en la respuesta inflamatoria.

- a) Sistema de cininas.
- b) Sistema de coagulación, estimula la activación de trombina, fibrinógeno y factor X, con propiedades pro inflamatorias.
- c) Sistema fibrinolítico, produce fibrina y degrada trombina. Tiene un rol de reparación.
- d) Sistema del complemento, producen anafilatoxinas C3A y C5A.

6.4.3. Neuropeptidos

Los neuropeptidos desempeñan un papel en el inicio de la respuesta inflamatoria. Los péptidos más pequeños como las sustancia P, representan muchas funciones biológicas, entre ellas la transmisión de señales dolorosas, la regulación de la presión arterial y la estimulación de la secreción en células inmunitarias y endocrinas, aunque se caracteriza sobre todo por ser un potente mediador de la permeabilidad vascular. La liberación de la sustancia P altera la permeabilidad vascular dando lugar a la entrada de componentes plasmáticos en la zona de la lesión con amplificación del estímulo inflamatorio inicial.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.4.4. Ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas

La liberación de ácido araquidónico esta mediada por fosfolipasas, durante la inflamación aguda, los fosfolípidos de la membrana de los mastocitos, monocitos y neutrófilos se metabolizan para formar prostaglandinas y leucotrienos.

La acción antiinflamatoria de los fármacos (AINEs, Glucocorticoides) se debe a su capacidad de inhibir la producción de prostaglandinas.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.4.5. Factores activadores de plaquetas

El factor activador de plaquetas (PAF) mediador activo derivado de fosfolípidos, el PAF tiene efectos de vasoconstricción y bronco constricción, pero cuando su concentración es muy baja induce vasodilatación y aumento de la permeabilidad

venular, aumenta la adhesión de leucocitos al endotelio, la quimiotaxis, desgranulación y el estallido oxidativo. También potencia la síntesis de otros mediadores eicosanoideos, leucocitarios.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.4.6. Citocinas

Las citocinas son proteínas producidas por linfocitos y macrófagos, además de células endoteliales, epiteliales y del tejido conectivo, que modulan acciones de otros tipos celulares.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.4.7. Interleucina I (IL – 1) y factor de necrosis tumoral (TNF)

El TNF e IL-1 son las dos citocinas principales que median la inflamación. La secreción de ambas puede estimularse por endotoxinas y otros productos microbianos, inmunocomplejos, agresión física y varios estímulos inflamatorios.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

6.4.8. Quimiocinas

Las quimiocinas son proteínas que actúan como quimioatrayentes para tipos específicos de leucocitos; se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a la disposición de cisteína en proteínas maduras.

Las quimiocinas estimulan el reclutamiento de leucocitos en la inflamación y controlan la migración normal de células a través de varios tejidos.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

Pueden mostrarse en concentraciones elevadas unidas a proteoglicanos de la superficie de células endoteliales y en la matriz extracelular.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.4.9. Óxido Nítrico

Es un vasodilatador potente en virtud de sus acciones sobre el músculo liso vascular, reduce la agregación y adhesión de plaquetas, inhibe características de inflamación inducidas por mastocitos. El bloqueo de su producción induce la rodadura y adhesión de leucocitos. La producción de NO es un mecanismo compensatorio endógeno que reduce las respuestas inflamatorias. El NO y sus

derivados son microbicidas, y también es un mediador de la defensa del huésped contra la infección.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾

6.5. Fármacos Antiinflamatorios

En farmacología existen dos grandes grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

6.5.1. Fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINE)

Los antiinflamatorios no esteroideos (abreviados AINE) son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos. Todos inhiben la enzima ciclooxygenasa, como consecuencia se inhibe la formación de prostaglandinas (particularmente PGE y PGL) a partir del ácido araquidónico.⁽¹⁸⁾

Seguidamente describiremos un AINE de uso tópico de interés para este proyecto de investigación:

6.5.1.1. Diclofenaco

Es un derivado de ácido fenilacético, se comercializa como una sal sódica para una aplicación tópica u oral.⁽¹⁸⁾ En la Figura 4 se muestra su estructura química.

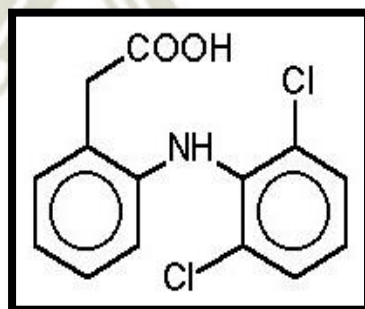


Figura 4: Estructura química del diclofenaco

• Mecanismo de acción

El diclofenaco tiene actividades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Inhibe la biosíntesis de las prostaglandinas y otros

prostanoides mediante la inhibición competitiva y reversible de la enzima ciclooxigenasa, provoca disminución de la formación de los precursores de las prostaglandinas y los tromboxanos del ácido araquidónico.⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

- **Indicaciones terapéuticas**

Alivio local del dolor y la inflamación leves y ocasionales.⁽¹⁹⁾

- **Posología y forma de administración Vía de administración:**

Tópica. **Adultos:**Aplicar una fina capa del producto en la zona dolorida cada 4 horas mediante un ligero masaje para facilitar la penetración.⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

7. EL DOLOR

Dada la elevada prevalencia del dolor entre la población, es importante que el farmacéutico adquiriera los conocimientos necesarios para saber atender a los pacientes que acuden a su establecimiento y proporcionarles asesoramiento que les ayude a aliviar su enfermedad en función de las características.

Generalmente cuando se tiene un paciente con dolor rápidamente se piensa en enfermedad, pero muchas veces no se tiene un diagnóstico claro de la enfermedad productora del dolor y en muchos casos son enfermedades menores, tales como: contracturas, tendinitis, exceso de tensión, entre otros para los cuales el tratamiento médico no tiene una respuesta definitiva. En la mayoría de los casos el tratamiento prescrito es sintomático: antiinflamatorios, miorrelajantes, geles de aplicación tópica etc.⁽²¹⁾⁽²²⁾

La International Association for the Study of Pain (IASP) define el dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial o descrita en términos de tal daño”.⁽²²⁾⁽²³⁾

Es importante tener en cuenta que el dolor es en principio, un mecanismo de defensa, cuya función es detectar y localizar los procesos que dañan las estructuras corporales,

pero es también un fenómeno subjetivo que puede estar o no vinculado a una lesión o patología orgánica. ⁽²²⁾⁽²³⁾

Además, cuando esta vinculación existe, la intensidad del dolor no está necesariamente relacionada con la gravedad de la alteración que lo produce. ⁽²²⁾⁽²³⁾

Tampoco se debe olvidar que tiene una parte de sensación que se describe a menudo como un proceso que penetra o destruye los tejidos (lancinante, opresivo) y otra emocional (ansiedad, excitación, miedo) en la que incluyen aspectos físicos, psicológicos y sociales lo que con frecuencia complica su abordaje terapéutico. ⁽²³⁾

Sobre todo cuando es crónico, es habitual que se presenten trastornos concomitantes como depresión, alteraciones del sueño y disminución de las capacidades físicas. ⁽²³⁾

7.1. Tipos de dolor

La clasificación del dolor puede hacerse en función de diversos criterios:

7.1.1. Según su duración

- **Dolor Agudo:** Es un fenómeno de corta duración que generalmente se asocia a un daño tisular y desaparece con la curación de este último. Suele estar claramente localizado y su intensidad se relaciona con el estímulo que lo produce. Se acompaña de reflejos protectores, como la retirada de la extremidad dañada o espasmos musculares y produce un estado de excitación y estrés que conlleva un incremento de la presión arterial. ⁽²³⁾
- **Dolor Crónico:** Tiene una duración de más de 3 o 6 meses, se prolonga más allá de la curación de la lesión que lo originó o se asocia a una afección crónica. ⁽²³⁾

Tanto la intensidad como la etiología y el patrón de evolución son muy variables.

No tiene una acción protectora y está especialmente influenciado por los factores psicológicos, ambientales y afectivos.

7.1.2. Según su origen

- **El Dolor Nociceptivo:** Es el causado por la activación de los receptores del dolor (nociceptores) en respuesta a un estímulo (lesión, inflamación, infección, enfermedad). Como ocurre con el dolor agudo, suele haber una relación directa entre su intensidad y la gravedad de la agresión.⁽²⁴⁾⁽²³⁾
- **El Dolor Neuropático:** Se origina por un estímulo directo del sistema nervioso central (SNC) o una lesión de los nervios periféricos. No se relaciona, por tanto, con la estimulación de las terminales sensitivas y suele acompañarse de disestesias y parestesias. Es habitual que sea desproporcionado para el estímulo que lo produce (hiperalgesia) y que aparezca sin que haya una causa identificable. Se considera un dolor patológico, ya que no tiene ninguna utilidad como mecanismo de alerta o defensa. Aunque se debe a causas muy diferentes, presenta características comunes a la mayoría de los pacientes, como hormigueo, picazón, quemazón, opresión, punzadas o descargas eléctricas.⁽²⁴⁾⁽²³⁾
- **El Dolor Psicógeno:** No se debe a una estimulación nociceptiva ni a una alteración neuronal, sino que tiene una causa psíquica (depresión, hipocondría) o bien se trata de la intensificación desproporcionada de un dolor orgánico que se debe a factores psicológicos.⁽²⁴⁾⁽²³⁾

7.1.3. Según su localización

El dolor nociceptivo se divide en:

- **Dolor Somático:** Cuando se estimulan los receptores de la piel, el sistema musculoesquelético o vascular. Se caracteriza por estar bien localizado y aunque con frecuencia es punzante, su tipología varía de unos pacientes a otros.⁽²³⁾⁽²⁵⁾
- **Dolor Visceral:** Que se debe a lesiones o disfunciones de los órganos internos, aunque hay vísceras que no duelen, como el hígado o el pulmón.

Es profundo, continuo y mal localizado e irradia incluso a zonas alejadas del punto de origen. Suele acompañarse de síntomas vegetativos (náuseas, vómitos, sudoración).⁽²³⁾⁽²⁵⁾

Por su parte, el dolor neuropático se divide en central y periférico, según en qué parte del sistema nervioso se localiza la lesión o enfermedad que lo causa.⁽²³⁾

7.2. Fisiología del dolor

Existen dos tipos de receptores del dolor o nociceptores: los que responden a estímulos térmicos, mecánicos y transmiten con rapidez la señal a través de fibras mielinizadas y los que están conectados a las fibras amielínicas de conducción más lenta, que responden a la presión, temperatura y otro tipo de estímulos. En los tejidos lesionados o inflamados, la presencia de sustancias como la bradicinina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos o la serotonina provocan que los nociceptores aumenten su sensibilidad, de manera que estímulos de muy poca intensidad, por ejemplo, un leve roce es suficiente para generar una señal dolorosa.⁽²⁵⁾

A este fenómeno se le conoce como sensibilización y se produce tanto a nivel somático como visceral. De hecho, en las vísceras existe un gran número de neuronas aferentes, que en ausencia de una lesión o inflamación no responden a estímulos mecánicos o térmicos (por lo que se denominan nociceptores silenciosos) y se vuelven sensibles a estos estímulos en presencia de los mediadores químicos antes citados.⁽²³⁾⁽²⁵⁾

Los nociceptores, además de desencadenar la señal, liberan mediadores, como la sustancia P, que produce vasodilatación, desgranulación de mastocitos e induce la producción y liberación de mediadores inflamatorios. Las fibras aferentes penetran en la médula espinal a través de las raíces dorsales y terminan en las astas posteriores de la sustancia gris. Ahí contactan con neuronas medulares que llevan la señal a las regiones cerebrales encargadas de la percepción del dolor.⁽²³⁾⁽²⁵⁾

Las neuronas medulares transportan la señal al tálamo contralateral, desde donde es conducida a la corteza frontal y a la somatosensitiva. Además de estos, existen otros circuitos neuronales que intervienen en la modulación del dolor y que están implicados en sus factores afectivos y emocionales.⁽²³⁾⁽²⁵⁾

Las lesiones y los trastornos funcionales de los nervios periféricos producen dolores intensos (como la neuropatía diabética). Ese tipo de dolores aparecen también cuando se afectan el tálamo y el haz espinotalámico y son bastante difíciles de tratar.⁽²³⁾⁽²⁵⁾

Estos fenómenos se deben a que las neuronas lesionadas se vuelven muy sensibles a los estímulos e incluso se activan espontáneamente, generando impulsos dolorosos.⁽²³⁾

7.3. Tratamiento Farmacológico

Aunque la solución ideal para el dolor sería eliminar la causa que lo produce, con frecuencia esto no es posible o no puede hacerse con la suficiente rapidez y se precisa un tratamiento sintomático.⁽²⁶⁾⁽²⁵⁾

Para ello se utilizan fundamentalmente los analgésicos, aunque también pueden emplearse coadyuvantes.⁽²⁶⁾

7.4. Paracetamol y antiinflamatorios no esteroideos.

Constituyen la primera línea en el tratamiento farmacológico del dolor y son por ello, el grupo de fármacos de mayor consumo. Se emplean tanto solos como combinados con otros analgésicos.⁽²⁶⁾

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), suelen ser eficaces para tratar los dolores más habituales a dosis recomendadas y en tratamientos cortos son bastante seguros.⁽²⁷⁾

Una norma básica es que estos medicamentos deben utilizarse a la menor dosis a la que sean suficientes para eliminar el dolor. Aumentar las dosis no implica

necesariamente que se incremente la eficacia analgésica y en caso de que eso suceda, no hay una relación lineal dosis respuesta ya que estos fármacos presentan techo analgésico. Por el contrario, se aumentaría el riesgo de padecer reacciones adversas que especialmente a altas dosis y durante tiempos prolongados pueden ser muy graves. De hecho, los AINEs son la primera causa iatrogénica de ingreso hospitalario.⁽²⁷⁾

7.5. Opioides

Los receptores opioides están ampliamente distribuidos por el sistema nervioso y al interaccionar con ellos los opioides producen analgesia, por lo que son los medicamentos más eficaces y de mayor tradición histórica en el tratamiento del dolor.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

Se conocen tres tipos principales de receptores opioides: δ (delta), κ (kappa) y μ (mu) y los fármacos se clasifican en función de su capacidad para unirse a ellos en:

- a) **Agonistas Puros:** Son agonistas selectivos o al menos muy preferentes de los receptores μ (mu). A este grupo pertenecen codeína, fentanilo, metadona, morfina, oxicodona, petidina o tramadol.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾
- b) **Agonistas-Antagonistas Mixtos:** Son agonistas de los receptores κ (kappa) y agonistas con poca actividad o incluso antagonistas de los receptores μ (mu), por lo que, si bien son analgésicos, en presencia de un agonista puro se comportan tanto más como antagonistas cuanto menor es su actividad sobre los receptores μ (mu). Los más conocidos son butorfanol, nalorina y pentazocina.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾
- c) **Agonistas Parciales:** Son agonistas de los receptores μ (mu), pero con menor actividad que los puros, por lo que en presencia de estos se comportan como antagonistas. El ejemplo típico es la buprenorina.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

d) Antagonistas Puros: Son agonistas de los receptores μ (μ), pero carecen de actividad analgésica, por lo que su uso es como antídotos: naloxona, naltrexona.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

Los opioides pueden ser muy eficaces en los dolores nociceptivos tanto agudos como en crónicos y también pueden resultar útiles en el tratamiento del dolor neuropático.⁽²⁸⁾⁽³⁰⁾

Las principales reacciones adversas son: náuseas y vómitos (sobre todo tras la primera dosis) estreñimiento (es la RAM que más suele afectar a los pacientes que los utilizan de forma crónica, ya que a él no se desarrolla tolerancia) la sedación y somnolencia. La dependencia física y el riesgo de producir depresión respiratoria fueron durante muchos años la principal causa para la extensión del uso de estos fármacos, pero si su administración se realiza de forma bien pautada pueden controlarse adecuadamente.⁽²⁸⁾⁽³⁰⁾

La tolerancia es una característica común a todos los opioides y es cruzada entre los que activan el mismo tipo de receptor. Obliga a ir incrementando paulatinamente las dosis y la velocidad a la que se desarrolla es diferente para cada paciente. Afortunadamente, debido a su mecanismo de acción y a diferencia de los AINE, los opioides no tienen techo analgésico, por lo que al incrementar las dosis puede seguir controlándose el dolor.⁽²⁸⁾⁽³⁰⁾

Los agonistas puros son altamente adictivos y los agonistas-antagonistas producen con más facilidad alucinaciones y efectos psicológicos. Por su parte, buprenorfina (agonista parcial) tiene menor capacidad adictiva y mantiene su poder analgésico sin llegar a producir euforia y con muy bajo riesgo de depresión respiratoria, pero produce más vómitos y la intoxicación no puede tratarse con naloxona. La administración conjunta con rifampicinas puede disminuir su eficacia Analgésica.⁽²⁸⁾⁽³⁰⁾

7.5.1. Opioides Menores

Son los que tienen menor capacidad analgésica, pero también los más seguros y se emplean solos o asociados a AINE en el tratamiento de dolores de intensidad moderada.⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

7.5.1.1. Tramadol

Tramadol es un opioide sintético perteneciente al grupo fenilpiperidinas que actúa sobre el sistema nervioso central, ejerciendo su acción analgésica por un mecanismo dual: unión a los receptores opiáceos μ (μ) principalmente y al bloqueo de la recaptación de noradrenalina y serotonina. Puede ser administrado por vía oral, subcutánea (s.c.) intravenosa (i.v.) intramuscular (i.m.) rectal y espinal.⁽³¹⁾

El tramadol corresponde a un compuesto quiral, debido a que pueden identificarse dos centros quirales (es decir átomos de carbono asimétricos).

