

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS,
BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO TÓPICO DEL
EXTRACTO Y GEL DE *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) EN EDEMA
PLANTAR INDUCIDO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN”**

Presentado por el Bachiller:

CONDORI MELGAR, Wilther Vladimir

**Para optar el Título Profesional de Químico
Farmacéutico**

Asesor:

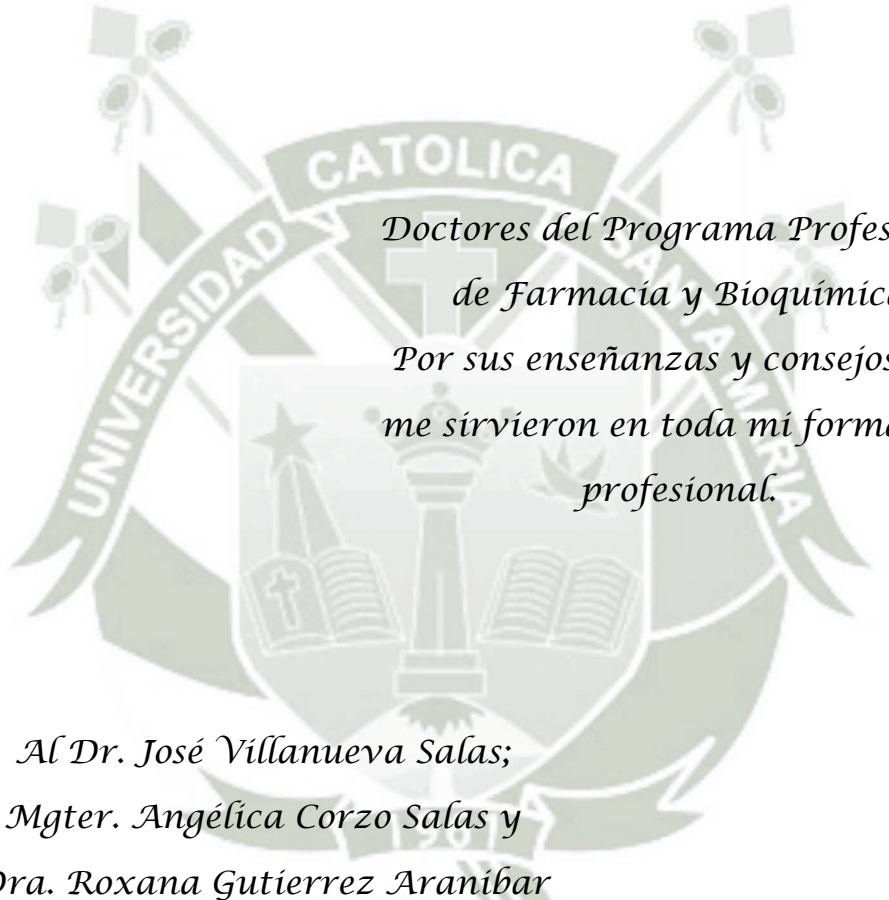
Q.F. Fernando Antero Torres Vela

AREQUIPA – PERÚ

2013

AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Fernando Torres Vela,
Quien fue mi asesor y me orientó
en la elaboración del presente
trabajo de investigación.*



*Doctores del Programa Profesional
de Farmacia y Bioquímica
Por sus enseñanzas y consejos que
me sirvieron en toda mi formación
profesional.*

*Al Dr. José Villanueva Salas;
Mgter. Angélica Corzo Salas y
Dra. Roxana Gutierrez Aranibar
Mi especial agradecimiento por sus
consejos que me sirvieron para
culminar el presente trabajo de
investigación.*

DEDICATORIA

*El presente trabajo se lo
dedico en primer lugar a
Nuestro Creador por
iluminar mi camino y
guíarme en todo momento*

*A mis padres Juan
Condorí Champí y Zaida
Melgar Pauca, por
brindarme todo su apoyo
incondicional y sus
consejos durante mi
formación profesional,*

*A mis Hermanitas Nayelí y
Lucero por su apoyo y sus
buenos deseos,*

*A mi amor Yorelí quien
estuvo en todo momento
brindándome palabras de
aliento y apoyo.*

VLADIMIR

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	6
HIPÓTESIS	7
CAPÍTULO I	8
MARCO TEÓRICO	8
1.1. POLYPODIUM CRASSIFOLIUM L. (CALAGUALA).....	8
1.1.1. UBICACIÓN TAXONÓMICA.....	8
1.1.2. NOMBRE CIENTÍFICO	8
1.1.3. NOMBRES COMUNES	9
1.1.4. ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	9
1.1.5. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	9
1.1.6. PARTE EMPLEADA.....	10
1.1.7. USOS TERAPÉUTICOS TRADICIONALES.....	10
1.2. INFLAMACIÓN	10
1.2.1. DEFINICIÓN	10
1.2.2. SIGNOS CLÍNICOS LOCALES DE LA INFLAMACIÓN	11
1.2.3. AGENTES CAUSALES DE LA INFLAMACIÓN	11
1.2.3.1 AGENTES FÍSICOS.....	11
1.2.3.2 AGENTES QUÍMICOS.....	11
1.2.3.3 AGENTES BIOLÓGICOS	12

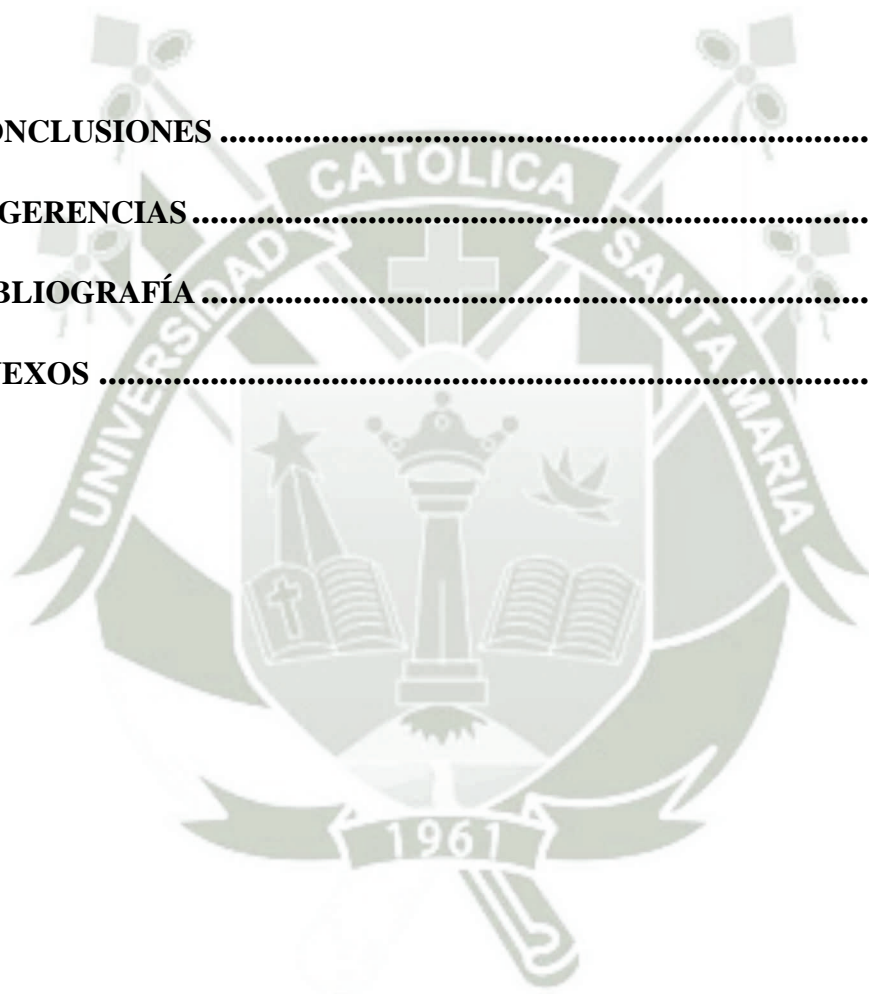
1.2.4. CLASIFICACIÓN DE LA INFLAMACIÓN	12
1.2.4.1 INFLAMACIÓN AGUDA	12
1.2.4.2 INFLAMACIÓN CRÓNICA.....	13
1.2.5. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN	14
1.2.5.1 AMINAS VASOACTIVAS.....	14
1.2.5.2 METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO	15
1.2.5.3 CITOCINAS Y QUIMIOCINAS.....	15
1.2.6. INFLAMACIÓN EXPERIMENTAL (MÉTODO).....	16
1.2.6.1 INACTIVACIÓN DE RADICALES SUPERÓXIDOS (O ₂ [*]).....	16
1.2.6.2 EFECTO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS	16
1.2.6.3 EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA	16
1.3. GELES	17
1.3.1. TIPOS DE GELES	18
1.3.1.1 GELES HIDRÓFOBOS.....	18
1.3.1.2 GELES HIDRÓFILOS.....	18
1.4. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS VEGETALES.....	18
1.4.1. TIPOS DE EXTRACCIONES CON DISOLVENTES	19
1.4.1.1 EXTRACCIÓN DISCONTINUA.....	19
1.4.1.2 EXTRACCIÓN CONTINUA	20
CAPÍTULO II	22
MATERIAL Y MÉTODOS	22
2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN	22
2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	22