El producto se administra como una mezcla racémica de dos enantiómeros: 1R, 2R-tramadol o (+)-*trans*-tramadol (+TT) y 1S, 2S-tramadol o (-)-*trans*-tramadol (-TT) como se observa en la Figura 5. El *trans*-tramadol se considera un fármaco eficaz para la analgesia en el contexto de los traumatismos, los cólicos biliares y renales y para el enfoque del dolor crónico, con especial hincapié en el dolor nociceptivo.⁽³¹⁾

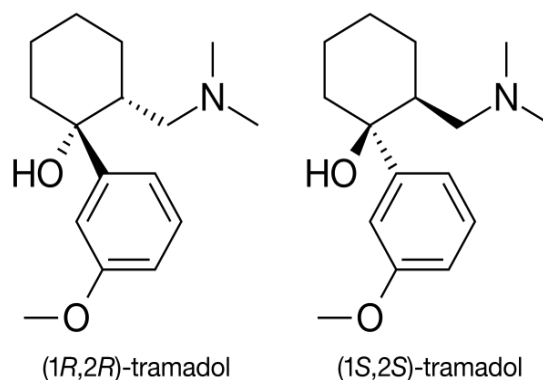


Figura 5: Tramadol mezcla racémica

7.5.2.Opioides Mayores

Se utilizan en el tratamiento de dolores intensos como por ejemplo los oncológicos. El más conocido y utilizado como patrón es la morfina. La dosis inicial recomendada por vía oral es de 5 a 10 mg cada 4 horas. Si no resulta suficiente para controlar el dolor, se aumenta la dosis en un 50% cada día hasta conseguir la analgesia. Una vez controlado el dolor se puede pasar a las formas de liberación prolongada, cuya pauta posológica resulta más cómoda (una toma cada 12 o cada 24 horas).⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾

Además de la vía oral, existen en la actualidad otras alternativas que facilitan la adherencia a los tratamientos, como los parches transdérmicos o que resultan de especial utilidad en el dolor irruptivo (nebulizadores nasales o comprimidos sublinguales).⁽²⁸⁾⁽³⁰⁾

8. Formas farmacéuticas semisólidas de aplicación tópica

Son un grupo de preparados farmacéuticos muy heterogéneo, que se caracterizan por ser más viscosos que el agua y tener una consistencia semisólida. Están destinados a ser aplicados sobre la piel o ciertas mucosas para ejercer una acción local o permitir que penetren los medicamentos que contienen, como se observa en el Cuadro 3 su selección depende de sus características y tratamientos. Están formados por una base (simple o compuesta), también llamada vehículo o excipiente en la que se disuelven o dispersan uno o varios principios activos. Esta base puede ser terapéutica y modificar la cesión del principio activo. Además, suelen contener otros excipientes como antioxidantes, antimicrobianos, estabilizantes y emulgentes.⁽³²⁾ La diferencia básica entre las diferentes formas semisólidas es el contenido de agua, de forma que:

- Un ungüento no contiene nada de agua.
- Una pomada contiene más cantidad de agua que un ungüento, pero menos que una crema.
- La crema es, de todas las fórmulas semisólidas, la que contiene más cantidad de agua.

Cuadro 3: Selección de formas farmacéuticas, según características y tratamientos

Forma Farmacéutica	Características	Tratamiento
Pasta	La pasta acuosa tiene acción superficial	Lesiones exudativas de tipo agudo o subagudo, idóneo para los pliegues.
	La pasta grasa se absorbe muy poco	
Polvos	No atraviesan la capa córnea	Secantes, refrescante y antiinflamatorio superficial en áreas intertiginosas.
	Acción Superficial	
Gel	Absorción baja/media	Lesiones agudas, heridas exudativas.
	Deposita el fármaco superficialmente	Áreas pilosas y cara, pieles grasas.
Crema	Absorción media, poca capacidad oclusiva	Lesiones agudas, subagudas o húmedas.
	Acción refrescante	Áreas de piel fina (axilas, cara, escroto), pieles normales.
Pomada	Absorción alta, capacidad oclusiva media	Lesiones crónicas, secas o escamosas.
	Acción emoliente y lubricante	Áreas de piel gruesa (palmas, plantas).
		Pieles secas o hiperqueratósicas.
Ungüento		Lesiones crónicas, dermatosis localizadas.

Absorción muy alta, capacidad oclusiva	Áreas de piel gruesa (palmas, plantas), pieles hiperqueratósicas. Ideal para ablandar costras.
--	--

Fuente: Elaboración Propia

9. Geles

Son sustancias semisólidas que se forman al tratar líquidos con gelificantes. A la temperatura de la piel disminuye su viscosidad (útil en zonas pilosas) y pierde rápido el agua (efecto evanescente). No contienen lípidos, por lo que están recomendado en pieles grasas.⁽³²⁾⁽³³⁾

Entre los geles, podemos diferenciar dos tipos:

9.1. Lipófilos (oleogeles): Son preparaciones cuyas bases están constituidas habitualmente por parafina líquida con polietileno, por aceites grasos gelificados con sílice coloidal o por jabones de aluminio o cinc.⁽³²⁾⁽³³⁾

9.2. Hidrófilos (hidrogeles): Son preparaciones cuyas bases generalmente son agua, glicerol y propilenglicol gelificado con la ayuda de agentes gelificantes apropiados, tales como almidón, derivados de la celulosa, carbómeros y silicatos de magnesio y aluminio.⁽³²⁾⁽³³⁾

10. SUSPENSIONES

10.1. Concepto y aplicación

Es un sistema disperso heterogéneo constituido por partículas de un sólido insoluble (fase dispersa) de tamaño de partícula mayor de 0,1 micra, dispersadas en un líquido (medio dispersante).

La formulación de un principio activo en forma de suspensión puede responder a diferentes necesidades. Un caso son los medicamentos destinados a pacientes con dificultades para la ingestión de formas sólidas, estos medicamentos se administran como formulaciones líquidas y si el principio activo no es soluble en

el vehículo habrá que administrarlo en forma de suspensión, otras veces, aunque el medicamento sea soluble, su estabilidad en disolución es limitada, por lo que se recurre a la formulación en forma de suspensión de una sal insoluble del mismo.

Por otra parte, una suspensión fina proporciona una elevada superficie de contacto con el medio gastrointestinal, lo cual es conveniente en el caso de compuestos destinados a la adsorción de toxina o a la neutralización del pH. En general, las suspensiones se administran por vía oral, aunque también se aplican por vía tópica y por vía parenteral, en ciertos casos la formulación de un principio activo en forma de suspensión responde a la necesidad de una velocidad lenta de liberación.⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾

Las suspensiones son sistemas dispersos heterogéneos que presentan una serie de problemas relativos a su formulación puede haber problemas, de humectación, sedimentación, derivados de las interacciones existentes entre las partículas, de crecimiento de cristales y de adsorción de las partículas al envase. Un término que se suele utilizar en el campo de las suspensiones es el de “caking”.⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾

Por caking se entiende la formación de un sedimento no redispersable en su sistema de suspensión, las principales causas de caking son la formación de puentes cristalinos entre partículas y la de coagulos, idealmente podría definirse una suspensión como estable cuando no se produce agregación entre sus partículas y estas permanecen uniformemente distribuidas en el medio de dispersión, sin embargo, las suspensiones reales no se comportan de esta forma, en consecuencia, es posible definir una suspensión estable desde el punto de vista farmacéutico como aquella que cumple las siguientes condiciones.⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾

- La suspensión debe permanecer homogénea durante cierto tiempo mínimo (el tiempo que transcurre entre la agitación del recipiente y la retirada de la dosis correspondiente).^{(34) (36)}
- El sedimento que se forma durante el almacenamiento debe poderse resuspender fácilmente mediante agitación.⁽³⁴⁾⁽³⁶⁾

- La viscosidad debe estar bien equilibrada de forma que la retirada de la dosis y su aplicación sea fácil.⁽³⁴⁾⁽³⁶⁾
- El tamaño de partícula ha de ser pequeño y homogéneo, ello proporciona una textura más aceptable a la formulación.⁽³⁴⁾⁽³⁶⁾

11. HUMECTACIÓN

Para poder obtener una suspensión, es indispensable que el líquido humecte a las partículas del sólido, es decir, que el líquido desplace al aire en contacto con el sólido y se pueda situar a su alrededor, si esto no ocurre no se puede dispersar una fase a la otra. Algunos sólidos insolubles en agua son fácilmente humectados por la misma, ello indica la existencia de afinidad entre ambos. Sin embargo, a medida que un sólido es más hidrófobo, su afinidad por el agua disminuye y se dificulta progresivamente el desplazamiento del aire por el líquido.⁽³⁷⁾⁽³⁶⁾

En general, se denominan “sólidos hidrofílicos” a aquellos que se humectan fácilmente por el agua y “sólidos hidrofóbicos” a aquellos que se humectan con dificultad. En este último caso habrá que recurrir a la utilización de agentes humectantes para poder elaborar una suspensión. Como agentes humectantes pueden utilizarse tensioactivos, coloides hidrofílicos y disolventes.⁽³⁷⁾⁽³⁶⁾

Como ejemplos de tensioactivos empleados como humectantes en la preparación de suspensiones destinadas a su administración oral, están los tipos Tween y Span. Para uso externo se suelen utilizar el lauril sulfato sódico, para vía parenteral se pueden utilizar algunos polisorbatos, lecitinas. Los tensioactivos también pueden incorporarse a las suspensiones con el fin de disminuir la adhesión de las partículas a las paredes de los envases.⁽³⁷⁾⁽³⁶⁾

Otros grupos de agentes humectantes son los coloides hidrofílicos. Se usan polímeros hidrofílicos tipo carboximetil celulosa sódica, goma acacia, alginatos, goma tragacanto, etc. También se utilizan otros materiales que aun siendo insolubles en agua, poseen cierto carácter hidrófilo, por ejemplo, bentonita, silicatos de aluminio y magnesio y sílice coloidal. Muy frecuentemente se pretende que las suspensiones

posean propiedades tixotrópicas, es decir, que el reposo posea una estructura viscosa, tipo gel, que se rompa fácilmente mediante agitación.⁽³⁷⁾⁽³⁶⁾

Por último, también es posible recurrir a la adición de algunos disolventes miscibles con agua y que reducen la tensión superficial liquido-vapor, lo que favorece la humectación. Ejemplo de solventes utilizados con este fin son el alcohol, el glicerol y los glicoles.⁽³⁷⁾⁽³⁶⁾

12. TAMAÑO DE PARTICULA Y CRECIMIENTO DE CRISTALES

A la hora de formular una suspensión hay que obtener un tamaño de partícula adecuado y además garantizar que este se mantenga. En cuanto a la administración de una suspensión unas partículas mayores de 5 μm ocasionan una textura desagradable, en otras ocasiones, el tamaño se manipula con el fin de controlar la velocidad de liberación del principio activo. Por otra parte, se ha visto como una disminución del tamaño reduce la velocidad de sedimentación.⁽³³⁾

13. FORMULACIÓN Y ESTABILIDAD DE SUSPENSIONES . REOLOGÍA

Mientras la suspensión se encuentre en reposo, durante el almacenamiento, es deseable que posea una elevada viscosidad, así se evitan los procesos de sedimentación, caking y agregación. Pero también interesa que tras una agitación simple, la viscosidad se reduzca para permitir la reconstitución y homogenización necesaria para la retirada de la dosis correcta.⁽³³⁾

14. CONSIDERACIONES ÉTICAS EN EL ESTUDIO DEL DOLOR EN ANIMALES

Las investigaciones en dolor son necesarias si se quieren conocer nuevos aspectos clínicamente relevantes de los mecanismos de la nocicepción o de nuevos tratamientos farmacológicos. Éstas deben realizarse siguiendo las líneas que marca el Comité para la Investigación y la Ética de la IASP en lo concerniente a los aspectos éticos de los experimentos que implican dolor o sufrimiento a los animales. Por ello,

las investigaciones con modelos de dolor tienen que tener una adecuada planificación con la intención de minimizar al máximo el sufrimiento del animal, ya que el animal no es un objeto para explotar sino un ser vivo. Al realizar experimentos en animales conscientes habrá que utilizar los estímulos nocivos menos agresivos e incluso el investigador debe probarlos sobre sí mismo si es posible y las desviaciones del comportamiento normal de los animales deben ser evaluadas y comunicadas en los manuscritos. A la hora de utilizar los modelos de dolor hay que asegurarse de que los animales son expuestos al mínimo dolor necesario para alcanzar los objetivos del experimento y que la duración del experimento sea lo más corta posible, así como que el número de animales utilizados sea el mínimo posible. Además, el investigador debe estar convencido de que la justificación en que basa la realización de sus experimentos es ética. La Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio (SECAL) también tiene unos principios éticos para la investigación y docencia con modelos animales que están en consonancia con los anteriormente descritos. Y además nos recuerda que en España la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos está regulada por el REAL D E C R E T O 223/1988 de 14 de marzo, que todo investigador que utilice animales debiera conocer.⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾

Dentro de los modelos de dolor agudo se encuentran principalmente aquellos que utilizan estímulos físicos y químicos; se valora la latencia de respuesta por parte del animal y el tiempo de evaluación es breve. Algunos de estos modelos son el de la plancha caliente, levantamiento de la cola y el de inmersión de la cola en agua caliente, los cuales utilizan un estímulo térmico, el modelo de la presión de la pata o de la cola usan estímulos mecánicos y finalmente el modelo de estiramiento abdominal, así como el de la formalina (Primera Fase) son modelos que utilizan estímulos químicos.⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾

Los modelos crónicos utilizan agentes irritantes como estímulo nocivo, en estos se mide cuantitativamente el resultado después del estímulo y normalmente se administra el agente por vía intradérmica o peritoneal, el modelo de la formalina, en particular, la segunda fase se encuentra dentro de este grupo.⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾

15. MODELO DE LA FORMALINA

Este modelo es de tipo inflamatorio, ya que involucra un proceso de sensibilización durante el cual el fenómeno inflamatorio se desarrolla. Se trata de un test de tipo químico en el que, a diferencia de otros métodos, se utiliza un estímulo doloroso de larga duración (dolor tónico). Consiste en la observación y cuantificación de la respuesta del comportamiento nociceptivo en un animal al que previamente se le ha inyectado, intradérmicamente en una pata, una solución de formalina. La magnitud del dolor puede cuantificarse mediante la suma del tiempo de lamido de la pata inyectada y de sacudidas de ésta según Abbott y cols 1995, produce una respuesta del tipo bifásico. La respuesta nociceptiva en el test de la formalina puede dividirse en dos fases: inicial (durante los primeros 10 minutos tras la inyección) y tardía (desde los 11 minutos hasta aproximadamente 60 minutos tras la inyección). Se piensa que la fase inicial es resultado de la estimulación directa de los nociceptores, mientras que la segunda o tardía corresponde a una fase de sensibilización en la que intervienen fenómenos inflamatorios según Hunskaar y Hole, 1987.⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾

La ventaja de este es que la respuesta puede ser contabilizada y es una medida de dolor que puede ser aliviada al utilizar analgésicos, se puede evaluar desde la posición en la que coloca la extremidad afectada, el trabajo activo en el cual el animal trata de aliviar el dolor al lamer la extremidad administrada con formalina o el parámetro reflejo de las sacudidas de la extremidad.⁽⁴²⁾⁽⁴¹⁾

El modelo de la formalina es ideal para el estudio de fármaco opioides, debido a que estos proveen analgesia para ambas fases. Aunque es más sensible la segunda fase, contrario a los analgésicos tipo Aine que solamente inhiben la segunda fase.⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾

16. MODELOS DE DOLOR AGUDO Y CRÓNICO

La utilización de los modelos de dolor se justifica para el ensayo de nuevos tratamientos farmacológicos para el alivio del dolor. Bajo el título de modelos de dolor agudo encuadramos fundamentalmente a los modelos que utilizan un estímulo físico o químico que tienen como objetivo determinar una latencia de respuesta por parte del animal ante dicho estímulo y tienen un desarrollo temporal breve. Entre

ellos tenemos el test de la placa caliente, el de retirada de la cola y el de inmersión de la cola en agua caliente que usan un estímulo térmico, el test de presión de la pata o de la cola en la rata que usan un estímulo mecánico; el test de estimulación eléctrica de la cola que usa un estímulo eléctrico, el test del ácido acético y el test de la formalina (valoración primera fase) que usan un estímulo químico. Es una forma de objetivar el umbral nociceptivo del animal, de manera que los parámetros determinados responden al esquema clásico del dolor como reflejo dentro de un marco fisiológico. Por ello, es posible que ofrezcan poca información sobre la efectividad de un fármaco en una situación patológica en la que se producen cambios en la forma de procesar la información nociceptiva, siendo así posible que las valoraciones que hacemos del umbral nociceptivo con estos modelos en las situaciones patológicas no sean comparables o vayan en la misma dirección que las realizadas en animal sano.⁽⁴³⁾

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DURACIÓN DEL ESTUDIO

La prueba piloto para la evaluación del efecto antiinflamatorio y la etapa experimental del efecto antiinflamatorio y efecto analgésico tuvo una duración de trece semanas, dicha investigación inicio en el mes de abril del 2018.

2. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La investigación relacionada a la planta, su acondicionamiento, estabilización, elaboración de los extractos, formulación de los geles y las suspensiones, fueron realizados en los laboratorios de investigación H-102 y H-203 y el estudio pre – clínico en animales de experimentación se realizó en el bioterio, ambos ambientes ubicados en el campus de la Universidad Católica de Santa María en el departamento de Arequipa.

3. MATERIALES

3.1. Unidades de estudio

3.1.1. Unidad Botánica

La muestra fue las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, procedente de la localidad de Pucará (Puno) a una altitud de 4500 msnm, en la Figura 6 se observa el crecimiento de la planta en roquedales.



Figura 6: Crecimiento de *Culcitium canescens* "Vira Vira" en roquedales

Fuente: Elaboración propia

Dicho material vegetal fue autenticado en el Herbarium Arequipense (HUSA), ubicado en la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. (Anexo 1)

3.1.2. Unidad Biológica

Como unidad biológica se utilizaron 54 ratas hembras de la especie *Rattus rattus* de la raza Wistar, variedad albina, aproximadamente 8 meses de edad, con un peso de 200 - 300 gramos, provenientes del bioterio situado en la Universidad Católica de Santa María.

Dichas unidades biológicas fueron sometidas a una adaptación con respecto a las condiciones ambientales (factores externos ambientales adecuados para realizar una óptima investigación) su alimentación fue en base a maíz blanco, trigo y agua en proporciones iguales y suficientes para que puedan alimentarse a voluntad propia.

La etapa piloto para determinar el efecto antiinflamatorio se trabajó con 6 animales de experimentación (ratas) sub-divididas en 3 subgrupos de dos ratas cada uno y la etapa experimental se trabajó con 20 animales de experimentación (ratas), sub-divididas en 4 grupos de cinco ratas respectivamente.

La etapa piloto para determinar el efecto analgésico se trabajó con 8 animales de experimentación (ratas) sub-divididas en 4 subgrupos de dos ratas cada uno y la etapa experimental se trabajó con 20 animales de experimentación (ratas), sub-divididas en 4 grupos de cinco ratas respectivamente.

Los animales de experimentación fueron sometidos a ayuno de 24 horas antes de las etapas pre-liminar (pilotos) y experimentales.

3.2. Material de laboratorio, equipos y reactivos

3.2.1. Material de vidrio

- ◉ Vasos de precipitado de 100 mL, 150 mL y 250 mL.

- ⊗ Termómetro de laboratorio.
- ⊗ Baguetas.
- ⊗ Cubas cromatográficas.
- ⊗ Fiolas de 500 mL y 1L.
- ⊗ Capilares sin heparina.
- ⊗ Probetas graduadas de 100 mL.
- ⊗ Pipetas graduadas de 1mL, 5 mL y 10mL.

3.2.2. Aparatos y equipos de laboratorio

- ⊗ Balanza analítica Ohaus Pioneer.
- ⊗ Equipo de Percolación (elaboración propia)
- ⊗ Equipo Rotavapor BUCHZ Switzerland R – 114.
- ⊗ Estufa Memmert 854 Shwabach – Germany.
- ⊗ Lámpara de luz UV CAMAG.
- ⊗ Pletismómetro Digital LE 7500.

3.2.3. Material Anexo

- ⊗ Cocina eléctrica.
- ⊗ Algodón.
- ⊗ Pabilo.
- ⊗ Cúter.
- ⊗ Espátulas.
- ⊗ Frascos de vidrio color ámbar.
- ⊗ Botellas transparentes de vidrio.
- ⊗ Equipo de Venoclisis.
- ⊗ Silicona líquida.
- ⊗ Corchos.
- ⊗ Guantes de Nitrilo.
- ⊗ Jaulas metálicas.
- ⊗ Jaulas de plástico transparentes

- ⊗ Picetas.
- ⊗ Soporte Universal.
- ⊗ Papel kraft.
- ⊗ Papel aluminio.
- ⊗ Olla metálica.
- ⊗ Mortero.
- ⊗ Láminas de sílica gel 60 F.
- ⊗ Jeringas de 1mL y 5mL.

3.2.4. Reactivos

- ⊗ Etanol 96% (DELTA QUIMICA)
- ⊗ Cloroformo (triclorometano) ACS (BAKER)
- ⊗ Éter de petróleo ACS (J.T.BAKER)
- ⊗ Agua destilada
- ⊗ Acetona (propanona) ACS (MERCK)
- ⊗ Ácido acético glacial Q.P. (MERCK)
- ⊗ Cloruro férrico ACS (MERCK)
- ⊗ Hexano ACS (BAKER)
- ⊗ Carragenina
- ⊗ Tritón
- ⊗ Cloruro de Sodio
- ⊗ Tween 20 (MERCK)
- ⊗ Tolueno ACS (BAKER)
- ⊗ Metanol ACS (BAKER)
- ⊗ Ácido sulfúrico ACS (MERCK)
- ⊗ Acetato de etilo ACS (BAKER)
- ⊗ Carboximetilcelulosa sódica (LABOCHINI)
- ⊗ Carbopol 940
- ⊗ Metilparabeno
- ⊗ Propilparabeno
- ⊗ Propilenglicol (DELTA QUIMICA)
- ⊗ Trietanolamina(BAKER)

o Formol 40%

4. MÉTODOS

4.1. Tratamiento de la unidad vegetal

Se procedió a la recolección de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” en el departamento de Puno (Pucará) dicha especie crece de manera silvestre en zonas rocosas, las cuales fueron recolectadas a mediados del mes de abril del presente año. Se realizó el adecuado transporte de la planta envueltas en bolsas de papel kraft a la ciudad de Arequipa. Se trató de recoger las plantas con mejor aspecto y madurez.

Luego se procedió a separar las hojas en buen estado, así como también a limpiar cada hoja sacudiéndola de forma suave y así eliminar cada residuo de tierra, luego se trozó cuidadosamente para que pueda manipularse.

Cabe mencionar que dichas hojas no presentaron evidencia de algún tipo de insectos, como se observa en la Figura 7.



Figura 7: Separación y limpieza de las hojas de *Culcitium canescens* "Vira Vira".

Fuente: Elaboración propia

Seguidamente se procedió a estabilizar las hojas, estas fueron colocadas sobre papel kraft, extendidas y separadas sobre las bandejas de acero de la estufa a una temperatura de 100 °C por tres minutos con el fin de conservar en la droga seca, las mismas propiedades de la planta fresca y de evitar transformaciones en el curso de la conservación, como se observa en la Figura 8, posteriormente las hojas fueron sometidas a una temperatura de 60 °C por un periodo de 48 horas con el fin de no afectar a los metabolitos presentes en el material vegetal.⁽²⁹⁾



Figura 8: Estabilización de las hojas de *Culcitium canescens* "Vira Vira".

Fuente: Elaboración propia

Finalmente se procedió a pulverizar las hojas desecadas en una licuadora, hasta lograr una trituración moderada y uniforme del material vegetal, de esta manera se incrementa la superficie de contacto con el solvente durante la extracción, como se observa en la Figura 9.



Figura 9: Proceso de pulverización de las hojas de *Culcitium canescens* "Vira Vira".

Fuente: Elaboración propia

5. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

5.1. Extracción con el equipo de percolación

o Fundamento:

Es un procedimiento que se realiza a temperatura ambiente. La droga se coloca en una columna y está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte superior de la columna, atraviesa toda la zona donde está la droga, va extrayendo los principios activos y por la parte inferior se recogen los líquidos extractivos que contiene dichos principios.⁽⁴⁴⁾ En la Figura 10 se observa el sistema de percolación.

Antes de llenar el percolador debe humedecerse la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento, a fin de facilitar la penetración del disolvente en las membranas celulares durante la percolación.⁽⁴⁴⁾

Es muy importante el período de tiempo en el que la droga permanece en contacto con el líquido extractivo (tiempo de extracción) y la relación existente entre droga y líquido extractivo (cantidad de disolvente).⁽⁴⁴⁾ En la percolación ocurren los procesos de lavado celular y de difusión celular, cuando la droga entra en contacto con el disolvente, se produce una difusión de los principios activos de la droga hacia el disolvente debido a que en la droga la concentración de principios activos es superior a la concentración del disolvente utilizado en la extracción. La difusión



Figura 10: Esquema del equipo de percolación.

se produce hasta alcanzar el equilibrio. Al renovar el disolvente se mantiene una diferencia de concentración de principios activos entre la droga y el disolvente, lo cual permite que se produzca la difusión celular pasiva. La percolación puede llegar a conseguir extracciones prácticamente completas de la droga, pero con un elevado consumo de disolvente.⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾

Procedimiento:

Se introdujeron 60 gramos de hojas secas trituradas de la muestra en un frasco ámbar de vidrio y luego se procedió a humedecerla con etanol de 96 ° presionando con una bagueta para que la droga quede compactada, posteriormente se colocó un papel filtro y encima canicas de vidrio, luego se añadió la suficiente cantidad de etanol para que esta quede a 2 cm por encima de la muestra y finalmente se dejó macerando por 24 horas.⁽⁴⁵⁾

Se instaló el equipo de percolación en un soporte de madera, luego se colocó una torunda de algodón en el pico del percolador y se introdujo la muestra macerada, teniendo presente que el etanol sea suficiente para que quede a 2cm por encima de la droga, como se observa en la Figura 11.



Figura 11: Equipo de percolación artesanal con muestra de las hojas de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Fuente: Elaboración propia

Seguidamente se procedió a soltar la llave del percolador para iniciar el goteo a una velocidad de 60 gotas por minuto. Al cabo de 1 hora y media se obtuvo 300 mL de percolado al 20% el cual se volvió a percolar agregando más cantidad de disolvente repitiendo el proceso anterior, obteniéndose un percolado de color verde característico, este percolado se envasó en una botella de vidrio color ámbar, se rotuló, se fechó y se almacenó en un lugar fresco y seco para su posterior uso y la elaboración de los geles y suspensiones.

5.2. Determinación del rendimiento de extracción

5.2.1. Método

Mediante el equipo de Rotavapor.

↻Fundamento

El porcentaje de rendimiento de extracción (%RE) se fundamenta a partir de la separación del solvente del principio activo donde se obtiene un extracto concentrado para ello se usó rotavapor con una temperatura adecuada hasta evaporación del solvente, donde se obtiene en el fondo del recipiente el principio activo concentrado.⁽⁴⁴⁾

↻Procedimiento

Se trabajó con los extractos etanólico, clorofórmico y éter de petróleo, una vez terminada la extracción por percolación, se colocó el extracto etanólico en un balón para su evaporación mediante el equipo rotavapor, seguidamente se sometieron a evaporación los extractos de cloroformo y éter de petróleo a baño María en un vaso precipitado previamente pesado. Posteriormente se procedió a enfriar y secar los vasos precipitados con los distintos extractos blandos y así poder registrar sus masas con el fin de calcular el porcentaje de rendimiento (% RE) mediante la fórmula que se observa en el Cuadro 4 y así calcular la dosis de los tratamientos. Finalmente se utilizaron los extractos blandos para realizar la etapa pre-liminar o piloto (extracto etanólico, extracto

clorofórmico y extracto éter de petróleo) y la etapa experimental (realizado con el extracto que presentó mejor efecto en la etapa pre-liminar).

Cuadro 4: Fórmula para hallar el porcentaje de rendimiento

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso extracto}}{\text{Peso planta seca}} \times 100$$

Prueba piloto

Esta etapa se realizó con la finalidad de obtener extractos de las hojas de *Culcitium canescens* “Vira Vira” con solventes de diferente polaridad y así poder determinar cuál de ellos presenta un mejor efecto antiinflamatorio.

Se usó etanol de como solvente polar, cloroformo medianamente polar y como solvente apolar el éter de petróleo.

6. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

6.1. Cromatografía en capa fina (CCF O TLC)

Fundamento

La separación de mezclas de moléculas mediante la cromatografía de capa fina se basa en el principio del reparto entre dos fases. Una cromatografía se realiza permitiendo que una mezcla de moléculas que interesa separar interaccione con un medio de soporte que se denomina fase estacionaria. La fase móvil que es inmiscible con la fase estacionaria sube por capilaridad a través de esta arrastrando a las moléculas de la muestra. Debido a que las distintas moléculas de la muestra tienen diferente coeficiente de reparto, la fase móvil arrastrará a los distintos componentes con diferente eficiencia, de tal forma que aquellos sustratos que tienen interacciones más fuertes con la fase móvil serán eluidos más rápidamente que los que interaccionan preferente con la fase estacionaria, el parámetro que se utiliza para comparar la eficiencia con que cada compuesto

es eluido es el desplazamiento relativo de la muestra respecto del solvente, R_f ⁽⁴⁶⁾
⁽⁴⁷⁾. En el Cuadro 5 se observa la fórmula para hallar el R_f en las placas
cromatográficas.

Cuadro 5: Fórmula para hallar el factor de retención

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto}}{\text{distancia recorrida por la fase móvil}}$$

• **Ventajas de la cromatografía:**

La técnica de cromatografía en capa fina produce una dispersión de las manchas y las colas de proporciones mucho menores que en la cromatografía sobre papel, debido a que el adsorbente posee mucho mayor poder. Las manchas individuales tienen mayor poder resolutivo, lo que hace que las determinaciones sean fáciles.

Los reactivos fuertes pueden usarse con fines de identificación, lo que no es posible en la de papel, siendo los gastos de disolventes mucho menores que en la cromatografía sobre papel.

Las placas de TLC (cromatografía de capa fina) se pueden calentar a temperaturas más altas sin ningún daño.

• **Revelado de las placas cromatográficas**

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 y 366 nm). El indicador absorbe la luz UV y emite luz visible. La presencia de un compuesto activo en el UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto. En el caso de compuestos que no absorben luz UV, la visualización (o revelado) del cromatograma requiere utilizar un agente revelador. Este tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados.⁽⁴⁸⁾

6.2. Procedimiento

6.2.1. Preparación de la fase móvil

Se mezclaron los solventes elegidos en la cuba cromatográfica de tal forma que el volumen de la mezcla no sobrepasó la línea de sembrado de la fase estacionaria, la cual fue 10 mL. Seguidamente se tapó la cuba cromatográfica y luego se dejó en reposo para que se sature el medio aproximadamente de 7 a 10 minutos.

6.2.2. Preparación de la placa cromatográfica

Se usó como fase estacionaria placas de sílica gel con soporte de aluminio, dichas placas tuvieron dimensiones de 10 x 3 cm luego se trazó cuidadosamente con un lápiz una línea aproximadamente a 1 cm del borde inferior (línea de sembrado) y otra a 1cm del borde superior. Seguidamente sobre la línea de sembrado, se procedió a sembrar con un capilar fino el extracto etanólico, realizando 10 siembras en el mismo punto. Dicha prueba se realizó por duplicado. Finalmente se dejó secar la placa sembrada a temperatura ambiente, para luego ser colocada en la cuba cromatográfica, en el Cuadro 6 se observan las distintas fases móviles y los reveladores utilizados para identificar algunos de los principales grupos de metabolitos secundarios.

Cuadro 6: Fases móviles y reveladores usados en las pruebas cromatográficas

Metabolitos	Fase Móvil	Revelador
Flavonoides	Acetato de etilo:Etanol:Agua (7:2:1)	Cloruro de aluminio 1 % en etanol
Taninos	Metanol:Agua (7:3) Acetato de Etilo:Metanol (8:2)	Cloruro férrico 5 % en etanol

	Acetato de etilo: Tolueno: Ácido fórmico (5.5:2.2:2.2)	
Alcaloides	Ácido acético:Metanol : Agua (7:1:2)	Reactivo de Dragendorff
Terpenos	Tolueno: Acetato de etilo (9.5:0.5)	Reactivo de Liebermann
General	Hexano:Acetona (8:2)	Reactivo de Vainillina – Ácido sulfúrico

Fuente: Elaboración propia

7. MÉTODOS BIOLÓGICOS

7.1. Etapas de ambientación y alimentación de los animales.

Los animales de experimentación fueron sometidos a un periodo de estandarización por 5 días previos a la realización del experimento, teniendo en cuenta las condiciones ambientales y alimentación las cuales consistieron en una mezcla de maíz, trigo, cebada y agua.

Luego se procedió a la formación de los grupos experimentales los cuales fueron distribuidos en forma aleatoria y codificados de igual manera, las cuales fueron marcadas con fucsina en lugares estratégicos del cuerpo, para luego ser distribuidas en sus respectivas jabsas.

Las condiciones fueron establecidas con la finalidad de reducir las variables que pudiesen marcar variabilidad en los resultados finales. Las ratas se mantuvieron en ayunas 24 horas antes de empezar el experimento, con libre acceso al agua.

7.2. Diseño Experimental

Se utilizaron 20 ratas las cuales fueron distribuidas al azar en 4 grupos, a todos los grupos se les hizo una medición inicial del volumen de la pata posterior derecha de las ratas (sin inducción de edema) usando el pletismómetro, el cual nos brindó el

peso basal, seguidamente se realizó la inducción del edema plantar con carragenina al 1 %.

Los 4 grupos consistieron: un grupo control negativo, que se le aplicó solo los excipientes del gel preparado; un grupo control positivo al cuál se le aplicó diclofenaco al 1 % en gel; un grupo experimental 1 al cuál se le aplicó un gel al 10 % de extracto blando etanólico de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” y un grupo experimental 2, al cual se le aplicó un gel al 5 % del extracto blando etanólico *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, seguidamente se midió el volumen del edema plantar cada hora durante un tiempo de 7 h y finalmente se realizó el análisis estadístico de los resultados.

8. PREPARACIÓN DEL GEL

Tomando en cuenta que el disolvente empleado para la elaboración del extracto fue el etanólico se desarrolló una formulación del gel que se observa en el Cuadro 7, se involucró al carbopol como agente gelificante y al agua destilada como líquido gelificado. Fue necesario, además, incorporar parabenos como preservantes antimicrobianos y unas gotas de trietanolamina para regular el pH a 6.5 – 7.