2.3. MATERIALES.....	23
2.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	23
2.3.1.1 UNIDAD VEGETAL.....	23
2.3.1.2 UNIDAD ANIMAL.....	23
2.3.2. MATERIAL DE LABORATORIO.....	24
2.3.2.1 MATERIAL DE VIDRIO.....	24
2.3.2.2 EQUIPOS.....	24
2.3.2.3 OTROS MATERIALES	24
2.3.3. REACTIVOS	25
2.4. MÉTODOS	26
2.4.1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.....	26
2.4.1.1 RECOLECCIÓN.....	26
2.4.1.2 SELECCIÓN.....	26
2.4.1.3 ESTABILIZACIÓN.....	27
2.4.1.4 DESECACIÓN	27
2.4.1.5 PULVERIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO.....	27
2.4.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS	27
2.4.2.1 MÉTODO.....	27
2.4.2.2 FUNDAMENTO.....	28
2.4.2.3 PROCEDIMIENTO	29
2.4.3. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO.....	30
2.4.3.1 MÉTODO.....	30
2.4.3.2 FUNDAMENTO.....	30
2.4.3.3 PROCEDIMIENTO	30
2.4.3.4 CÁLCULOS.....	30

2.4.4. SCREENING FITOQUÍMICO	31
2.4.4.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF.....	31
2.4.4.2 ENSAYO DE MAYER.....	31
2.4.4.3 ENSAYO DE WAGNER.....	32
2.4.4.4 ENSAYO DE BALJET.....	32
2.4.4.5 ENSAYO DE BORNTRAGER.....	32
2.4.4.6 ENSAYO DE LIEBERMAN-BUCHARD.....	33
2.4.4.7 ENSAYO DE FEEHLING.....	34
2.4.4.8 ENSAYO DE ESPUMA.....	34
2.4.4.9 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO.....	35
2.4.4.10 ENSAYO DE SHINODA.....	35
2.4.5. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA CAPA FINA (TLC).....	36
2.4.5.1 MÉTODO.....	36
2.4.5.2 FUNDAMENTO.....	36
2.4.5.3 PROCEDIMIENTO.....	36
2.4.5.4 FACTOR DE RETRASO.....	37
2.4.5.5 IDENTIFICACIÓN DE QUINONAS.....	38
2.4.5.6 IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS.....	40
2.4.5.7 IDENTIFICACIÓN DE TANINOS.....	41
2.4.5.8 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	42
2.4.6. PREPARACIÓN Y FÓRMULACIÓN DEL GEL.....	43
2.4.6.1 OBJETIVO.....	43
2.4.6.2 RESPONSABILIDADES DE APLICACIÓN Y ALCANCE.....	44
2.4.6.3 INGREDIENTES USADOS EN LA FÓRMULACIÓN DEL GEL	44

2.4.6.4 FÓRMULACIÓN DEL GEL.....	44
2.4.6.5 MODUS OPERANDI.....	44
2.4.7. TÉCNICA PARA MEDIR EL GRADO DE INFLAMACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	45
2.4.7.1 MÉTODO.....	45
2.4.7.2 FUNDAMENTO.....	45
2.4.7.3 PROCEDIMIENTO	47
2.4.8. GRUPOS DE ESTUDIO	47
2.4.8.1 PROCEDIMIENTO	48
2.4.9. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	49
2.4.9.1 PARÁMETROS DE DISTRIBUCIÓN	49
2.4.9.1.1 MEDIA ARITMÉTICA.....	49
2.4.9.2 PARÁMETROS DE DISPERSIÓN	49
2.4.9.2.1 VARIANZA.....	49
2.4.9.2.2 DESVIACIÓN ESTÁNDAR.....	50
2.4.9.3 ESTADÍSTICA INFERENCIAL.....	51
2.4.9.3.1 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)	51
2.4.9.3.2 TEST HDS DE TUKEY.....	51
CAPÍTULO III.....	53
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS	53
3.1.1. EXTRACCIÓN ETANÓLICA	53
3.1.2. EXTRACCIÓN HEXÁNICA	54
3.1.3. EXTRACCIÓN CLOROFÓRMICA.....	55

3.2. SCREENING FITOQUÍMICO.....	57
3.3. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.....	58
3.4. PREPARACIÓN DEL GEL AL 20 %	62
3.4.1. FÓRMULA	62
3.5. ESTUDIO SOBRE EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO.....	63
3.6. ANALISIS ESTADÍSTICO ANOVA Y TEST DE TUKEY.....	70
CONCLUSIONES	75
SUGERENCIAS.....	76
BIBLIOGRAFÍA	77
ANEXOS	83



RESUMEN

El siguiente estudio experimental se realizó con ratas de la raza “Holtzman”, especie *rattus rattus*, con el objetivo de evaluar el efecto antiinflamatorio, del extracto seco y gel de *Polypodium crassifolium L. (Calaguala)*.

Se usaron los rizomas de *Polypodium crassifolium L. (Calaguala)* que fueron desecados y triturados para la extracción de sus metabolitos secundarios, usando solventes de distintas polaridades, luego se determinó el porcentaje de rendimiento de extracto seco. Encontrándose un rendimiento de 18 % de extracto seco para el etanol, 8 % para el cloroformo y 6 % para el hexano.

El extracto etanólico fue sembrado en placas de sílica gel para realizar la cromatografía en capa fina a través de sistemas de disolventes y reactivos reveladores; los resultados de la cromatografía señalan la presencia de flavonoides, saponinas, taninos y quinonas. El mismo extracto fue empleado para la formulación de un gel a una concentración del 20 %, de buen aspecto y características organolépticas aceptables.

Tanto el gel y el extracto se sometieron a una evaluación del probable efecto antiinflamatorio del rizoma de *Polypodium crassifolium L. (Calaguala)* en animales de experimentación. La inflamación se indujo mediante la administración de carragenina al 1 % en la zona plantar del animal. El volumen de la inflamación se

midió en mililitros a través de pletismómetro digital. Este valor fue fundamental para hallar el porcentaje de inhibición de la inflamación a distintos tiempos de medición. Luego de aplicar los análisis estadísticos (análisis de varianza y prueba de Tukey) se concluyó que el gel con extracto seco *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) al 20 % obtuvo un porcentaje de inhibición de la inflamación estadísticamente diferente que el extracto seco de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) diluido al 20 %, concluyendo que el gel 20 % es más eficaz ya que tiene un efecto mayor que el extracto seco de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) diluido al 20 %.