Cuadro 7: Formulación del gel al 5 y 10 % de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

INGREDIENTES	CANTIDADES	
	Gel de <i>Culcitium canescens</i> 5%	Gel de <i>Culcitium canescens</i> 10 %
METILPARABENO	0.40%	0.40%
PROPILPARABENO	0.20%	0.20 %
CARBOPOL	1%	1%
PROPILENGLICOL	10 mL	10 mL
EXTRACTO DE <i>Culcitium canescens</i> al 20 %	25 g	50 g
AGUA DESTILADA c.s.p	100 g	100 g
TRJETANOLAMINA c.s.p. PH 6.5 - 7		

Fuente: Elaboración propia

Primeramente se verificó la limpieza y sequedad de los materiales a utilizar, luego se pesaron los componentes involucrados para la preparación de los geles, se escogió el extracto con mayor actividad antiinflamatoria y se procedió a darle una forma farmacéutica. En un recipiente aparte se agregó el extracto de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” con 3mL de propilenglicol en agitación constante, en otro recipiente se agregaron los parabenos con los restantes 7mL de propilenglicol (humectante) y 40 mL de agua destilada y se agitó hasta alcanzar una homogenización completa, seguidamente se agregó carbopol poco a poco y luego se incorporó el extracto de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” con agitación constante.

Pasadas las 24 horas se añadió el agua destilada restante moviendo constantemente con una bagueta y luego se adicionó la trietanolamina gota a gota hasta alcanzar el pH indicado. Finalmente, el gel obtenido fue almacenado en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente y se rotuló.

9. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN CONDUCTORA

Para medir la inflamación en el equipo de pletismómetro se procedió a pesar 1 gramo de cloruro de sodio (0.1 %) en 1000mL de agua destilada, con el fin de evitar la formación del menisco en las paredes del depósito a esta solución se le agregó 15 gotas de tritón X-100 (tensioactivo no iónico) y se agitó continuamente hasta obtener una disolución total y homogénea, esta solución se colocó en el envase reservorio, ubicado en la parte superior del soporte, luego, se prendió el pletismómetro verificándose que la pantalla del mismo indique 0.00. Se abrió la llave que conecta el envase reservorio con los dos depósitos, el cual permitió la entrada de la solución conductora hasta la marca de la vasija volumétrica.

Se observó que el check solution midió 92 el cual se centraba dentro del rango (40-160) luego, se presionó el botón “zero” para indicar un volumen de inicio de 0 mL, como se observa en la Figura 12, seguidamente, se calibró el equipo introduciendo la pesa habitual dando un volumen de 3 mL en la vasija volumétrica y se presionó el

botón “calibration” se retiró el patrón (pesa) y se comprobó que el instrumento indique 0.00, como se observa en la Figura 13.

Efectuado este proceso, el pletismómetro estuvo listo para medir las variaciones de volumen del edema plantar en la pata de los animales de experimentación.

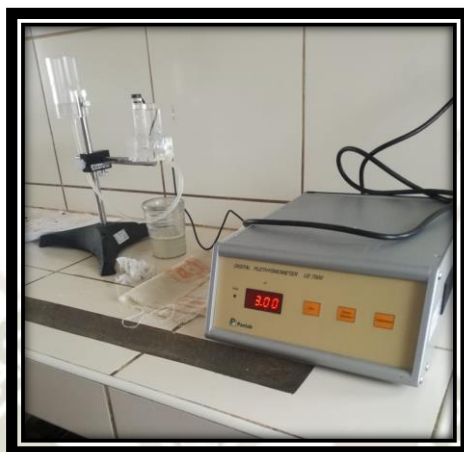


Figura 12: Equipo de pletismómetro

Fuente: Elaboración propia



Figura 13: Calibración del equipo de pletismómetro

Fuente: Elaboración propia

10.INDUCCIÓN DEL EDEMA PLANTAR POR CARRAGENINA

La solución de carragenina disuelta en suero fisiológico fue inyectada en la superficie plantar de la pata de las ratas, induciendo a una inflamación aguda de la pata, la cual

llegó a su máximo nivel 3 h después de la inyección. Este modelo se ha utilizado durante mucho tiempo para evaluar las propiedades antiinflamatorias de diferentes extractos de plantas que exhiben propiedades antiinflamatorias. La inflamación inducida por la carragenina al 1%, originalmente descrita por Winter C et al. en 1962, es aguda, no inmune, adecuadamente investigada y altamente reproducible.⁽⁴⁹⁾

El procedimiento utilizado para inducir el edema plantar por carragenina, consistió en una limpieza de la zona plantar de la pata posterior derecha de la rata. Posteriormente se utilizó una jeringa de tuberculina (capacidad de 1 mL) y se administró por vía subcutánea 0.1 mL de la solución al 1 % de carragenina en suero fisiológico ⁽⁵⁰⁾, como se observa en la Figura 14.



Figura 14: Aplicación de carragenina al 1 % a los animales de experimentación

Fuente: Elaboración propia

11. MEDICIÓN DEL EDEMA PLANTAR

La medición del edema plantar se realizó utilizando un pletismómetro digital el cual es un instrumento que permitió medir los cambios en el volumen plantar (mL). La carragenina induce inflamación, por lo que hay un aumento de volumen y al investigar un agente que puede presentar actividad antiinflamatoria, este debería reducir el edema, dándose una disminución de volumen. Estos cambios de volumen son registrados por el pletismómetro el cual consta de dos depósitos (vasija

volumétrica y sensora) interconectados y que son llenados con una solución conductora. Además, la vasija sensora presenta dos electrodos de platino.⁽⁵⁰⁾

La pata del animal de experimentación se sumerge en la solución conductora de la vasija volumétrica, provocándose un cambio en su volumen, lo que induce a una alteración de la conductancia entre los dos electrodos de platino. El pletismómetro presenta un detector que reconoce este cambio de conductividad y genera una señal de salida a la pantalla digital que indica el desplazamiento de volumen con una resolución de 0.01 mL. Por lo tanto, de acuerdo al principio de Arquímedes, el volumen de un cuerpo sumergido (pata del animal) es igual al volumen de fluido desplazado, teniendo en cuenta que a mayor inflamación (evidenciada por la formación del edema) mayor será el volumen desplazado.⁽⁵¹⁾

12. PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES

12.1 Cálculo de la dosis de los tratamientos

Se determinó mediante los siguientes datos:

- ◉ La población tradicionalmente utiliza una dosis analgésica de 3 a 5 g de las hojas seca para una persona de 70 kg, lo que se extrapola a los animales de experimentación. Anexo 8 y 9.
- ◉ Rendimiento del extracto.
- ◉ Peso de los animales de experimentación (ratas).
- ◉ En la etapa piloto para determinar el efecto analgésico se trabajó con 8 animales de experimentación (ratas). Se trabajó con dos soluciones de formalina al 2 % y 3 % el cual nos permitió elegir cuál de las dos se consideraban óptimas para el trabajo experimental. Se utilizaron dos suspensiones con diferente concentración.

12.2. Formulación de las suspensiones de los extractos blandos de *Culcitium canescens* “Vira Vira”

Se formularon suspensiones con el objetivo de distribuir el extracto etanólico en un vehículo, como se observa en el Cuadro 8.

Cuadro 8: Suspensiones del extracto de *Culcitium canescens* "Vira Vira", grupo control negativo, grupo control positivo (tramadol) y suspensiones de extracto etanólico al 0.08 % p/v y 0.13 % p/v

Rp 1: Suspensión de extracto etanólico 0.08% p/v	
Extracto de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	24.27mg
Carboximetilcelulosa	0.15 g
Tween 20 (tensoactivo)	0.5 mL
Agua destilada (vehículo) c.s.p.	30 mL

Rp 2: Suspensión de extracto etanólico 0.13% p/v	
Extracto de <i>Culcitium canescens</i> "Vira Vira"	40.45mg
Carboximetilcelulosa	0.15 g
Tween 20 (tensoactivo)	0.5 mL
Agua destilada (vehículo) c.s.p.	30 mL

Rp 3: Suspensión tramadol 0.03% p/v	
Tramadol	8.57mg
Carboximetilcelulosa	0.15 g
Tween 20 (tensoactivo)	0.5 mL
Agua destilada (vehículo) c.s.p.	30 mL

Formulación: Grupo control (vehículo)	
Carboximetilcelulosa	0.15 g
Tween 20 (tensoactivo)	0.5 mL
Agua destilada (vehículo) c.s.p.	30 mL

Procedimiento:

Para la preparación de las suspensiones se pesaron los extractos etanólicos y se mezclaron enérgicamente con tween 20 (humectante), luego se agregó 10 ml de agua destilada en constante agitación. En otro vaso precipitado se pesó carboximetilcelulosa (viscosante) y se agregó 10 ml de agua destilada (líquido dispersante), se dejó en reposo hasta su hidratación completa, finalmente se mezclaron ambos contenidos y se enrazó hasta 30 ml con agua destilada, manteniéndose en constante agitación. Las suspensiones de Vira Vira al 0.08% p/v, 0.13 %, p/v y la suspensión de tramadol 0.03% p/v se administraron por vía oral 2.5 ml mediante el uso de una cánula 30 minutos antes de la administración de la formalina al 2 %, por último, se procedió a la observación de su comportamiento por 60 minutos.

Distribución de la muestra

Fueron utilizados 20 animales de experimentación, distribuidos aleatoriamente en grupos de 4 (5 animales de experimentación en cada grupo), como se observa en la Figura 15.

- **Grupo control:** Fueron asignados 5 animales de experimentación a los cuales se les administró el vehículo y los excipientes de las suspensiones por vía oral.
- **Grupo experimental 1:** Compuesto por 5 animales de experimentación, se administró por vía oral la suspensión del extracto etanólico de 8 mg/Kg.

- **Grupo experimental 2:** Compuesto por 5 animales de experimentación, se administró por vía oral la suspensión del extracto etanólico de 13 mg/Kg.
- **Grupo experimental 3:** Compuesto por 5 animales de experimentación, se administró por vía oral la suspensión de tramadol de 3 mg/Kg.



Figura 15: Presentación de los 4 grupos usados en la prueba experimental

Fuente: Elaboración propia

13. MODELO DE LA FORMALINA

Se utilizó el test de la formalina diseñado por Dubuisson y Dennis (1977), siguiendo las modificaciones realizadas por Abbott y cols. (1995) y (Hunskaar y Hole, 1987).

13.1. Unidad biológica

Se utilizaron ratas hembras Wistar con un peso de 200 a 300 gramos, las cuales estuvieron libre acceso al alimento y agua hasta el momento del experimento, con ciclos de luz – oscuridad de 12 x 12 horas, todos los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos éticos para la investigación del dolor en animales de experimentación.⁽⁴³⁾

13.2. Preparación de la solución de formalina al 2 %

- ◉ Se utilizó formol al 40 %
- ◉ Utilizando la fórmula de la ecuación de dilución se halló el volumen necesario de formol a medir, el cual se diluyó con agua destilada.

13.3. Administración de la formalina

Se administraron 50 μ L (0.05 mL) por vía subcutánea con formalina al 2 % en la zona plantar de la pata posterior de la rata. Los animales se colocaron en envases de plástico transparentes como se observan en la Figura 16 y se observaron las conductas nociceptivas, se grabaron durante el periodo de un 1 minuto cada 5 minutos por 1 hora, las conductas nociceptivas contabilizadas fueron las sacudidas de la extremidad administrada. Previamente las ratas fueron ambientadas durante 30 minutos antes de cada experimento (para permitirle a la rata acostumbrarse al nuevo ambiente)⁽⁵²⁾. Finalmente, las ratas fueron observadas después de la administración de la formalina durante 60 minutos, el número de sacudidas de la pata fue cuantificado cada 5 minutos, considerándose como comportamiento de sacudida de la pata todo movimiento no asociado a la locomoción, variando desde una sacudida discreta o contracción de la musculatura del muslo del animal hasta el movimiento más vigoroso de la pata, las sacudidas eran de fácil cuantificación.



Figura 16: Colocación de las ratas en envases de plástico transparentes para facilitar la observación de las conductas nociceptivas

Fuente: Elaboración propia

13.4. Administración oral de las suspensiones del extracto etanólico *Culcitium canescens* “Vira Vira”

Se utilizaron las suspensiones de 0.08 % p/v, 0.13 % p/v y 0.03% p/v de tramadol las cuales fueron administradas por vía oral a las ratas 30 minutos antes de la

inyección de la formalina al 2%, por último, se procedió a la observación de su comportamiento por 60 minutos.

14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron ordenados en una matriz de sistematización, para después ser procesados mediante el software SPSS 20.0, para lo cual se hizo uso de las siguientes pruebas estadísticas:

14.1. Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza sirve para comparar varias medias, el ANOVA, es utilizado para comparar varios grupos a la vez y ver si existen diferencias significativas entre ellos.⁽⁵³⁾

Si al realizar la prueba se obtiene una significancia (probabilidad) baja, es decir, menor a 0.05 se rechaza la hipótesis nula que asume que los grupos no difieren entre si y se acepta la hipótesis estadística de investigación que supone que los grupos difieren entre sí (Hipótesis alternativa).⁽⁵³⁾

14.2. Prueba de comparación múltiple de tukey (HSD).

La prueba de Tukey sirve para probar todas las diferencias entre medias de grupos en una misma experiencia siempre y cuando el número de repeticiones sea constante en todos los grupos.⁽⁵⁴⁾

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antiinflamatorio de un gel y determinar el efecto analgésico de una suspensión dichas elaboraciones a base del extracto etanólico de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.), conocida comúnmente como Vira Vira. Además, se identificó los metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina.

1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA Y OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Como se expuso en el acápite anterior se procedió a la recolección de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, en la localidad de Pucará (Puno) en el mes de abril en horas de la mañana, obteniéndose aproximadamente 2 kilos de material fresco, la información geográfica de su hábitad y clasificación taxonómica se observa en el Cuadro 9 y 10. Se seleccionó el material vegetal sin daños en su estructura como se muestra en la Figura 17 y luego se procedió a estabilización en estufa a 100 °C por tres minutos.

2. INFORMACIÓN GEOGRÁFICA

Cuadro 9: Hábitat de *Culcitium canescens* " Vira Vira"

<i>País</i>	<i>Perú</i>
<i>Departamento</i>	<i>Puno</i>
<i>Municipio</i>	<i>Lampa</i>
<i>Localidad</i>	<i>Pucará</i>
<i>Altitud Mínima</i>	<i>3900 msm</i>
<i>Altitud Máxima</i>	<i>4500msm</i>

Fuente: Elaboración propia

3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Fue identificado y clasificado en el Herbarium Arequipense (HUSA).

Cuadro 10: Clasificación taxonómica de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsidae</i>
Subclase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Subfamilia	<i>Asteroideae</i>
Genero	<i>Culcitium</i>
Especie	<i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira"

Fuente: Blgo. Leoncio Mariño Herrera (HUSA)



Figura 17: Separación y limpieza de las hojas de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Fuente: Elaboración propia

Posteriormente se procedió a su desecación debido a que eran hojas tomentosas, procedimiento que también se realizó en estufa a una temperatura de 60 °C con el fin de que el material vegetal se encuentre completamente seco, luego fueron trituradas y colocadas en el equipo de percolación, para la extracción de la mayor cantidad de metabolitos secundarios se utilizaron tres solventes: etanol, cloroformo y éter de petróleo, hasta obtener como resultado final 300 ml de extracto al 20 % de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.

En el Cuadro 11,12 y 13 se detallan las propiedades organolépticas de cada uno de los extractos obtenidos.

Cuadro 11: Características del extracto etanólico de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

CARACTERÍSTICA	EXTRACTO POR PERCOLACIÓN
DISOLVENTE	ETANOL
COLOR	VERDE OSCURO
ASPECTO	LÍMPIDO
OLOR	CARACTERÍSTICO DE <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 12: Características del extracto clorofórmico de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

CARACTERÍSTICA	EXTRACTO POR PERCOLACIÓN
DISOLVENTE	CLOROFORMO
COLOR	AMARILLO VERDOSO
ASPECTO	LÍMPIDO
OLOR	CARACTERÍSTICO DE <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 13: Características del extracto éter de petróleo de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

CARACTERISTICA	EXTRACTO POR PERCOLACIÓN
DISOLVENTE	ÉTER DE PETRÓLEO
COLOR	AMARILLO CAFÉ
ASPECTO	LÍMPIDO
OLOR	CARACTERÍSTICO DE <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira".

Fuente: Elaboración propia

4. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS BLANDOS

Para determinar el porcentaje de rendimiento de los diferentes extractos, se pesó 60 g de las hojas *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira", estabilizado, desecado y triturado, haciendo uso del método continuo de Percolación para extraer los complejos activos, con solventes de diferentes polaridades por 24 horas utilizando 500 mL de cada disolvente y se recolectó 300 mL del extracto etanólico y 100 mL aproximadamente de los extractos cloroformo y éter de petróleo con un mismo tiempo de extracción, luego se concentró el extracto etanólico en un balón para su evaporación mediante el equipo de rotavapor a una temperatura adecuada, obteniéndose en el fondo del recipiente el principio activo. Se traspasó el extracto clorofórmico y el extracto de éter de petróleo a un vaso precipitado previamente lavado, secado y pesado, se sometió a baño maría, bajo la campana eliminando el solvente en su totalidad, hasta no detectar el olor a solvente.

Seguidamente se procedió a enfriar y secar los vasos precipitados con los distintos extractos blandos, para posteriormente pesarlos hasta que presenten peso constante y proceder a registrar sus masas y calcular el porcentaje de rendimiento (% RE).

Finalmente, los extractos blandos se utilizaron para realizar la etapa pre-liminar o piloto (extracto etanólico, extracto clorofórmico y extracto éter de petróleo) y etapa experimental (realizado con el extracto que presentó mejor efecto en la etapa pre-liminar).

En el Cuadro 14, se observa que el extracto etanólico presento un mayor porcentaje de rendimiento de 18.89%, extracto clorofórmico 1.32% y por último con éter de petróleo un 0.36% de rendimiento.

Cuadro 14: Porcentajes de rendimiento de los extractos de las hojas de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Solvente	% de rendimiento
Etanol	18.89
Cloroformo	1.32
Éter de petróleo	0.36

Fuente: Elaboración propia

El extracto blando obtenido con etanol (solvente polar), tuvo un mayor porcentaje de rendimiento, por su capacidad de solubilizar mayor cantidad de compuestos.

5. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.

Para la realización de la cromatografía en capa fina, se utilizaron como fase estacionaria placas de sílica gel G-60. Se procedió conforme la metodología descrita en el capítulo anterior, trabajándose para la detección de terpenos, flavonoides, taninos y alcaloides. Esta detección fue realizada para el extracto etanólico de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira". En el cuadro 15 se muestra un resumen de las diferentes fases móviles y reveladores usados, así como también sus respectivos

Cuadro 15: Cromatografía de capa fina, resultados del extracto etanólico de las hojas de *Culcitium canescens* " Vira Vira"

Metabolitos	Fase Móvil	Revelador	Resultado
Flavonoides	Acetato de etilo:Etanol:Agua (7:2:1)	Cloruro de aluminio 1 % en etanol	Positivo
Taninos	Metanol:Agua (7:3) Acetato de Etilo:Metanol	Cloruro férrico 5 % en etanol	

	(8:2) Acetato de etilo: Tolueno: Ácido fórmico (5.5:2.2:2.2)		Negativo
Alcaloides	Ácido acético: Metanol : Agua (7:1:2)	Reactivo de Dragendorff	Positivo
Terpenos	Tolueno: Acetato de etilo (7:3)	Reactivo de Liebermann	Positivo
General	Hexano: Acetona (8:2)	Reactivo de Vainillina – Ácido sulfúrico	Positivo

Fuente: Elaboración propia

5.1. Corrida General

Dicho análisis se realizó con la finalidad de determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios tales como terpenos, flavonoides y alcaloides en el extracto de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.

Para el desarrollo de esta corrida se empleó la fase móvil n-hexano, acetona (8:2) en donde se evidenciaron bandas de colores a simple vista y también al ser expuestas a luz UV en una longitud de onda de 366nm, lo cual nos indicaría la presencia de dichos grupos.

La marcha fitoquímica realizada al extracto blando del *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” evidencia mayor cantidad de terpenos, alcaloides y flavonoides con resultados negativos para taninos, como se observa en el Cuadro 15, lo cual concuerda con lo reportado por Chilquillo-Cervantes (2017) en su trabajo de investigación de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrecasónimo de *Culcitium canescens* Humb. & Bonpl. encontraron que en el extracto hidroalcohólico de “huira-huira” presenta alcaloides, triterpenos, saponinas y flavonoides de los cuales se propusieron los metabolitos de: isoflavonas y flavonas o flavonoles.⁽⁴⁾

Asimismo Okuyama E. et al. (1994) determinaron la presencia de metabolitos secundarios como cacalonol, dehidrocacalohastina y cacalohastina (compuestos sesquiterpenicos) en un extracto de metanólico de *Culcitium canescens* “Huira-Huira”.⁽⁵⁾

Se sabe que los flavonoides, alcaloides y terpenos tienen propiedades antioxidantes, antidiabéticas, anticancerígenas, antimutagénicas, antiinflamatorias y analgésicas.⁽⁵⁵⁾⁽⁵⁶⁾

En la Figura 18 se detecta en luz UV 254 y 366 nm la coloración marrón que podría evidenciar la presencia de sesquiterpenos con Rf de 0.54 y 0.37, verdes y azul para terpenos con Rf de 0.84 , 0.81, 0.78, 0.70 y 0.45 respectivamente y amarillo para flavonoides.⁽⁵⁷⁾

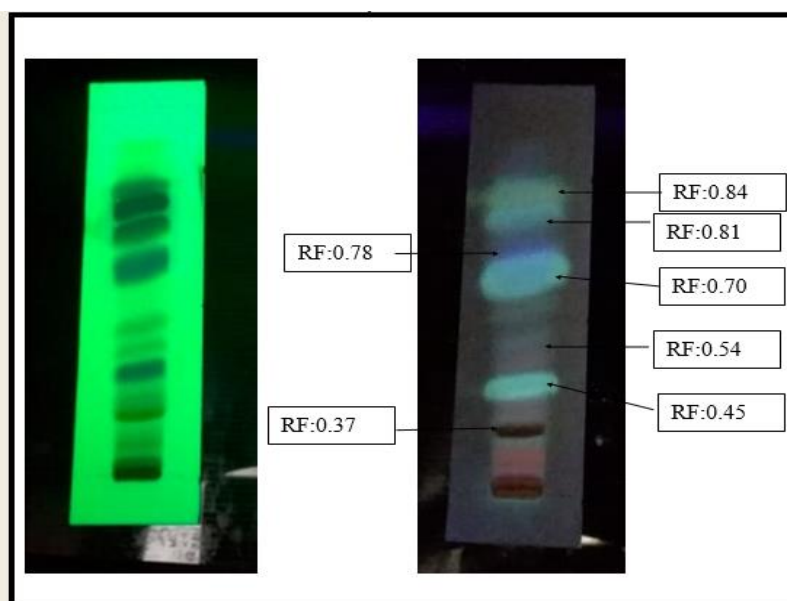


Figura 18: Análisis cromatográfico - corrida general del extracto etanólico de *Culcitium canescens* “Vira Vira”

Fuente: Elaboración propia

5.2. Determinación de flavonoides

Para el desarrollo de esta corrida se empleó la fase móvil de acetato de etilo, etanol, agua (7:2:1), se dejó correr la fase móvil a través de la placa cromatográfica. Una vez terminada la corrida se procedió a la observación de bandas desarrolladas

evidenciándose a simple vista y a luz UV a 366 nm manchas amarillas⁽⁵⁸⁾, como se observa en la Figura 19, fluorescencia amarilla con un Rf de 0.83⁽⁵⁷⁾

En general, a los flavonoides se les ha atribuido una gran diversidad de efectos terapéuticos, entre ellos la capacidad antimicrobiana y antiinflamatoria (Murphy, 1999; Narayama et al., 2001).⁽⁵⁹⁾

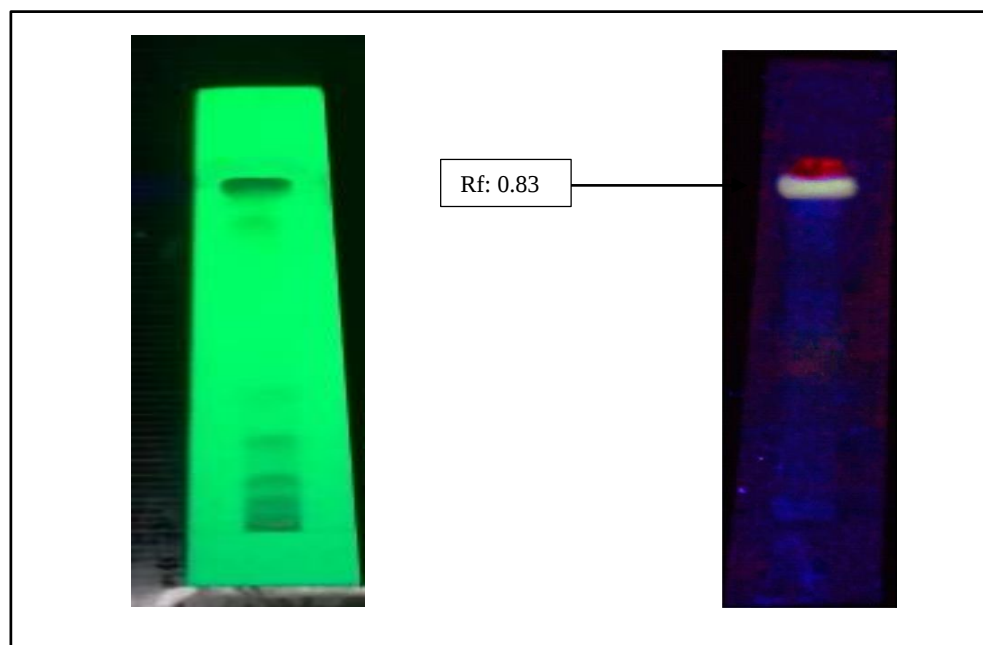


Figura 19: Análisis cromatográfico - flavonoides del extracto etanólico de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Fuente: Elaboración propia

5.3. Determinación de terpenos

La fase móvil empleada fue tolueno, acetato de etilo (7:3), se dejó correr la fase móvil a través de la placa cromatográfica.⁽⁵⁸⁾

La identificación fue positiva, por la observación de mancha azul verdosas y cafés⁽⁵⁷⁾ con Rf de 0.83, 0.70, 0.79, 0.65 y 0.48 como se observa en la Figura 20. El revelado se realizó mediante el rocío del spray con reactivo de Liebermann Burchard. Lo que evidencia la presencia de terpenos en el extracto *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira".

Desde el punto de vista farmacéutico, los grupos de principios activos de naturaleza terpénica más interesantes son: monoterpenos y sesquiterpenos. Sus principales propiedades son espasmolíticas, antibacterianas, sedativas. Presentan también actividad analgésica y antiinflamatoria, entre otras.⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾

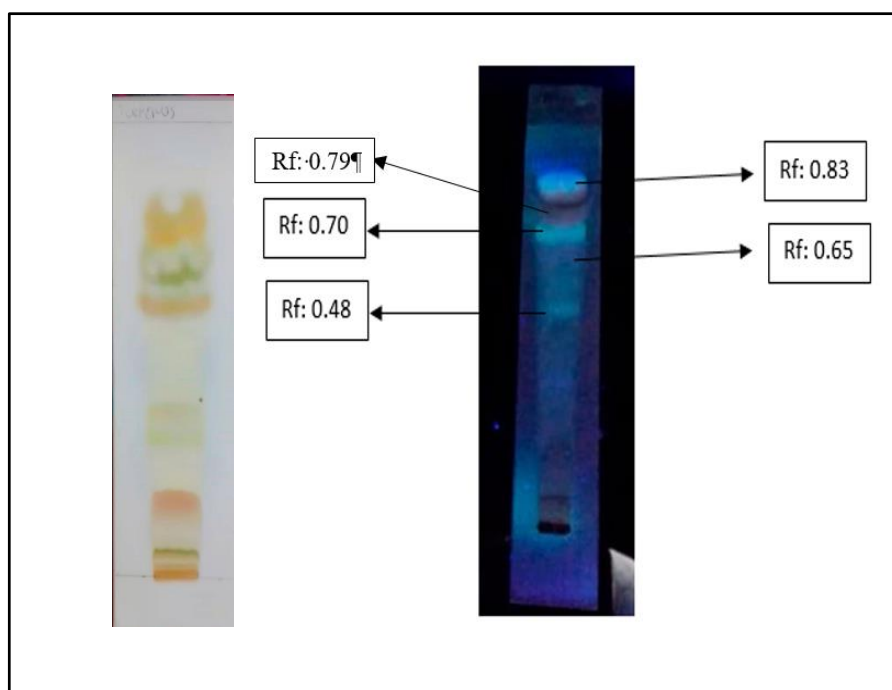


Figura 20: Análisis cromatográfico - terpenos del extracto de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Fuente: Elaboración propia

5.4. Determinación de alcaloides

La fase móvil empleada fue ácido acético, metanol, agua (7:1:2) se dejó correr la fase móvil a través de la placa cromatográfica.⁽⁵⁸⁾

Una vez terminada la corrida, utilizando como revelador el reactivo de Dragendorff, se desarrollaron bandas de color anaranjado rojizo lo cual indicaría la presencia de alcaloides con Rf de 0.91, 0.81, 0.77 y 0.43⁽⁵⁷⁾ en el extracto de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira"⁽⁴⁷⁾ como se observan en la Figura 21.

Los alcaloides son muy usados en medicina para tratar problemas mentales y calmar el dolor (Dewick, 2009).⁽⁵⁹⁾

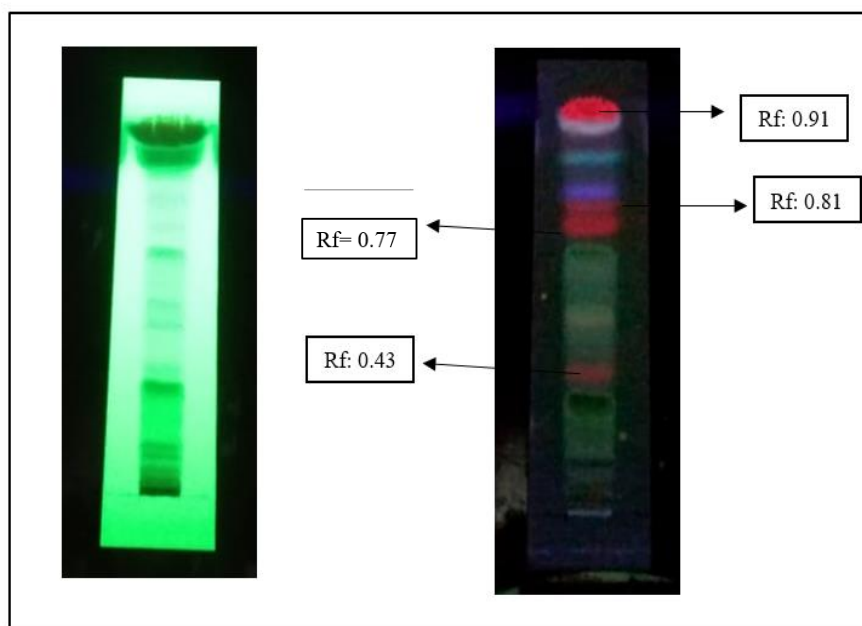


Figura 21: Análisis cromatográfico de alcaloides del extracto de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Fuente: Elaboración propia

5.5. Detección de saponinas

El extracto (50 mg) se diluyó con agua destilada y se completó hasta 20 mL. La suspensión se agitó en una probeta durante 15 min. Una capa de espuma mayor a dos centímetros indica la presencia de saponinas.

Este ensayo evidenció presencia de saponinas, lo cual es contrastable por lo publicado por Fontan ⁽⁶¹⁾ donde muestra una lista variada de familias con sus respectivos géneros ricos en compuestos saponínicos, dentro de la cual está nuestro género estudiado.

Sus propiedades farmacológicas son variadas entre ellas, antiinflamatorias, diuréticos, expectorantes, antitusivas, cicatrizantes, entre otras.⁽⁶²⁾

6. PRUEBA PILOTO

Con la finalidad de evaluar que extracto presenta mejor efecto antiinflamatorio se realizó una prueba piloto empleando extractos con solventes de diferente polaridad; etanol – polar, cloroformo – medianamente polar y éter de petróleo – apolar.

Esta prueba piloto consistió en la preparación de un extracto tópico al 5 % de los tres disolventes con diferente polaridad.

Para esta prueba se emplearon 6 ratas distribuidas en 3 grupos a su vez subdivididos en sub-grupos de 2 ratas, de manera aleatoria, cada grupo correspondientes a los diferentes extractos, etanólico, clorofórmico, éter de petróleo. En el Cuadro 16 se muestran los volúmenes medidos en el equipo pletismómetro digital durante la prueba piloto.

Cuadro 16: Volúmenes del edema plantar a diferentes tiempos luego de la inducción del edema y aplicación de los extractos blandos de *Culcitium canescens* "Vira Vira"

Extracto al 5 %	N ° de Rata	Volúmenes (mL) del edema plantar a diferentes tiempos							
		0-hr	1-hr	2-hr	3-hr	4-hr	5-hr	6-hr	7-hr
Etanol	1	0.72	1.19	1.27	1.31	1.21	1.18	1.1	1.08
	2	0.85	1.31	1.36	1.38	1.24	1.19	1.13	1.1
cloroformo	3	0.79	1.21	1.3	1.36	1.34	1.33	1.31	1.3
	4	0.73	1.17	1.25	1.31	1.29	1.28	1.27	1.26
Éter de petróleo	5	0.8	1.23	1.27	1.33	1.32	1.32	1.31	1.31
	6	0.65	1.01	1.12	1.24	1.23	1.22	1.22	1.22

Fuente: Elaboración propia

Con los volúmenes inflamatorios obtenidos se evidencia que en todos los grupos se inicia con un volumen basal, al aplicarle la carragenina al 1% fue aumentando hasta las tres horas a partir de la cual se evidencia cambios en el volumen de las patas de las ratas, como se observa en la Figura 22.

Una vez obtenidos los resultados de la prueba piloto se procedió a ejecutar la prueba experimental con el extracto etanólico de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira" ya que este presentó mejor efecto antiinflamatorio, haciendo uso de concentraciones diferentes.