ABSTRACT

The following experimental study was conducted with rats breed "Holtzman" *rattus rattus* species, in order to evaluate the anti-inflammatory effect, the dry matter and *Polypodium crassifolium L.* (Calaguala).

Were used Rhizomes of *Polypodium crassifolium L.* (Calaguala) which were dried and ground for extraction of secondary metabolites, with solvents of different polarities, then the percent yield of dry matter was determined. Finding yield 18 % dry extract for ethanol, 8 % chloroform and 6 % to hexane.

The ethanol extract was spotted on plates of silica gel for chromatography thin-layer through solvent systems and revealing reagents, the results obtained of chromatography indicate the presence of flavonoids, saponins, tannins and quinones. The same extract was used for the formulation of a gel at a concentration of 20%, good-looking and acceptable organoleptic characteristics. Both the gel and the extract was subjected to an assessment of the likely anti-inflammatory effect of the rhizome of *Polypodium crassifolium L.* (Calaguala) in experimental animals. The inflammation was induced by administration of 1 % carrageenan into the plantar of the animal. The volume of swelling is measured in milliliters through digital plethysmometer . This value was crucial for the percent of inhibition of inflammation at different measurement times. After applying statistical analysis (analysis of variance and Tukey's test) it was concluded that the gel dry extract

Polypodium crassifolium L. (Calaguala) obtained a 20% statistically different percentage inhibition of inflammation that the dry extract of *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) diluted to 20 %, concluding that gel of 20 % is more effective because it has a greater effect than the dry extract of *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) diluted to 20 %.



INTRODUCCIÓN

En el Perú un sector de la población aprovecha las plantas medicinales por sus propiedades curativas, estas plantas son utilizadas de manera empírica, es decir, sin fundamentos verdaderos de sus cualidades curativas, sino simplemente basados en conocimientos no comprobados.

Los pobladores de la selva de Madre de Dios, encuentran en las enseñanzas de sus antepasados, las principales fuentes de transmisión de conocimientos. Sumado a esto, la gran diversidad de especies botánicas hace necesario que sean las propias experiencias de los pobladores (probando las diferentes plantas en infusión, mate o jarabes) lo que determine el uso de tal o cual especie, para luego formar parte del conjunto de conocimientos tradicionales.

El *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) es un helecho epífita perenne que crece de manera silvestre sobre las rocas de los márgenes de los ríos y especialmente sobre tallos de los árboles o troncos caídos, se distribuye ampliamente por toda la selva de los departamentos de Madre de Dios, Cuzco y Puno. El rizoma y las frondas son utilizados tradicionalmente para tratar: La inflamación de los riñones, próstata, hígado, úlceras, también es utilizada como febrífuga, sudorípara, antisifilítica y antirreumática.

El presente trabajo tiene como propósito evaluar el efecto antiinflamatorio del gel y extracto seco del rizoma de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) en animales de experimentación (*Rattus rattus* de la raza *Holtzman*) empleando el método “Edema plantar inducido por carragenina” con la finalidad de que este gel sea una alternativa en el tratamiento de procesos inflamatorios agudos.

OBJETIVOS

1. Obtener los extractos del rizoma de *Polypodium crassifolium L.* (Calaguala).
2. Realizar un estudio fitoquímico preliminar del extracto seco del rizoma de *Polypodium crassifolium L.* (Calaguala).
3. Elaborar un gel tópico con el extracto seco obtenido del rizoma de *Polypodium crassifolium L.* (Calaguala).
4. Medir la actividad antiinflamatoria del extracto seco y gel a base de extracto seco del rizoma de *Polypodium crassifolium L.* (Calaguala) mediante el pletismómetro.

HIPÓTESIS

Dado que el saber popular le atribuye efectos antiinflamatorios a la aplicación tópica del rizoma de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala), es probable que el extracto seco y gel elaborado a base *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala), presenten eficacia antiinflamatoria tópica en el modelo de edema plantar inducido en animales de experimentación.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1.1. *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala)

1.1.1. UBICACIÓN TAXONÓMICA

Reino	:	Plantae.
División	:	Pteridophyta.
Clase	:	Equisetopsida.
Orden	:	Polypodiales.
Familia	:	Polypodiaceae.
Género	:	Polypodium.
Especie	:	<i>Polypodium crassifolium</i> .

1.1.2. NOMBRE CIENTÍFICO

Polypodium crassifolium L. (Lellinger).

1.1.3. NOMBRES COMUNES

“Lengua de ciervo”, “Calaguala”, “Ancac pfurum”. (1, 2, 3)

1.1.4. ASPECTOS ECOLÓGICOS

Helecho epífita perenne que crece en zonas montañosas, en los márgenes de los ríos y especialmente sobre tallos de los árboles o troncos caídos, desde los 200 m.s.n.m. hasta los 2800 m.s.n.m. (4)

1.1.5. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Presenta un rizoma escamoso de forma lanceolada, las partes jóvenes del rizoma son radicales como una maraña de raíces densamente pilosas. Las frondes generalmente se encuentran en forma de roseta o formando densas repisas sobre los fustes de árboles o palmeras. (4, 5, 6)

El pecíolo es de color café, presenta una característica lustrosa de unos 10 – 100 cm. de largo y de 1.5 – 10 cm. de ancho. El nervio principal (costa) es prominente y de color café – rojizo. Los nervios secundarios poco prominentes se ubican diagonalmente al nervio principal, pero paralelos entre sí, presenta soros de 3 a 12 por fila.

(4, 5, 6) (Figura N° 1)



Figura N° 1: *Niphidium Crassifolium*.

Fuente: Atrium Biodiversity Information System.

1.1.6. PARTE EMPLEADA

Rizomas y frondes. ^(4,5)

1.1.7. USOS TERAPÉUTICOS TRADICIONALES

- Astringente. ^(4, 5,7)
- Diaforética. ^(5,7)
- Antisifilítica. ^(4, 5,7)
- Antirreumática. ^(4,7)
- Antiinflamatoria. ^(4, 5,7)
- Antiulceroso. ^(4, 5,7)

1.2. INFLAMACIÓN

1.2.1. DEFINICIÓN

La inflamación es una reacción fisiopatológica del huésped a un estímulo nocivo, cuyo objetivo es eliminarlo, por lo que la capacidad de desencadenar una reacción inflamatoria resulta esencial para la supervivencia. Cualquier factor que induce daño tisular puede ser descrito como la patogenia de la inflamación. ^(8, 9, 10, 11)

Los estímulos nocivos que desencadenan los procesos inflamatorios pueden ser de diversa índole, tales como las lesiones causadas por los agentes químicos (ácidos, álcalis, alérgenos, aceite mineral, etc.), los físicos (hematomas, quemaduras, congelación, radiaciones, etc.), los bioquímicos (microorganismos, parásitos, endotoxinas, toxinas de animales, etc.). ^(8, 9, 10, 11)

Cada estímulo desencadena un tipo de respuesta característica, que determina la magnitud e intensidad del proceso inflamatorio aunque dolorosa, la inflamación es, normalmente, una respuesta reparadora. ^(8, 9, 10, 11)

1.2.2. SIGNOS CLÍNICOS LOCALES DE LA INFLAMACIÓN

A nivel macroscópico, la inflamación generalmente se caracteriza por la presencia de *calor, dolor, rubor, tumefacción* (hinchazón) y alteración o pérdida de la función en el área afectada. Estos signos de la respuesta inflamatoria son inducidos por: ^(10, 11)

- Cambios del flujo y calibre vascular. ⁽¹²⁾
- Cambios en la permeabilidad vascular. ⁽¹²⁾
- Fenómenos celulares que corresponden a la exudación y migración leucocitaria desde la microcirculación hasta el foco inflamatorio. ⁽¹²⁾