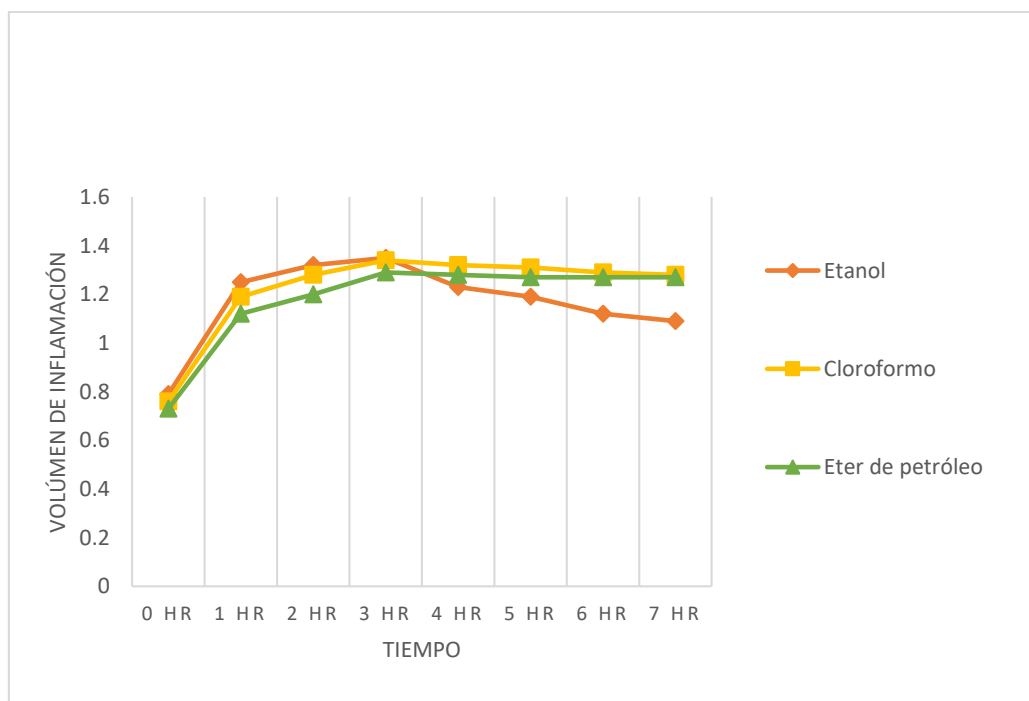


Figura 22: Prueba piloto de los extractos etanólico, clorofórmico y éter de petróleo de *Culcitium canescens* sobre volumen de inflamación

Cuadro 17: Resultados del volumen inflamatorio de la prueba piloto

Extracto	Basal	Carragenina	Extracto 5% 4 horas
Etanol	0.79	1.35	1.09
Cloroformo	0.76	1.34	1.28
Éter de petróleo	0.73	1.29	1.27

Fuente: Elaboración propia

En la Cuadro 17, el extracto etanólico es el que da lugar a la mayor reducción del volumen inflamatorio con un promedio de 1.09 a las 4 horas, siendo mejor que el cloroformo y éter de petróleo que alcanzaron un promedio de 1.28 y 1.27 en su volumen respectivamente, por lo que se decidió utilizar el extracto etanólico para la formulación del gel y la evaluación del efecto propiamente dicho.

En el Cuadro 18 se detallan las propiedades organolépticas de cada uno de los geles preparados y del gel diclofenaco al 1 %.

Cuadro 18: Descripción organoléptica del gel base, gel de *Culcitium canescens* y gel diclofenaco 1 %

Descripción	Gel al 10 % y 5%	Gel diclofenaco 1 %	Gel base
Olor	Característico de la planta	Sugeneris	Sugeneris
Color	Verdoso	blanco	Transparente
Consistencia	Semisólido	Semisólido	Semisólido

Fuente: Elaboración propia

7. ETAPA EXPERIMENTAL EVALUACIÓN DEL EFECTO

ANTIINFLAMATORIO

En el presente trabajo una vez obtenido el extracto se le dio una forma farmacéutica tópica para evaluar el efecto antiinflamatorio, de acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba piloto, se determinó que el extracto blando de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” etanólico, tenía mejor efecto antiinflamatorio, posteriormente se realizó la prueba definitiva utilizando el extracto etanólico en un preparado de gel al 5 % y 10 %, comparándolos con un grupo control con gel base y un grupo de diclofenaco gel 1 %.

7.1. Determinación del porcentaje antiinflamatorio

Como se ha mencionado en el capítulo anterior se trabajó con 4 grupos de 5 ratas cada uno a las cuales se les indujo un edema plantar, como se puede observar en el cuadro 19, los porcentajes de inflamación de los cinco grupos experimentales, calculados a partir de las unidades en mililitros, obtenidos mediante el equipo pletismómetro digital. El porcentaje de inflamación fue calculado con la fórmula del Anexo 06.

Dicho porcentaje de inflamación fue calculado una hora después de administrar la solución de carragenina al 1 %, hasta siete horas después. Los tratamientos con gel a base de extracto blando de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, grupo control y grupo diclofenaco 1% fueron administrados a la tercera hora después de administrar solución de carragenina al 1%, con los resultados obtenidos

se realizaron las pruebas estadísticas de ANOVA y Test de Tukey para confirmar que dichos datos sean estadísticamente significativos.

Según el porcentaje de inflamación hallado se observó que pasadas las 7 horas el gel “Vira Vira” al 10 % mostró una mayor disminución de la inflamación con un promedio de 28.87%, seguido gel diclofenaco al 1 % con un promedio de 36.1%, seguido gel “Vira Vira” al 5 % 50.71%, finalmente como control negativo con un promedio de 71.43%, como se muestra en el Cuadro 19.

Cuadro 19: Porcentaje de inflamación del grupo control negativo, control positivo (gel diclofenaco 1 %) y gel al 5 % y 10 % de los extractos blandos de etanol de las hojas de *Culcitium canescens* "Vira Vira", en la etapa experimental

GRUPOS	N° RA TA	0-hr %	1-hr %	2-hr %	3-hr % (*)	4-hr %	5-hr %	6-hr %	7-hr %
CONTROL GEL BASE	1	0	46.34	58.54	62.20	63.41	63.41	64.63	64.63
	2	0	56.79	62.96	71.60	72.84	71.60	71.60	70.37
	3	0	46.43	52.38	63.09	64.29	64.29	61.91	61.91
	4	0	62.5	67.5	75.00	77.50	81.25	81.25	80.00
	5	0	58.02	65.43	76.54	79.01	81.48	80.25	80.25
DICLOFENACO 1 %	6	0	43.90	57.32	60.98	50.00	30.49	26.83	24.39
	7	0	51.19	61.90	72.62	63.09	45.24	41.67	39.29
	8	0	46.84	58.23	64.56	53.16	43.04	40.51	39.24
	9	0	50.59	63.53	69.41	58.82	42.35	40.00	38.82
	10	0	46.25	60.00	63.75	52.50	40.00	38.75	38.75
GEL VIRA VIRA AL 10 %	11	0	49.32	61.64	68.49	58.90	38.36	26.03	24.66
	12	0	50.67	61.33	69.33	60.00	44.00	36.00	30.67
	13	0	46.25	61.25	66.25	61.25	42.50	36.25	30.00
	14	0	46.34	57.32	64.63	56.10	41.46	34.15	29.27
	15	0	47.62	57.14	64.29	54.76	36.90	33.33	29.76

GEL VIRA VIRA AL 5 %	16	0	54.05	67.57	78.38	68.92	60.81	56.76	51.35
	17	0	49.37	63.29	73.42	65.82	59.49	54.43	50.63
	18	0	51.85	62.96	74.07	65.43	58.02	54.32	50.62
	19	0	51.81	62.65	72.29	65.06	56.63	51.81	48.19
	20	0	54.17	68.06	79.17	69.44	62.50	56.94	52.78

Fuente: Elaboración propia

(*) Nos indica la hora en que se les aplicó los geles del extracto *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” a los animales de experimentación.

Se realizó el grafico comparativo de los diferentes tratamientos donde nos muestra que una hora después de recibir el tratamiento observamos un mayor efecto antiinflamatorio en el grupo de diclofenaco 1 % y el grupo con gel al 10% del extracto etanólico de Vira Vira. El tratamiento con gel al 10% del extracto de Vira Vira es el que produce una mayor disminución del volumen inflamatorio, disminuyendo eficazmente a la hora de aplicado el tratamiento para luego producirse un descenso del volumen más gradual hasta las 4 horas que llega a un promedio de 1.087 en el volumen inflamatorio, en cambio con el diclofenaco 1% se llega a un promedio de 1.142 en su volumen, como se observa en la Figura 23.

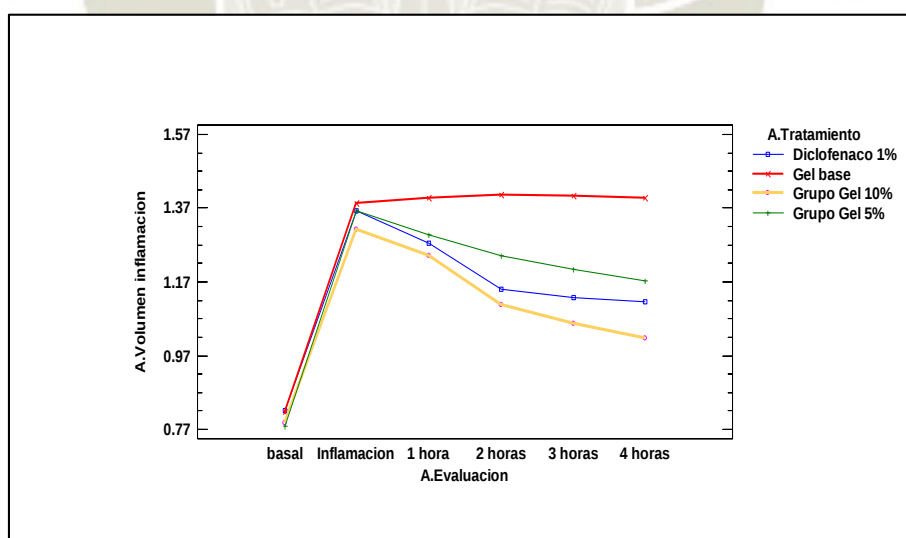


Figura 23: Interacción de volumen inflamatorio por tratamiento y tiempo

Fuente: Elaboración propia

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO INFERENCIAL DE ANOVA Y TUKEY

8.1. Análisis estadístico una hora después de administrar el agente flogógeno

(carragenina 1%)

Después de aplicar los tratamiento los resultados sobre el efecto antiinflamatorio después de una hora indica diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) tal como se muestra al emplear el análisis de varianza (ANOVA) en el Cuadro 20 y 21 y Figura 24, se evidencia que a la hora de aplicar los tratamientos de gel 10%, gel 5% y gel diclofenaco 1% se obtiene una mayor disminución de volumen de inflamación con promedios entre 1.24 a 1.298 no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos pero si con el control negativo que alcanzo un promedio de 1.398.

Cuadro 20: Análisis de varianza (anova) para el porcentaje de inflamación una hora después del agente flogógeno

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.06874	3	0.0229133	6.12	0.0056
Intra grupos	0.05988	16	0.0037425		
Total (Corr.)	0.12862	19			

Cuadro 21: Test de tukey al 95,0 % de confianza para el porcentaje de inflamación por tipo de tratamiento una hora después del agente flogógeno

Nivel	Casos	Media	Tukey
Gel 10% de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”	5	1.24	A
Gel Diclofenaco 1 %	5	1.276	A
Gel 5% de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”	5	1.298	AB
Gel base (control negativo)	5	1.398	C

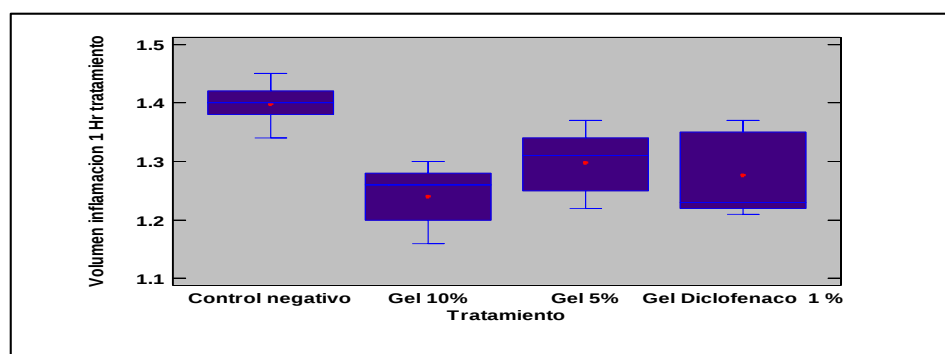


Figura 24: Efecto antiinflamatorio después de 1 hora de tratamiento

8.2. Análisis estadístico dos horas después de administrar el agente flogógeno (carragenina 1%)

Con los valores obtenidos a las dos horas después de haber aplicado el tratamiento se indica diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) tal como se muestra al emplear el análisis de varianza (ANOVA) en el Cuadro 22 y 23 y Figura 25, se evidencia que a las dos horas de aplicar los tratamientos gel 10%, diclofenaco 1 % y gel 5 % son los que presentan los promedios más bajos de volumen de inflamación con promedio de 1.108, 1.15 y 1.24 respectivamente; entre ellos las diferencias no son estadísticamente significativas pero difieren del control negativo que alcanza un promedio de 1.406, a un nivel de confianza del 95 %.

Cuadro 22: Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de inflamación dos horas después del agente flogógeno

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.26148	3	0.08716	24.73	0
Intra grupos	0.0564	16	0.003525		
Total (Corr.)	0.31788	19			

Cuadro 23: Test de tukey al 95.0% de confianza para el porcentaje de inflamación por tipo de tratamiento dos horas después del agente flogógeno

Nivel	Casos	Media	TUKEY
Gel 10% de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira".	5	1.108	A
Gel Diclofenaco 1 %	5	1.15	AB
Gel 5% de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira"	5	1.24	B
Gel base (control negativo)	5	1.406	C

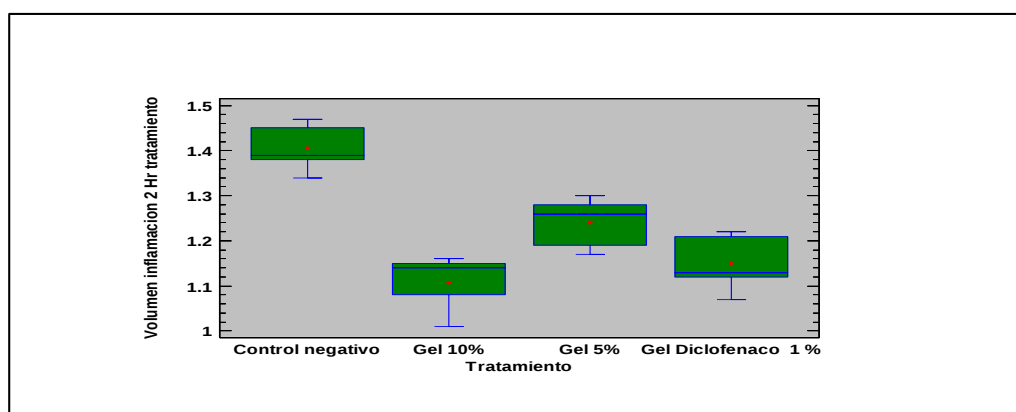


Figura 25: Efecto antiinflamatorio después de 2 horas de tratamiento

8.3. Análisis estadístico tres horas después de administrar el agente flogógeno (carragenina 1%)

Los resultados sobre el efecto antiinflamatorio de los tratamientos aplicados después de tres horas indica diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) tal como se muestra al emplear el análisis de varianza (ANOVA) en el Cuadro 24 y (Test de Tukey) en el cuadro 25, se evidencia que en este periodo de tiempo se mantiene las conductas de la evaluación de las dos horas, es decir los tratamientos aplicados de gel 10%, diclofenaco 1 % y gel 5 % dan promedios de volumen de inflamación con valores de 1.056, 1.128 y 1.204 respectivamente; entre ellos las diferencias no son estadísticamente significativas pero difieren del control negativo que alcanzo un promedio de 1.402, a un nivel de confianza del 95 %, como se observa en la Figura 26.

Cuadro 24: Análisis de varianza (anova) para el porcentaje de inflamación tres horas después del agente flogógeno

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.333575	3	0.111192	30.15	0
Intra grupos	0.059	16	0.0036875		
Total (Corr.)	0.392575	19			

Cuadro 25: Test de tukey al 95.0% de confianza para el porcentaje de inflamación por tipo de tratamiento tres horas después del agente flogógeno

Nivel	Casos	Media	TUKEY
Gel 10% de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.	5	1.056	A
Gel Diclofenaco 1 %	5	1.128	AB
Gel 5% de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.	5	1.204	B
Gel base (control negativo)	5	1.402	C

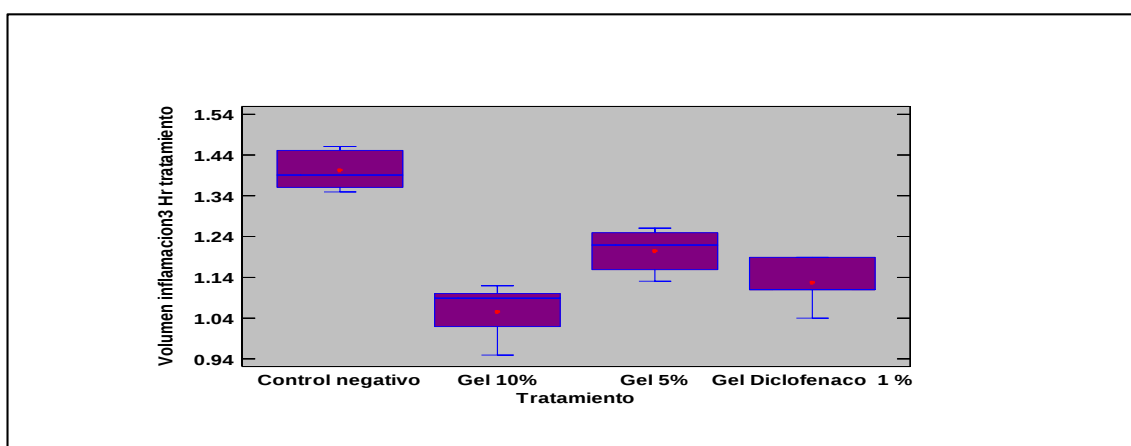


Figura 26: Efecto antiinflamatorio después de 3 horas de tratamiento

8.4. Análisis estadístico cuatro horas después de administrar el agente flogógeno (carragenina 1 %)

Los resultados sobre el efecto antiinflamatorio de los tratamientos aplicados después de cuatros horas indica diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) tal como se muestra al emplear el análisis de varianza (ANOVA) en el Cuadro 26 y (Test de Tukey) Cuadro 27, se evidencia que en este periodo de tiempo se mantiene la conducta de la evaluación de las tres horas. Los tratamientos con mayor efectividad en este tiempo de evaluación son gel 10 %, diclofenaco 1 % y gel 5 % los cuales dan lugar a promedios de 1.016, 1.116 y 1.172 en el volumen de inflamación, caso contrario con el control negativo que da lugar a un aumento en el volumen inflamatorio, a un nivel de confianza del 95 %, como se observa en la Figura 27.