1.2.3. AGENTES CAUSALES DE LA INFLAMACIÓN

1.2.3.1 AGENTES FÍSICOS

Se consideran: Traumatismos mecánicos, el calor, el frío, la electricidad y las radiaciones como los rayos X, que dan lugar a la formación de peróxidos, estos últimos determinan la inhibición enzimática, actuando así como agentes flogógenos. ^(11, 12)

1.2.3.2 AGENTES QUÍMICOS

Sustancias como ácidos minerales, álcalis y gases irritantes actúan provocando la desnaturalización de las proteínas celulares. Distintos tóxicos de origen animal y vegetal, especialmente aquellos que están formados por albumosas, peptonas, aminoácidos y grasas pueden provocar inflamación. Aunque la verdadera causa de la inflamación producida por dichos agentes son las lesiones celulares que ocasionan y los productos que se liberan en ellas. ⁽¹¹⁾

1.2.3.3 AGENTES BIOLÓGICOS

Las bacterias, hongos y virus constituyen las causas más frecuentes y clínicamente más importantes de la inflamación. Su mecanismo de acción en el huésped es producir una degradación de los monosacáridos mediante la glucólisis aerobia y anaerobia. ⁽¹¹⁾

La acción de los metabolitos formados como: Dióxido de carbono y ácido láctico producen acidosis del foco inflamatorio. Las bacterias producen una serie de sustancias dotadas de actividad metabólica como nucleasas, proteasas, lipasas, lecitinasas, fosfatasas, en especial una carbohidrasa llamada hialuronidasa que juega un papel importante en la propagación del germen causal y la intensidad de la inflamación. ⁽¹¹⁾

En tanto los virus actúan sobre las células vivas, ingresan en ellas y usan sus sistemas enzimáticos para sintetizar componentes genéticos a costa de las sustancias del huésped originando la muerte de la célula huésped que se convierte en agente inflamatorio, influyen además algunas endotoxinas y la composición química del virus. ⁽¹¹⁾

1.2.4. CLASIFICACIÓN DE LA INFLAMACIÓN

Se clasifica la inflamación según la persistencia de la lesión, sus características clínicas y la índole de la respuesta inflamatoria en aguda y crónica. ⁽¹⁰⁾

1.2.4.1 INFLAMACIÓN AGUDA

Es la reacción inmediata que se produce frente al agente lesivo. Debido a que los dos principales factores defensivos frente a los microorganismos (anticuerpo y leucocitos) son transportados

normalmente por la sangre, no es raro que los fenómenos vasculares intervengan de manera importante en la inflamación.

(13, 14, 15)

La respuesta inflamatoria se produce en el tejido conjuntivo, hacia el cual filtran el plasma y los elementos formes de la sangre, desde los vasos sanguíneos lesionados por la agresión o desde los vasos que se hacen más permeables en respuesta a la lesión. (13, 14, 15)

Se produce así, el enrojecimiento (eritema) por la dilatación de los vasos, el hinchamiento (edema) por el escape de líquido a los tejidos blandos y el endurecimiento por la acumulación de los líquidos y las células. (13, 14, 15)

Estos fenómenos desembocan en la pérdida de la capacidad normal de los vasos sanguíneos para retener en su interior las células y los líquidos; pero estos cambios no significan obligatoriamente una alteración estructural del vaso. (13, 14, 15)

Los neutrófilos son los componentes más numerosos en este tipo de inflamación y se encargan de la fagocitosis de las bacterias y de otros microorganismos extraños. Los monocitos también penetran al tejido conjuntivo durante la inflamación y se transforman en macrófagos que fagocitan las células y los restos tisulares, la fibrina, las bacterias remanentes e incluso los neutrófilos utilizados. Los linfocitos, los eosinófilos y los basófilos se relacionan con los aspectos inmunológicos del proceso inflamatorio. (13, 14, 15)

1.2.4.2 INFLAMACIÓN CRÓNICA

Es una reacción lenta y latente que continua durante meses e incluso años y supone la destrucción tisular, así como la proliferación local de las células y del tejido conjuntivo. (13, 14, 15)

Puede desarrollarse por diferentes causas, como:

- a) La progresión de una inflamación aguda. ^(13, 15)
- b) Episodios recurrentes de inflamación aguda. ^(13, 15)

Se caracteriza por la presencia constante de linfocitos, monocitos y células plasmáticas, debido a que el estímulo nocivo ha sido persistente. ^(13, 14, 15)

La presencia de estas células inflamatorias puede dar lugar a alteraciones funcionales del tejido, ya sea por la acción directa de los mediadores producidos por las células linfoides o bien por el depósito continuo de colágeno por los fibroblastos debido a la cicatrización. ^(13,14, 15, 16)

Los principales tipos celulares que se encuentran en las zonas de inflamación crónica son las células mononucleares y las células anormales derivadas de los macrófagos. ^(14, 15, 16)

1.2.5. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN

La influencia de los mediadores químicos sobre el proceso inflamatorio es un tema de intenso estudio. Los mediadores se originan del plasma o de las células, la mayor parte de ellos realizan su actividad biológica mediante unión a receptores. ^(14, 15, 16)

Un mediador químico puede actuar sobre uno o múltiples tipos de células dianas, la duración de su acción es corta y la mayor parte de ellos pueden producir efectos perjudiciales. ^(14, 15, 16)

1.2.5.1 AMINAS VASOACTIVAS

Histamina y serotonina son las dos principales aminas vasoactivas, llamadas así por su importante acción sobre los vasos. ^(13, 15)

Histamina: se encuentra en mastocitos, basófilos y plaquetas. La histamina es el gran mediador de la fase aguda, sus efectos son:

- Vasodilatación de arteriolas y vénulas. ^(13, 15)
- Alteración de la permeabilidad en las vénulas. ^(13, 15)

Serotonina: almacenada en plaquetas y en células neuroendocrinas, Su liberación se produce gracias al factor activador de plaquetas (PAF). Sus acciones son muy semejantes a las de la histamina. ^(13, 15)

1.2.5.2 METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

- **Prostaglandinas:** PGE₂, PGI₂, PGD₂ que producen vasodilatación, fiebre y dolor. ^(13,16)
- **Tromboxanos:** A₂ (TXA₂) producen agregación plaquetaria y vasoconstricción. ^(13, 16)
- **Leucotrienos:** LTC₄, LTD₄ y LTE₄ producen vasoconstricción, aumento de la permeabilidad y broncoespasmos. ^(13, 16)
- **Leucotrieno:** B₄ que promueve adherencia leucocitaria y quimiotaxis. ^(13, 16)

1.2.5.3 CITOCINAS Y QUIMIOCINAS

Polipéptidos producidos por linfocitos y macrófagos activados que modulan la función de otras células. ^(13, 16)

Las principales citosinas que actúan como mediadores en la inflamación son: La interleucina I, el factor de necrosis tumoral alfa (IL-1, FNT α ; ambos secretados por macrófagos activados), el FNT β (secretado por células T activadas) y la familia de la IL – 8 (secretada por macrófagos activados y otros tipos celulares). Actúan sobre el endotelio, leucocitos y fibroblastos, así como en la inducción de las reacciones sistémicas de la fase aguda. ^(13, 16)

1.2.6. INFLAMACIÓN EXPERIMENTAL (MÉTODOS)

1.2.6.1 INACTIVACIÓN DE RADICALES SUPERÓXIDOS (O_2^*)

El objetivo de esta prueba es valorar la cantidad de O_2^* generados a partir de macrófagos aislados de un exudado peritoneal formado por inyección intraperitoneal de aceite de parafina en cobayo. Después de tres días se extrae el exudado y se aíslan los macrófagos. ^(17, 18, 19, 20)

Los O_2^* se determinan espectrofotométricamente por disminución en la absorbancia de NADH como consecuencia de su oxidación a NAD^+ en presencia de O_2^* . La disminución de la absorción es proporcional a la cantidad de O_2^* disponible en el medio de reacción. ^(17, 18, 19, 20)

1.2.6.2 EFECTO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS “IN VIVO”

Primero se induce una pleuritis experimental por inyección intrapleural de carragenina. El producto en estudio se administra una hora antes. Después de 24 horas los animales se sacrifican para extraerles el líquido pleural, el cual se centrifuga y se valora el contenido de PGE_2 por radioinmuno ensayo (RIA). Se compara la concentración media de PGE_2 en el exudado del grupo tratado con respecto al grupo control. ^(17, 18, 19, 20)

1.2.6.3 EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATAS

Se basa en determinar la inhibición del edema inducido por carragenina en ratas tratadas con antiinflamatorios. ^(17, 18, 19, 20)

La pata posterior derecha se inyecta con 0.1 mL de carragenina al 1 % disuelto en una solución salina al 0,9 % en la región subplantar. Los extractos y la droga de referencia se aplican tópicamente dos horas después de la inyección de carragenina. La inflamación se cuantifica por medición del volumen desplazado por la pata, usando una columna de mercurio o un pletismómetro antes y 1, 3, 6, 12 y 24 horas después de aplicada la inyección de carragenina. La diferencia entre el volumen de la pata posterior derecha e izquierda indica el grado de inflamación. ^(17, 18, 19, 20)

El porcentaje de inhibición del edema se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(T_{max} - T_x)}{(T_{max} - T_0)} \times 100$$

Donde:

T_{max}: Tiempo en el que el grado de inflamación es máximo (3h).

T_x: Volumen de inflamación (mL.) que se va a determinar.

T₀: Volumen de la pata de la rata en un tiempo inicial.

1.3. GELES

Los geles son sistemas dispersos, por lo general transparentes o translúcidos, formados por líquidos (hidrófilos o hidrófobos) a los que se adicionan sustancias de naturaleza coloidal capaces de formar una estructura continua, cuya naturaleza y características definen las propiedades reológicas del conjunto. ^(21, 22)

Otro modo de definir los geles es a partir de su método de obtención; en este sentido, éstos se obtienen a partir de soluciones coloidales que, por diferentes

modificaciones en su entorno, adquieren una estructura ordenada tridimensional que fija las partículas de soluto alrededor de las del coloide. (21, 24)

1.3.1. TIPOS DE GELES

Existen dos clases. (22, 24)

1.3.1.1 GELES HIDRÓFOBOS

Son geles constituidos por parafina líquida adicionada de polietileno o por aceites grasos gelificados por anhídrido silícico coloidal. (22, 24)

Los lipogeles son vehículos oleosos oclusivos, de muy diversa consistencia, que los hace aptos para el tratamiento de la dermatosis crónica, por su acción emoliente – lubricante. (22, 24)

1.3.1.2 GELES HIDRÓFILOS

Las bases de los geles hidrófilos (hidrogeles) por lo general consisten en agua, glicerol o propilenglicol gelificados con agentes gelificantes como tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros de carboxivinilo, silicatos de magnesio y aluminio. (21, 22, 24,)

1.4. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS VEGETALES

Separación de las sustancias biológicamente activas de los materiales inertes o inactivos de una planta, a partir de la utilización de un disolvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado; donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente y el residuo. (24, 25, 37)

1.4.1. TIPOS DE EXTRACCIONES CON DISOLVENTES

1.4.1.1 EXTRACCIÓN DISCONTINUA

También llamado simultánea, se sumerge la droga en el disolvente, por lo que la totalidad de la droga contacta con el disolvente utilizado para extracción y la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio.^(25, 37)

La extracción discontinua incluye varios procedimientos de extracción.^(25, 37)

MACERACIÓN

Consiste en poner en contacto la droga seca triturada con el disolvente utilizado para la extracción a temperatura ambiente, manteniéndolo todo en agitación durante un tiempo determinado que depende de las características de la droga y de la naturaleza de los principios activos.⁽²⁵⁾

Se utiliza generalmente agua glicerina o mezclas hidroalcohólicas. A continuación se decanta el conjunto obteniéndose por una parte el extracto líquido con los principios activos y por otra un residuo de la droga denominado marco.^(25, 37)

Para mejorar el rendimiento de la extracción es habitual volver a realizar otra maceración con el marco. La maceración se utiliza cuando los principios activos son muy solubles y la estructura de la droga es muy permeable al disolvente (hojas, flores poco compactas).^(25,37)

DIGESTIÓN

Es un método extractivo similar a la maceración, pero en el que se trabaja a temperaturas más elevadas.^(25,37)

INFUSIÓN

Se trabaja con un disolvente (agua) a temperatura próxima a la ebullición, en el que se introduce la droga que se quiere extraer y a continuación se deja enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente. ^(25,37)

DECOCCIÓN O COCIMIENTO

Se pone en contacto la droga con el disolvente (agua) y el conjunto se lleva hasta la temperatura de ebullición, manteniendo dicha ebullición durante 15 a 30 min. Una vez enfriado se filtra y se exprime el residuo, el tiempo de decocción depende de las características de la droga, es menor para drogas vegetales blandas (hojas y flores) y mayor para drogas vegetales duras (corteza y semillas). ^(25,37)

Tanto en las infusiones como decocciones se utiliza como disolvente siempre el agua, por lo que no resultan ser métodos adecuados para extraer principios activos hidrolizables. ^(25,37)

1.4.1.2 EXTRACCIÓN CONTINUA

También llamado progresiva, el disolvente utilizado para la extracción se va renovando y actúa en una sola dirección. Son métodos que consisten en poner en contacto la droga con el disolvente adecuado y mantener en todo momento el desequilibrio entre la concentración de principio activo en la droga y en el disolvente para que se produzca la difusión celular. ⁽²⁵⁾

Mediante estos procedimientos se puede llegar a la extracción prácticamente completa de los principios activos de la droga. ⁽²⁵⁾

PERCOLACIÓN

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 se encuentra la droga con los principios activos, los va extrayendo y, por la parte inferior, se recogen los líquidos extractivos que contienen los principios activos, la percolación puede llegar a conseguir extracción prácticamente completa de la droga, pero con un elevado consumo de disolvente. ^(25,37)

SOXHLET

Es un sistema de extracción sólido-líquido en el que la extracción se realiza en un aparato que consta de un matraz, un cuerpo extractor y un refrigerante. En el cuerpo extractor se coloca la droga, generalmente envuelta en un material poroso que permita el contacto con el disolvente. En el matraz se coloca el disolvente orgánico, se lleva a ebullición y los vapores del disolvente ascienden por el tubo lateral y llegan al refrigerante donde condensan y caen sobre la droga situada en el cuerpo extractor cuando el cuerpo extractor se llena de líquido extractivo, este se vacía por el sifón lateral interno y desemboca en el matraz. ^(25,37)

El disolvente orgánico se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en el matraz inferior. ^(25,37)

CAPÍTULO II MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La elaboración de los extractos, formulación del gel, la investigación cromatográfica y el estudio en animales de experimentación fueron realizados en el laboratorio de Farmacognosia (H - 206) ubicado en la Universidad Católica De Santa María.

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se realizó con ratas machos y hembras de la especie *Rattus rattus*, de la raza “Holtzman”.

Se utilizaron 20 ratas, que fueron divididos en tres grupos. Como se detalla a continuación. (**Tabla N° 2.1**)

Tabla N° 2.1: Diseño Experimental

GRUPO	NOMINACIÓN	N° ANIMALES	TRATAMIENTO
G ₁	Grupo 1	10	Aplicación tópica del gel con extracto seco de <i>Polypodium crasifolium</i> al 20 %.
G ₂	Grupo 2	10	Aplicación tópica del extracto seco diluido al 20 % de <i>Polypodium crasifolium</i>
GC	Grupo control	10	Aplicación tópica del gel base.