Cuadro 26: Análisis de varianza (anova) para el porcentaje de inflamación cuatro horas después del agente flogógeno

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.392495	3	0.130832	34.54	0
Intra grupos	0.0606	16	0.0037875		
Total (Corr.)	0.453095	19			

Cuadro 27: Test de tukey al 95.0% de confianza para el porcentaje de inflamación por tipo de tratamiento cuatro horas después del agente flogógeno

Nivel	Casos	Media	TUKEY
Gel 10% de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira".	5	1.016	A
Gel Diclofenaco 1 %	5	1.116	AB
Gel 5% de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira".	5	1.172	B
Gel base (control negativo)	5	1.398	C

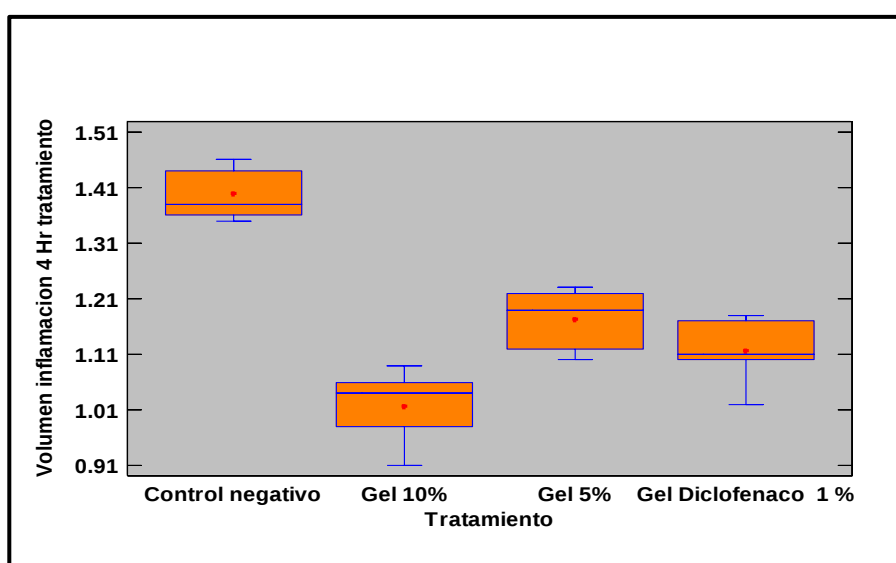


Figura 27: Efecto antiinflamatorio después de 4 horas de tratamiento

El efecto antiinflamatorio se determinó por la inducción de edema plantar con carragenina al 1 % en la pata posterior derecha, considerado como un modelo experimental de inflamación aguda. Asimismo, se conoce que la carragenina estimula la producción de prostaglandinas, las cuales promueven los procesos inflamatorios ⁽⁶³⁾

Por otro lado el proceso inflamatorio producido por carragenina inicia con la inducción y liberación de histamina, serotonina y quininas de fase temprana, así como prostaglandinas, proteasas y lisosomas en fases tardías.⁽⁶⁴⁾

Los geles al 10 % y el diclofenaco al 1 % mostraron una mayor disminución volumen inflamatorio con respecto al gel 5 % y Gel base. Tal es el caso del trabajo de investigación realizado en nuestro medio por Chilquillo y Cervantes (2017) quienes experimentaron con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira” basónimo de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”. Llegaron a la conclusión que el mencionado extracto hidroalcohólico demostró efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante en los modelos experimentales trabajados, registrándose una mayor eficacia antiinflamatoria a una dosis de 500 mg/kg (37,52 %) en comparación con los patrones de ibuprofeno 120 mg/kg (41,16 %) y prednisona 1,2 mg/kg (48,04 %).⁽⁴⁾

A nivel internacional, Devendra M, Ganga B, Et al, (2010) investigaron con el aceite de *Senecio rufinervis* D.C. (Asteraceae). El aceite esencial mostró una actividad antiinflamatorio significativa y dependiente de la dosis frente a la contorsión inducida por el ácido acético en ratones. El porcentaje de inhibición en número de contorsiones producidas por dosis de 25, 50 y 75 mg/kg fue, respectivamente, 69, 80 y 85%.⁽⁶⁵⁾

Por su parte, Yao, Wang y Wang (2016) estudiaron los efectos antiinflamatorios y analgésicos de los 71 extractos de etanol de *Senecio scandens* Buch-Ham. Estos extractos alcohólicos tienen un efecto analgésico y antiinflamatorio, y tienen una cierta actividad analgésica periférica; sus efectos antiinflamatorios pueden estar relacionados con su inhibición de la síntesis de PGE.⁽⁶⁶⁾

9. ETAPA EXPERIMENTAL - EVALUACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO

Para la evaluación del efecto analgésico se realizó una prueba piloto con el fin de evaluar a que porcentajes de formalina al 2 % y 3 % se consideraban de elección para realizar el trabajo experimental, Luego se observó que con el porcentaje al 3 % se produjo un daño mayor en el animal de experimentación ocasionando su muerte a los 20 minutos de haber administrado la solución de formalina, caso contrario con el 2 %

que se consideró el porcentaje de elección ya que el animal de experimentación no murió, pero si presentó los síntomas característicos del dolor nociceptivo, posteriormente se realizó la prueba definitiva utilizando el extracto etanólico en una suspensión a 8 mg/kg y 13 mg/kg del extracto de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, comparándolos con un grupo control negativo y un grupo control positivo con una suspensión de tramadol a 3 mg/kg.

Las sacudidas de la pata fueron agrupadas en dos fases: fase I, correspondiendo a las sacudidas producidas por formalina 2 % en un periodo de 10 minutos (1 a 10 min) y fase II, correspondiendo a las sacudidas de los 50 minutos restantes (11 a 60 min). Las medidas de los valores de los comportamientos de sacudidas de la pata están mostradas en la Figura 28.

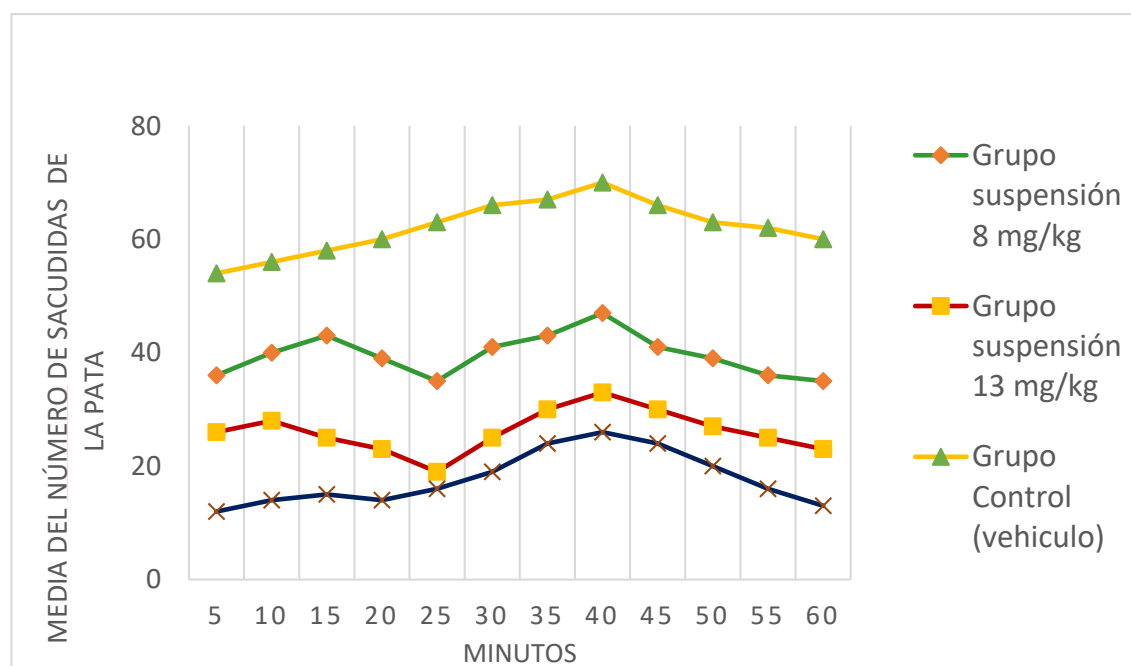


Figura 28: Comparación del número de sacudidas por tiempo

Fuente: Elaboración propia

10. DETERMINACIÓN DEL DOLOR

El modelo de nocicepción de la formalina puede discriminar entre el dolor central y el dolor periférico. La primera fase se genera en la periferia por medio de la activación de neuronas nociceptivas por acción directa de la formalina, mientras que la segunda fase ocurre por medio de la activación de neuronas centrales en la médula espinal.⁽⁴³⁾

Cuadro 28: Tabla ANOVA para el número de sacudidas de la pata de los animales de experimentación por tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón n-F	Valor-P
Entre grupos	5338.8	3	1779.6	93.91	0
Intra grupos	303.2	16	18.95		
Total (Corr.)	5642	19			

Cuadro 29: Pruebas de múltiple rango de Tukey para el número de sacudidas de la pata de los animales de experimentación por tratamientos

Nivel	Casos	Media	TUKEY
Grupo Suspensión Tramadol 3 mg/kg	5	23.8	A
Grupo suspensión 13 mg/kg de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira".	5	34	B
Grupo suspensión 8 mg/kg de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira".	5	46.6	C
Grupo Control (vehículo)	5	67.6	D

En el Cuadro 28 de (ANOVA) se muestra las diferencias altamente significativas en el número de sacudidas por animal sometidas a los diferentes tratamientos. El Test de Tukey, Cuadro 29 se evidencia que con el tramadol 3 mg/kg de peso se obtiene el mejor efecto en el control de dolor puesto que con este tratamiento se obtiene el menor promedio de sacudidas con un valor de 24 sacudidas, sigue el tratamiento de suspensión de Vira Vira de 13 mg/Kg de peso que da lugar a 34 sacudidas, le sigue la suspensión de Vira Vira de 8 mg/ Kg de peso con un promedio de 47 sacudidas de pata y finalmente la suspensión control negativa (vehículo) con un promedio de 68 sacudidas de pata, tal como se observa en la Figura 29.

tesis vira vira. Numero de sacudidas

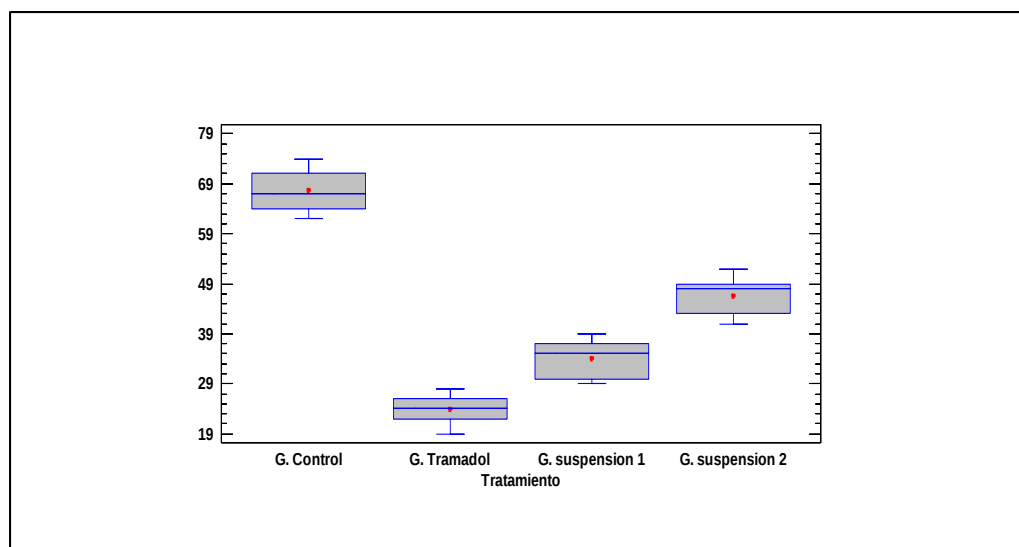


Figura 29: Comparación del número de sacudidas por tratamiento

En la primera fase la suspensión de tramadol de 3 mg/Kg (grupo control positivo) cuando fue administrado por vía oral prácticamente abolió la respuesta de sacudidas de pata desde el minuto 1 hasta los 60 minutos después de haberse administrado la formalina al 2%, con respecto a la suspensión de Vira Vira de 13 mg/kg donde se evidenciaron escasas sacudidas de pata de las ratas a partir del tercer minuto hasta los 10 minutos de los cuales culminó la primera fase, por otro lado con la suspensión de Vira Vira de 8 mg/kg se evidenció constantes sacudidas de pata de las ratas a partir del minuto uno, hasta concluir la primera fase, finalmente el blanco (Grupo control negativo), evidenció consecutivas sacudidas de pata de las ratas y también se observaron movimientos bruscos y saltos.

En la segunda fase el número de sacudidas de pata del grupo tramadol oral fue mínima, como era de esperarse dado su mecanismo de acción, el tramadol (3 mg/kg v.o.) ejerció una acción protectora ante el estímulo químico (formalina) en ambas fases del ensayo, mientras que las suspensiones de Vira Vira de 13 mg/Kg y 8 mg/kg. Evidenciaron una protección frente a la primera y segunda fase, pero no superior a la acción del tramadol. ⁽⁷⁾

En el Cuadro 30 se muestra el número de sacudidas de pata de las ratas en la primera y segunda fase tratadas con los distintos tratamientos.

Se realizó de acuerdo con lo establecido por Dubuisson y Dennis (1977), siguiendo las modificaciones realizadas por Abbott y cols. (1995) y (Hunskar y Hole, 1987).

Media hora después de la administración de las suspensiones, se inyectó la solución formalina al 2% (50 µl, s.c.) en la superficie plantar de la pata posterior derecha. De inmediato se introdujo el animal en un recipiente transparente para observar su comportamiento. Los resultados encontrados en nuestro estudio permiten proponer que para el caso de las suspensiones de Vira Vira 13 mg/Kg y 8 mg/kg presentaron actividad analgésica que podrían tener mecanismos de tipo aine, lo cual complementa el conocimiento previo de su actividad antiinflamatoria.

Según Okuyama E.et al. determinaron la actividad analgésica de un extracto hexánico de *Culcitium canescens*, donde se mostró efectos analgésicos en las pruebas de contracción inducida por ácido acético y en las pruebas de presión de cola , también determinó la presencia de metabolitos secundarios como cacalonol, dehidrocacalohastina y cacalohastina (compuestos sesquiterpénicos) ⁽⁵⁾, los cuales podrían estar presente en el extracto trabajado; como también podríamos indicar que la acción de los flavonoides o cualquier otro metabolito con acción antiinflamatoria estaría ejerciendo la actividad analgésica, ya que “se sabe que los mecanismos de acción de las actividades antiinflamatoria y analgésica están relacionados a través de la inhibición de la PGE”.

Cuadro 30: Efecto de las suspensiones tramadol 3 mg/kg v.o , suspensión de Vira Vira 13 mg/kg v.o y 8 mg/kg y control negativo en el ensayo de la formalina

Grupo Experimental	Número de sacudidas de pata	
	Primera Fase (0-10 min)	Segunda Fase (11-60 min)
Control (vehículo)	52 ± 2	68 ±3
Grupo Suspensión Tramadol 3 mg/kg v.o	15 ± 3	24 ±2
Grupo suspensión 13 mg/kg v.o de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.	22 ± 4	34 ± 3
Grupo suspensión 8 mg/kg v.o de <i>Culcitium canescens</i> (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.	40 ± 2	47 ± 3

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron extractos de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, con disolventes de diferente polaridad, etanol como solvente polar, cloroformo medianamente polar y éter de petróleo apolar por el método de extracción de percolación, obteniéndose tres extractos cuyos rendimientos fueron etanol 18.89%, cloroformo 1.32% y éter de petróleo 0.36%.
2. Se identificó mediante cromatografía en capa fina del extracto blando etanólico de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, los principales metabolitos secundarios entre ellos: saponinas, flavonoides, terpenos y alcaloides.
3. Se evaluó el efecto antiinflamatorio de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, haciendo uso de un gel, se concluye que a base del extracto etanólico de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” gel 10 % presenta mayor efecto antiinflamatorio con respecto al grupo gel 5 % de “Vira Vira”, diclofenaco gel 1 % y grupo control.
4. Se evaluó el efecto analgésico de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, teniendo en cuenta las dosis con efecto analgésico tradicionalmente utilizadas haciendo uso de una suspensión (forma farmacéutica), se concluye que la suspensión de tramadol 3 mg/kg presentó un efecto analgésico mayor frente al grupo suspensión de 13 mg/kg de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”, grupo suspensión 8 mg/kg de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” y control negativo con respecto al dolor producido por estímulo químico (formalina).

RECOMENDACIONES

1. Continuar con trabajos de identificación, aislamiento y cuantificación de los principales metabolitos secundarios en los extractos de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.
2. Evaluar la toxicidad de los extractos de las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.
3. Realizar un análisis de estabilidad y evaluar los parámetros fisicoquímicos del gel obtenido a partir del extracto etanólico las hojas de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira”.
4. Se recomienda utilizar concentraciones más altas del extracto de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) “Vira Vira” en geles con el fin de evaluar y definir su techo terapéutico.
5. En el test de formalina se recomienda usar dos controles positivos, uno de tipo opioide, que logre inhibir ambas fases, y otro de tipo aine, que inhiba solamente la segunda fase de este ensayo.
6. Se recomienda evaluar a dosis más altas las suspensiones con el fin de mostrar una mayor actividad analgésica.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Bussmann R, Sharon D. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía - La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú. 2015. 300 p.
2. Salaverry O. Plantas medicinales y medicina moderna. 2012;I:155–8.
3. Alejandro C. Potencial de flora medicinal silvestre en el distrito de la Encañada Capitulo I. In: Gestion. 2003. p. 1–140. In: Gestion. 2003. p. 1–140.
4. Chilquillo H, Cervantes R. Efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* (Humb. & Bonpl.) Cuatrec. “vira-vira”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Repositorio de la UNSM. 2017;
5. Okuyama E, Umeyama K, Ohmori S, Yamazaki M, Satake M. Pharmacologically Active Components from a Peruvian Medicinal Plant, Huira-Huira (*Culcitium canescens* H. & B.). Chem Pharm Bull (Tokyo). 1994;42(10):2183–6.
6. Godoy A. Demuestran Diferencias Estereoselectivas en la Biodisponibilidad del Tramadol.Chirality 23(4):287-293, 2011. 2008;(511):1–15.
7. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas. 2004;87.
8. López Naranjo F, Meza Almazo E, Jiménez García SN, Altagracia Martínez M, Manjarrez Marmolejo J. Métodos de extracción e identificación de los bioactivos de la *Lavandula officinalis* y su potencial uso como agente sedante. Rev Mex Ciencias Farm. 2013;44(1):60–5.
9. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas. Ediciones Omega. Barcelona. 2000.
10. Medina. J. Plantas medicinales: Extracción de principios activos. 2015;46–79.
11. Orozco M. Elección de las condiciones mas adecuadas para la obtención de extractos de plantas superiores con actividad sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente. 2004;44.
12. Sharapin N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 2000. p. 101–12.
13. Pedro G. Inflamación IX Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica.Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)2008;102:91–159.

- 2008;102:91–159.
14. Bórdes R. El proceso inflamatorio. Rev Enfermería. 1994;4:9–12.
 15. Owen J, Punt J, Stranford S. Kubby. Immunology. 2014.
 16. Sachlos E, Auguste D. Immunology Aplicated. Vol. 29, Biomaterials. 2008. 4471-4480 p.
 17. Espinós Pérez D, López Buenadicha A, Calvo Manuel E. Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. Monogr la Real Acad Farm. 2004;237–86.
 18. Flores C, Ancalla G. Evaluación del efecto antiinflamatorio de *Muehlenbeckia volcánica Benthana Endlicher* (MULLACA) en animales de experimentación”Universidad católica de santa maría Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. 2017.
 19. Ohno M. Terpenos. Phys Rev B. 2005;72(10):1–13.
 20. Flores M, Perpetua A, Rocha C, Nascimento S. Analgésicos Tópicos. 2012;62.
 21. Arrans J, Tricas M, Lopez L. Revista Iberoamericana de Fisioterapia y Kinesiología. Trat del dolor.
 22. Ferrandiz M. Fisiopatología Del Dolor. Scielo. 2005;1–14.
 23. López F. Definición y Clasificación del dolor. Clínicas Urológicas la Complut. 1996;49–55.
 24. Puebla D. Dolor Tipos de dolor y escala terapéutica de la O . M . S . Dolor iatrogénico. :33–7.
 25. Moreno D. Fisiopatología del dolor clínico,Bogotá.2004. Medwave. 2008;8(8).
 26. Gómez A, María Á, Álvarez G, Liliana E, Plata V. Guías Sobre Manejo Farmacológico Del Dolor Documentos De Investigación Facultad De Medicina.
 27. Fernández P. Tratamiento farmacológico del dolor torácico. 2005;64:207–41.
 28. Álvarez Y, Farré M. Farmacología de los opioides Adicciones, vol. 17, núm. 2, 2005, pp. 21-4. 2005;
 29. Campos Duglas M. Sistema opioide endógeno. 1998;
 30. Herrera J. Utilidad de los opioides orales en dolor neuropatico. Aparición de nuevas formulaciones de tramadol y morfina. Rev la Soc Esp del Dolor. 2001;8(SUPPL. 1):32–4.
 31. Moraes G, Lanchote V y colaboradores. Diferencias Estereoselectivas en la Biodisponibilidad del Tramadol.Chirality , 2011l.

32. Lopez B, Ortonobes S, García C. Formas Farmacéuticas : Ungüentos, pomadas, cremas, geles y pastas. Form Act en pediatría atención primaria. 2015;8(4):1–5.
33. Vila J. Tecnología Farmacéutica. Aspectos Fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas. Vol I y Formas Farmacéuticas. Vol II. Ed. Síntesis. Madrid, 199.
34. Oliva A, Santove A. Prácticas de tecnología farmacéutica II. 2010;1–30.
35. Cumbreño S, Pérez F. Elaboración de suspensiones . 2004;23(3):150–2.
36. Lopez G. Universidad de Granada Facultad de Farmacia Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica Diseño de formas farmacéuticas. 2008.
37. Velarde M, Starov V. Humectacion: conceptos y cuestiones basicas [Wetting: concepts and basic features]. Revista Espanola de Fisica, 2009, 23(4), pp. 61-74.
38. Gonzalez D. Modelos animales de dolor y aspectos eticos de la experimentación animal. 2000;7(5):313–8.
39. Torre R, Medina J, Figueroa M. El código de ética en la experimentación animal. 2001;1(1):140–5.
40. Eaton M. Common animal models for spasticity and pain. J Rehabil Res Dev. 2003;40(4s):41.
41. Sousa A, Franco P, Ashmawi H, Posso I. Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. Rev Bras Anesthesiol. 2008;58(4):1–6.
42. Smida A, Hachemane M, Hamici A. Application of Noether's theorem to extended particles. J Phys Conf Ser. 2008;128:447–53.
43. Ortega A, Micó J. Modelos animales de dolor. Visión crítica. 2002;447–53. 2002;447–53.
44. Victoria J. Preparación de extractos vegetales, 2010.
45. Guerra E. Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala a nivel de laboratorio. Univ San Carlos Guatemala. 2005;1(1):55–60.
46. Tobergte D, Curtis S. Conceptos Fundamentales De Cromatografía. J Chem Inf Model. 2013;1–31.
47. En M, Del Q, Ambiente M, Clorpirifos O, En YP, Condori G, et al. Universidad

- católica de santa maría. 2016;
48. Abbott D, Andrews R. Introducción a la Cromatografía. 3ra. Edición. Colección Exedra. Editorial Alhambra. España. 1973.
 49. Winter C, Risley A, Nuss G. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111:544-7, 1962. 1983;2(6):1983.
 50. McCarson K. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)–Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. 2015;70.
 51. Ichikawa T, Yamada K, Namikawa M, Sakai K, Kondo K. New cyclopentenonyl fatty acids from Japanese mosses. J Hattori Bot Lab. 1984;56.
 52. Meunier C, Burton J, Cumps J, Verbeeck R. Evaluation of the formalin test to assess the analgesic activity of diflunisal in the rat. Eur J Pharm Sci. 1998;6(4):307–12.
 53. Fallas J. Análisis de varianza. Comparando tres o más medias. 2012;54.
 54. Villalpando G, Jesús A, Morales C, Guzmán R, Elva M, Saavedra L, et al. Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, Hsu y Bechhofer para selección de medias Agrociencia, vol. 35, núm. 1, enero-febrero, 2001, pp. 79-86 Colegio de Postgraduados Texcoco, México. 2001;123.
 55. Guerra CF, Snijders J, te Velde G, Baerends E. No title. Theor Chem Acc. 1998;99:391.
 56. Illera G. Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus Officinalis*). 2012;257.
 57. Deming W. Preface to the Second Edition. Vol. 11, Data Handling in Science and Technology. 1993. XV.
 58. Carson D, Guerra J. Análisis por cromatografía de capa delgada: *arracacia xanthoriza*.
 59. Dávalos J, Lomelí M, López F, Sahagún A, Rodríguez A, Pedro M, et al. Screening Fitoquímico y Capacidad Antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. Biotecnia. 2009;53–60.
 60. Pacheco E. Determinación del contenido de Ácido Ascórbico y la presencia de Terpenos en un grupo de Briofitas, popias de la zona amazónica. Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria. Quito, Junio 2012. 2018;244.

61. Fontan C. Las saponinas y la botánica. An del I Botánico A J Cavanilles. 1993;501–21.
62. Debenedetti S, Wilson E. Farmacognosia Clases Teóricas y Presentaciones Triterpenos y Esteroides Saponinas. Numer 12. 2018;
63. Vitalone H, Merciau G, Torres S, Merciau G, Valdez J, Gómez S, et al. Effect of carrageenan and indomethacin in the development and population of mast cells in a murine fibrosarcoma. 2005;38:87–92.
64. Mesrahm R. Demonstration of anti-inflammatory activity of alcoholic and hydroalcoholic extracts of *Tridax procumbens* using the rat paw edema assay . 2011;4(1):47–51. 2011;4(1):47–51.
65. Mishra D, Bisht G, Mazumdar P, Pilkhwal S, Sangeeta S. Chemical composition and analgesic activity of *Senecio rufinervis* essential oil. 2010;0209.
66. Scalbert A, Manach C, Morand C, Em CR. Dietary Polyphenols and. 2005;306:287–306.

ANEXOS

ANEXO N° 01: Identificación y tipificación del espécimen vegetal



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 033-2018-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa,

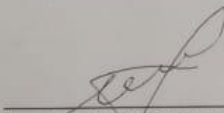
HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca del espécimen presentada por Ingrid Julissa Ramírez Añasco y Catherine Lizet Carbajal Inca Bachilleres de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, para la ejecución de su Tesis "Evaluación del efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto de *Culcitium canescens* (Humb. & Bonpl.) "Vira Vira" en animales de experimentación ". La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

División	Magnolophyta
Clase	Magnoliopsidae
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Asteroideae
Genero	Culcitium
Especie	<i>Culcitium canescens</i> Humb. & Bonpl. "Vira Vira"

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 21 de mayo del 2018.



Blgo. Leoncio Magaña Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercano
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA - PERÚ

ANEXO N° 02: Recolección y tratamiento de las hojas de *Culcitium canescens*

“Vira Vira”



Fig. 1: Ubicación de la planta.



Fig. 2: Recolección de las hojas.



Fig. 3: Separación y limpieza de las hojas.



Fig. 4: Pulverización de las hojas

ANEXO N° 03: Preparación de extractos de *Culcitium canescens* “Vira Vira”



Fig. 1: Pesada de las
hojas



Fig. 2: Maceración
de las hojas



Fig. 3: Elaboración
del Percolador.



Fig. 4: Percolación
de la muestra.



Fig. 5: Concentración
del extracto

ANEXO N° 04: Proceso de aplicación de carragenina 1% y tratamientos para el efecto antiinflamatorio



Fig. 1: Pesada de los animales.



Fig. 2: Distribución de los animales para cada grupo experimental.



Fig. 3: Aplicación de carragenina 1%.



Fig. 4: Aplicación de tratamientos.

**ANEXO N° 05: Resultados en mililitros dados por el equipo pletismómetro digital
durante la etapa experimental**

		T 0 Hrs ml	T 1 Hrs ml	T 2 Hrs ml	T3 Hrs ml	T4 Hrs ml	T5 Hrs ml	T 6 Hrs ml	T 7 Hrs ml
Control Negativo (gel base)	1	0.82	1.20	1.30	1.33	1.34	1.34	1.35	1.35
	2	0.81	1.27	1.32	1.39	1.40	1.39	1.39	1.38
	3	0.84	1.23	1.28	1.37	1.38	1.38	1.36	1.36
	4	0.80	1.30	1.34	1.40	1.42	1.45	1.45	1.44
	5	0.81	1.28	1.34	1.43	1.45	1.47	1.46	1.46
Control Positivo (Gel diclofenaco 1 %)	6	0.82	1.18	1.29	1.32	1.23	1.07	1.04	1.02
	7	0.84	1.27	1.36	1.45	1.37	1.22	1.19	1.17
	8	0.79	1.16	1.25	1.30	1.21	1.13	1.11	1.10
	9	0.85	1.28	1.39	1.44	1.35	1.21	1.19	1.18
	10	0.80	1.17	1.28	1.31	1.22	1.12	1.11	1.11
Grupo experimental 1 (Gel 10% extracto blando etanólico de las hojas de <i>Culcitium canescens</i> (Vira Vira)	11	0.73	1.09	1.18	1.23	1.16	1.01	0.95	0.91
	12	0.75	1.13	1.21	1.27	1.20	1.08	1.02	0.98
	13	0.80	1.17	1.26	1.33	1.26	1.14	1.09	1.04
	14	0.82	1.20	1.29	1.35	1.28	1.16	1.10	1.06
	15	0.84	1.24	1.32	1.38	1.30	1.15	1.12	1.09
Grupo experimental 2 (Gel 5% extracto blando etanólico de las hojas de <i>Culcitium</i>	16	0.74	1.14	1.24	1.32	1.25	1.19	1.16	1.12
	17	0.79	1.18	1.29	1.37	1.31	1.26	1.22	1.19
	18	0.81	1.23	1.32	1.41	1.34	1.28	1.25	1.22
	19	0.83	1.26	1.35	1.43	1.37	1.30	1.26	1.23

<i>canescens</i> (Vira Vira)	20	0.72	1.11	1.21	1.29	1.22	1.17	1.13	1.10
------------------------------	----	------	------	------	------	------	------	------	------

ANEXO N° 06: Fórmula para hallar el porcentaje de inflamación

$$\% \text{ de Inflamación} = \frac{(V_{tx} - V_{to})}{V_{to}} \times 100$$

V_{tx}: Volúmen de la pata inflamada a un tiempo x

V_{to}: Volúmen normal de la pata

ANEXO N° 07: Proceso de aplicación de formalina 2% y tratamientos para el efecto analgésico



Fig. 1: Aplicación de tratamientos de vira vira y tramadol.



Fig. 2: Aplicación de formalina 2 %.



Fig. 3: Distribución de los animales de experimentación en envases transparentes y con su respectivo tratamiento.

**ANEXO N° 08: Cálculo de dosis del extracto etanólico de *Culcitium canescens*
“Vira Vira” y tramadol**

1) Rendimiento

$$\%RE = \frac{9.4391}{50g} \times 100 = 18.8782\%$$

2) P/V extractos

$$D.Ext.etanólico = \frac{3g}{70 Kg} \times \frac{18.8782}{100g} \times \frac{1000 mg}{1 g} = 8.09 mg / kg$$

$$D.Ext.etanólico = \frac{5g}{70 Kg} \times \frac{18.8782}{100g} \times \frac{1000 mg}{1 g} = 13.48 mg / kg$$

D. Ext. Etanólico = 8 mg/kg

D. Ext. Etanólico = 13 mg/kg

3) TRAMADOL 50mg / 6 HORAS = DOSIS ADULTO 70 kg

$$\begin{array}{rcl} 200 \text{ mg} & \text{_____} & 70 \text{ kg} \\ X & \text{_____} & 1 \text{ kg} \end{array}$$

$$X = 2.86 \text{ mg/Kg}$$

$$X = 3 \text{ mg/Kg}$$

**ANEXO N° 09: Fórmula para preparar las suspensiones del extracto etanólico de
Culcitium canescens “Vira Vira”**

Suspensión extracto etanólico (0.08 % p/v)

0.08 g extracto blando (etanólico) _____ 100 ml
(X) g _____ 30 ml

$$X = 0.024272 \text{ g}$$

$$X = 24 \text{ mg}$$

Pesar para preparar la
suspensión.

24 mg _____ 30 ml
(X) g _____ 2.5 ml

$$X = 2 \text{ mg}$$

2 mg _____ 250 g
(X) g _____ 1000g

$$X = 8 \text{ mg/kg}$$

Dosis de la suspensión
p/v.

Carboximetilcelulosa sódica (0.5% - 1%)

0.5 g _____ 100 ml
X _____ 30 ml

$$X = 0.15 \text{ g}$$

Tween 20 (0.1% - 3%)

1.6 ml _____ 100 ml
X _____ 30 ml

$$X = 0.5 \text{ ml}$$

Suspensión extracto etanólico (0.13 % p/v)

0.13 g extracto blando (etanólico) _____ 100 ml
(X) g _____ 30 ml

$$X = 0.039 \text{ g}$$

$$X = 39 \text{ mg}$$



Pesar para preparar la
suspensión.

39 mg _____ 30 ml
(X) g _____ 2.5 ml

$$X = 3.25 \text{ mg}$$

3.25mg _____ 250 g
(X) g _____ 1000g

$$X = 13 \text{ mg/kg}$$



Dosis de la suspensión
p/v.

ANEXO N° 10: Resultados del efecto antiinflamatorio



Fig. 1: Nivel de inflamación
máxima con carragenina
1%



Fig. 2: Disminución de
inflamación final de
diclofenaco 1%.



Fig. 3: Disminución de
inflamación final de gel
Vira Vira al 10%



Fig. 4: Disminución de
inflamación final de
diclofenaco 1%.



Fig. 5: Disminución de
inflamación final de
gel Vira Vira al 5%

ANEXO N° 11: Resultados del efecto analgésico



Fig. 1: Extractos de *Culcitium canescens* “Vira Vira” para la preparación de las suspensiones.



Fig. 2: Suspensiones de *Culcitium canescens* “Vira Vira” y tramadol.



Fig. 3 y 4: Administración de las suspensiones.