Fuente: Elaboración propia

2.3. MATERIALES

2.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.3.1.1 UNIDAD VEGETAL

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron los rizomas secos de *Polypodium crassifolium* L. “Calaguala”

2.3.1.2 UNIDAD ANIMAL

Estos animales fueron utilizados para determinar el efecto antiinflamatorio de *Polypodium crassifolium* L. “Calaguala”, para efectuar el presente trabajo de investigación se escogió un total de 20 ratas machos y hembras de la raza “Holtzman”, especie *rattus rattus*, variedad albina, con un peso promedio que varía de 200 hasta 300 g, adultos jóvenes (aparentemente sanos sin diferencia) alrededor de 5 meses de vida obtenidas del bioterio de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

2.3.2. MATERIAL DE LABORATORIO

2.3.2.1 Material de Vidrio

- Vasos de precipitado de 50, 100, 250 y 500mL.
- Baguetas (LBT).
- Embudos.
- Pipetas de 1mL, 2mL, 5mL y 10mL.
- Tubos de ensayo.
- Matraces Erlenmeyer 25mL, 50mL, y 100mL.
- Probetas de 10mL, 50mL y 100mL.
- Balones de 250mL.
- Capilares.
- Frasco de vidrio.
- Termómetro.

2.3.2.2 Equipos

- Balanza Analítica OHAUS PIONEER TM.
- Pletismómetro Digital L.E. 7500.
- Cámara para Cromatografía de Capa Fina.
- Lámpara de Luz UV CAMAG.
- Equipo Evaporador Rotativo BUCHZ Switzerland R-114.
- Equipo de extracción de Soxhlet.
- Estufa Esterilizadora 854 Shwabach-Germany.
- Baño María.

2.3.2.3 Otros Materiales

- Jaulas metálicas para ratas.
- Cromatofolios de Sílica Gel.
- Algodón.

- Jeringas de 1mL.
- Lápiz marcador.
- Papel filtro.
- Potes.
- Dosificador de gel.
- Espátulas.
- Tijeras.
- Papel aluminio.
- Frasco de plástico de 1000mL.
- Mortero.
- Gradillas.
- Soporte universal.
- Cocina eléctrica.
- Guantes quirúrgicos.
- Pissetas.
- Pabilo.

2.3.3. REACTIVOS

- Acetato de etilo J.T. BAKER (Q.P.).
- Acetato de plomo RIEDEL-DE HAEN (Q.P.).
- Ácido acético J.T. BAKER (Q.P.).
- Ácido fórmico MERCK (Q.P.).
- Ácido sulfúrico MERCK (Q.P.).
- Agua destilada.
- Alcohol etílico comercial.
- Amoníaco MERCK (Q.P.).
- Butanol RIEDEL-DE HAEN (Q.P.).
- Carboximetilcelulosa LABOCHINI.
- Hexano J.T. BAKER (Q.P.).
- Formol PIREX (Q.P.).
- Metanol MERCK.

- Metilparabeno NEQUINSA.
- Propilenglicol MERCK.
- Propilparabeno NEQUINSA.
- Tolueno J.T. Baker (Q.P.).
- Tricloruro de aluminio 5 % RIEDEL-DE HAEN (Q.P.).
- Trietanolamina MERCK.
- Vainillina NEQUINSA.
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Libermann Burchard.
- Reactivo de Baljet.
- Hidróxido de sodio 5 %.
- Reactivo Felling A y B.
- Cloruro férrico 5 %.
- Hidróxido de potasio 5 % en etanol.
- Hidróxido de potasio 10 % en etanol.

2.4. MÉTODOS

2.4.1. PROCESAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

2.4.1.1 RECOLECCIÓN

El rizoma de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) fue recolectado en la frontera entre Puno - Madre de Dios y trasladada a la ciudad de Arequipa, para su identificación taxonomía en la facultad de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín.

2.4.1.2 SELECCIÓN

Una vez recolectados e identificados taxonómicamente los rizomas del helecho *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala), se escogió los rizomas en buen estado, dejando de lado aquellos que presentaban

insectos, rupturas, o en estado de descomposición, seguidamente se procedió a lavarlos para arrastrar las impurezas.

2.4.1.3 ESTABILIZACIÓN

Para evitar la degradación de las sustancias activas del rizoma de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) se estabilizó en seco, en una estufa previamente atemperada a 80 °C, durante 5 minutos.

2.4.1.4 DESECACIÓN

La desecación del rizoma de *Polypodium crassifolium* L. (Calaguala) se realizó mediante calor artificial en estufa de desecación, con este propósito se utilizó un equipo eléctrico, previamente calentado a 50 °C, en este ambiente permaneció hasta peso constante.

2.4.1.5 PULVERIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Luego de desecar convenientemente el rizoma se procedió a pulverizar con un mortero hasta un polvo uniforme, con el propósito de incrementar la superficie de contacto para el momento de las extracciones con los solventes y facilitando de esta manera las extracciones de los metabolitos, para luego ser recolectado en papel craft debidamente rotulado y guardado en un lugar cerrado, a una temperatura adecuada, libre de humedad y lejos de la luz solar para su correcto almacenamiento y conservación.

2.4.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS

2.4.2.1 MÉTODO

Extracción por equipo Soxhlet.

2.4.2.2 FUNDAMENTO

Consiste en un sistema cerrado que permite el flujo de solvente en ciclos, los equipos de Soxhlet constan de tres partes: un reservorio de solvente en la parte inferior, el cual es un balón donde se coloca el solvente extractor y se somete a ebullición; la segunda parte es un soporte para el material vegetal el cual se coloca empaquetado en papel filtro; finalmente se tiene un refrigerante o condensador el cual recibe los vapores del solvente que vienen desde el balón y los condensa para hacer gotear el solvente sobre el material vegetal, cuando el soporte que mantiene el material vegetal se llena de solvente recién destilado, se activa espontáneamente un sifón que hace que el extracto formado pase al balón donde continua en ebullición, cada llenada de solvente en el soporte de muestra es un ciclo y pueden repetirse varios ciclos de extracción hasta el agotamiento de la muestra. ⁽²⁵⁾ (Figura N° 2.1)

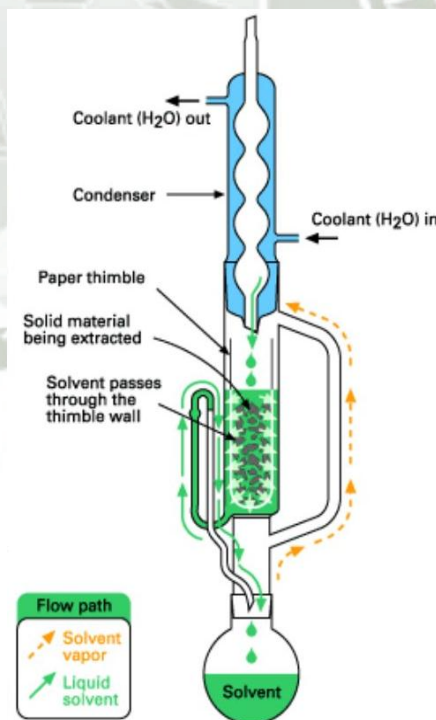


Figura N°2.1: Equipo Soxhlet.

Fuente: www.cenunez.com.ar

2.4.2.3 PROCEDIMIENTO

- Se procedió a pesar y empaquetar 10 g del material vegetal desecado y pulverizado en una hoja de papel filtro, el cual recibió el nombre de cartucho y fue colocado en el extractor que forma parte del equipo de Soxhlet.
- En el balón del equipo extractor se colocó 100 mL del solvente indicado, usando solventes de distintas polaridades (etanol, cloroformo, hexano), y se procedió a armar el equipo, colocando el balón en una olla con agua para que sirva como baño maría a una temperatura de 80 °C, por un tiempo de 6 horas hasta que el solvente haya agotado toda la muestra del cartucho.
- Finalmente se procedió a desarmar el equipo enfriándolo previamente y se obtuvo el extracto indicado. (**Figura N° 2.2**)



Figura N°2.2: Equipo Soxhlet

Fuente: Elaboración propia

2.4.3. DETERMINACIÓN DEL EXTRACTO SECO

2.4.3.1 MÉTODO

Evaporación a sequedad.

2.4.3.2 FUNDAMENTO

Se basa en la obtención del extracto seco a partir de la separación del solvente y del principio activo aplicándose una temperatura adecuada y sometiéndose el extracto a baño maría, hasta la evaporación total del solvente, quedando suspendido en el fondo del recipiente el principio activo que se desea obtener. ^(25, 26)

2.4.3.3 PROCEDIMIENTO

Se tomó el extracto etanólico obtenido de la extracción por Soxhlet, se colocó en un balón para su evaporación mediante el equipo rotavapor, seguidamente se procedió a su evaporación por sequedad en un vaso de vidrio previamente tarado, para luego ser llevado a baño maría a una temperatura de 78 °C para la evaporación de solvente hasta la aparición del residuo con peso constante, al término del cual se procedió a determinar el porcentaje de rendimiento de extracto seco.

2.4.3.4 CÁLCULOS

$$\% \text{ ES} = \frac{\text{Pf}}{\text{Pi}} \times 100$$

Dónde:

Pi = Peso inicial.

Pf = Peso final.

% ES = Porcentaje de extracto seco.

2.4.4. SCREENING FITOQUÍMICO

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta. Estas reacciones se caracterizan porque son selectivas para las clases o grupos de compuestos que se investigan, son simples y rápidas, detectan la mínima cantidad posible y utilizan un mínimo de equipo de laboratorio. ⁽⁹⁾

2.4.4.1 ENSAYO DE DRAGENDORFF.

Utilizado para detectar la presencia de *alcaloides*, se debe tomar en cuenta que si el extracto está disuelto en solvente orgánico, este debe evaporarse en baño maría y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si se trata de un extracto acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Para el ensayo, a la solución acuosa ácida se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa: ^(9, 40, 41)

- Opalescencia: (+) ^(9, 40, 41)
- Turbidez definida: (++) ^(9, 40, 41)
- Precipitado: (+++) ^(9, 40, 41)

2.4.4.2 ENSAYO DE MAYER.

Se procede de la forma descrita previamente. A la solución ácida se le adiciona una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agita y se filtra. Al filtrado adicionar 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer. Tras observación se reporta de la siguiente manera: ^(9, 40, 41)

- Opalescencia: (+) ^(9, 40, 41)
- Turbidez definida: (++) ^(9, 40, 41)
- Precipitado abundante: (+++) ^(9, 40, 41)

2.4.4.3 ENSAYO DE WAGNER.

Se parte de la solución ácida, de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución, se le adiciona 2 o 3 gotas del reactivo de Wagner y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior. ^(9, 40, 41)

2.4.4.4 ENSAYO DE BALJET.

Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular *Cumarinas*, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultado positivo. Si la alícuota de la muestra a probar no está en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en 1 mL de alcohol. Seguidamente, se añade 1 mL del reactivo. La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo (++ y +++) respectivamente. ^(9, 40, 41)

2.4.4.5 ENSAYO DE BORNTRAGER.

Es útil para detectar la presencia de *Quinonas*. Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo se disuelve en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. ^(9, 40, 41)

El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) o rojo, para lo cual se reporta (+++). (9, 40, 41)

2.4.4.6 ENSAYO DE LIEBERMAN-BUCHARD.

Permite reconocer en un extracto la presencia de *Triterpenos* y/o *Esteroides*. Para ello, si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño maría y el residuo se disuelve en 1 mL de cloroformo. (9, 40, 41)

Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2 o 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración: (9, 40, 41)

- Rosado-azul muy rápido. (9, 40, 41)
- Verde intenso-visible aunque rápido. (9, 40, 41)
- Verde oscuro-negro-final de la reacción. (9, 40, 41)

El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos. Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente. (9, 40, 41)

Las estructuras esteroidales producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las estructuras de los triterpenoides se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes. (9, 40, 41)

2.4.4.7 ENSAYO DE FEEHLING.

Permite reconocer en un extracto la presencia de *Azúcares reductores*. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño maría y el residuo se disuelve en 1 o 2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño maría de 5 a 10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

(9, 40, 41)

- **Solución A:** Se pesa 35 g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000 mL. (9, 40, 41)
- **Solución B:** Se pesa 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000 mL. (9, 40, 41)

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar. (9, 40, 41)

2.4.4.8 ENSAYO DE ESPUMA.

Permite reconocer en un extracto la presencia de *Saponinas*. Si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos. (9, 40, 41)

2.4.4.9 ENSAYO DEL CLORURO FÉRRICO.

Permite reconocer la presencia de *Compuestos fenólicos* y/o *Taninos* en el extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. ^(9, 40)

A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general: ^(9, 40, 41)

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general. ^(9, 40, 41)
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos. ^(9, 40, 41)
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos. ^(9, 40, 41)

2.4.4.10 ENSAYO DE SHINODA.

Permite reconocer la presencia de *Flavonoides* en el extracto. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición

del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos. ^(9, 40, 41)

2.4.5. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA CAPA FINA (TLC)

2.4.5.1 MÉTODO

Cromatografía en capa fina, o también llamada “Thin Layer Chromathography (TLC)”, es una de las técnicas más utilizadas para la separación y purificación de sustancias químicas. ⁽⁴¹⁾

2.4.5.2 FUNDAMENTO

En la cromatografía de capa fina, la muestra se desplaza con una fase móvil que es un líquido. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria de gel de sílice o alúmina con la que es inmisible, y que se fija a una superficie sólida como una lámina de vidrio, plástico o aluminio. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto. Entre la fase móvil y la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, la cual sube a lo largo de la fase solida por capilaridad, por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionario, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativamente. ⁽³⁹⁾

2.4.5.3 PROCEDIMIENTO

Se procedió a cortar las placas de sílica gel 60 F₂₄₅ con dimensiones de 10 x 2 cm, se realizó una línea con un lápiz 1 cm

por encima de la parte inferior y 1 cm debajo de la parte superior. Luego se procedió a realizar los sembrados correspondientes del extracto en cada placa utilizando capilares para dicha operación (**Figura N° 2.3**), finalmente se colocó las placas ya sembradas en cámaras de desarrollo cromatográfico (**Figura N° 2.4**) conteniendo los diferentes solventes para realizar la corrida, estando estos herméticamente cerrados y protegidos de la luz envueltos con papel aluminio para una correcta identificación de los componentes, en algunos casos se utilizaron reveladores químicos y uso de lámpara de luz UV.



Figura N° 2.3: Sembrado en placa cromatográfica.

Fuente: Elaboración propia.

2.4.5.4 FACTOR DE RETRASO

El parámetro característico para cada soluto está dado por el R_f :

$$R_f = \frac{\text{Distancia Recorrida por el Compuesto}}{\text{Distancia Recorrida por el Disolvente}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide generalmente desde el centro de la mancha, los cálculos se simplifican si el

denominador es 10. Para que los R_f sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (Espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de R_f que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un R_f entre 0.55 y 0.7. Téngase en cuenta que si las manchas no son simétricas, la medición se basa en la posición de intensidad máxima.^(36,37)



Figura N° 2.4: Cuba cromatográfica.

Fuente: Elaboración propia.

2.4.5.5 IDENTIFICACIÓN DE QUINONAS

- **Preparación de la Fase Móvil:** acetato de etilo: metanol: agua (100:13.5:10)

Se agregó 10 mL de acetato de etilo en un vaso precipitado, se mezcló con 1,35 mL de metanol y 1 mL de agua.

- **Preparación de la Fase Estacionaria:**

Se cortó la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ en una lámina de 2x10 cm (ancho : largo), se marcó los lugares de siembra

de la muestra con lápiz, dejando 1cm de espacio inferior y se procedió al sembrado.

➤ **Preparación de la Muestra**

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ con cuidado y correcta limpieza.

➤ **Desarrollo**

Se colocó la placa sembrada en la cámara de revelado cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

➤ **Detección**

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente, se reveló con KOH (10 % en etanol comercial), se secó al medio ambiente y se procedió a observar la placa en luz UV 254nm y UV a 366nm.

➤ **Determinación de R_f**

Se calculó los R_f de cada una de las manchas características de quinonas reveladas en las placas cromatográficas.

Antraquinonas: zona rojas en visible y fluorescencia roja en UV a 366nm.

Antronas y antranolas: zonas amarillas en visible y fluorescencia amarilla en UV a 366nm.

2.4.5.6 IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS

- **Preparación de la Fase Móvil:** n-butanol: acetato de etilo: agua (50:10:40)

Se agregó 5 mL de n-butanol en un vaso de precipitado, se mezcló con 4 mL de acetato de etilo y se adicionó ligeramente 1 mL de agua.

- **Preparación de la Fase Estacionaria**

Se cortó la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ en una lámina de 2x10 cm (ancho : largo), se marcó los lugares de siembra de la muestra con lápiz, dejando 1cm de espacio inferior y se procedió al sembrado.

- **Preparación de la Muestra**

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ con cuidado y correcta limpieza.

- **Desarrollo**

Se colocó la placa sembrada en la cámara de revelado cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

- **Detección**

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente, se reveló con vainillina (1 % en etanol comercial), ácido sulfúrico concentrado (5 % en etanol comercial), se secó al medio

ambiente y se procedió a observar la placa en luz UV a 366nm.

➤ **Determinación de Rf**

Se calculó los Rf de cada una de las manchas características de saponinas reveladas en las placas cromatográficas.

Saponinas (manchas de color anaranjadas rojizas)

2.4.5.7 IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

➤ **Preparación de la Fase Móvil:** metanol, agua (90:10)

Se agregó 9 mL de metanol en un vaso precipitado, se mezcló ligeramente con 1 mL de agua.

➤ **Preparación de la Fase Estacionaria**

Se cortó la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ en una lámina de 2x10 cm (ancho : largo), se marcó los lugares de siembra de muestra con lápiz, dejando 1 cm de espacio inferior y se procedió al sembrado.

➤ **Preparación de la Muestra**

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto, se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ con cuidado y correcta limpieza.

➤ **Desarrollo:**

Se colocó la placa sembrada en la cámara de revelado cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm

debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

➤ **Detección**

Se retiró la placa, se secó al medio ambiente, se reveló con FeCl_3 al 1 % en etanol (0,25 mL de cloruro férrico en 25 mL de etanol), se secó al medio ambiente y después se sometió la placa a 110 °C durante 10 min.

➤ **Determinación de Rf:**

Se calculó los Rf de cada una de las manchas características de taninos revelados en las placas cromatográficas.

Taninos (manchas de color verdes o marrones).

2.4.5.8 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

➤ **Preparación de la Fase Móvil:** acetato de etilo: metanol (90:10)

Se agregó 9 mL de acetato de etilo en un vaso precipitado, se mezcló ligeramente con 1 mL de metanol.

➤ **Preparación de la Fase Estacionaria**

Se cortó la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ en una lámina de 2x10 cm (ancho : largo), se marcó los lugares de siembra de muestra con lápiz, dejando 1 cm de espacio inferior y se procedió al sembrado.

➤ **Preparación de la Muestra**

Se tomó con el capilar la solución etanólica del extracto.

Luego se colocó en el lugar de siembra de la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ con cuidado y correcta limpieza.

➤ **Desarrollo**

Se colocó la placa sembrada en la cubeta de desarrollo cromatográfico, hasta que el solvente ascienda hasta 1 cm debajo del borde superior, herméticamente cerrado y cubierto con papel aluminio para su correcto desarrollo.

➤ **Detección**

Se retiró la placa, una vez que la placa está seca, se procede a revelar con cloruro de aluminio 1 % en etanol comercial (0,25 g de cloruro de aluminio en 25 mL de etanol), se secó al medio ambiente y se procedió a observar la placa en luz UV a 366 nm.

➤ **Determinación de R_f**

Se calculó los R_f de cada una de las manchas características de flavonoides revelados en las placas cromatográficas.

Flavonoides (manchas de color amarillo)

2.4.6. PREPARACIÓN Y FÓRMULACIÓN DEL GEL

2.4.6.1 OBJETIVO

Describir la sistemática para la elaboración del gel a base de calaguala utilizando como gelificante carbopol.

2.4.6.2 RESPONSABILIDADES DE APLICACIÓN Y ALCANCE

La responsabilidad de aplicación y alcance de este procedimiento recae sobre todo el personal de laboratorio (técnico y/o auxiliar) que proceda a la elaboración de emulsiones.

2.4.6.3 INGREDIENTES USADOS EN LA FÓRMULACIÓN DEL GEL

- Carbopol 940.
- Nipagin ® (metilparabeno).
- Nipasol ® (propilparabeno).
- Propilenglicol.
- Trietanolamina.
- Agua destilada.
- Extracto seco del rizoma de calaguala.

2.4.6.4 FÓRMULACIÓN DEL GEL BASE Y DEL GEL CON EXTRACTO SECO DE CALAGUALA

Véase (**Anexos N° 1**)

2.4.6.5 MODUS OPERANDI

- Verificar la limpieza de los enseres y materiales necesarios para la fabricación.
- Pesar cuidadosamente los ingredientes.
- Dispensar el carbopol en parte del diluyente, agitando constantemente y evitando la formación de grumos.
- Dejar reposar el tiempo suficiente hasta la total imbibición del diluyente.

- Agitar evitando la incorporación de aire, hasta obtener un gel uniforme.
- Disolver el extracto seco de calaguala en un solvente adecuado (etanol 96 %).
- En un recipiente disolver los parabenos, el propilenglicol, el extracto de calaguala diluido y agua destilada en baño maría a 50 °C.
- Incorporar la solución descrita anteriormente en el vaso de precipitado que contiene el gel, con ayuda de un agitador magnético.
- Adicionar el agua destilada hasta completar un peso de 100 g y lograr la uniformidad del gel.
- Adicionar al gel la trietanolamina gota a gota hasta que el pH sea de 7.
- Terminado este proceso, se procede a envasar el gel en recipientes adecuados para su conservación.

2.4.7. TÉCNICA PARA MEDIR EL GRADO DE INFLAMACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

2.4.7.1 MÉTODO

El método de edema plantar inducido por carragenina fue descrito por Winter et al. posteriormente modificado por Sugishita et al. (1981).

2.4.7.2 FUNDAMENTO

Consiste en la administración subcutánea de una solución de carragenina, un mucopolisacarido sulfatado extraído del alga marina *Chondrus crispus*, a nivel de la aponeurosis plantar de la

pata de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por liberación de diversos autacoides (histamina, serotonina, bradiquinina, prostaglandinas).

Una hora después de la administración, la histamina y la serotonina tienen un papel principal como mediadores. Aproximadamente de una hora y media a dos y media horas después de la inyección de carragenina, intervienen las quininas como mediadores.

La última fase está mediada por las prostaglandinas, fundamentalmente PGE_1 , PGE_2 y PGF_3 . La respuesta vascular máxima ocurre aproximadamente a las 3 horas de la administración de carragenina y coincide con la fase mediada por la prostaglandinas.

El volumen inflamado es medido con el pletismómetro digital LE7500 equipo que es utilizado en nuestro método de estudio.

(Figura N° 2.5)



Figura N° 2.4: Pletismómetro digital.

Fuente: Elaboración propia.

2.4.7.3 PROCEDIMIENTO

- Se distribuyó las ratas según el grupo de tratamiento al azar y se las identifico según el grupo asignado.
- Se midió el volumen de la pata derecha posterior de las ratas de los grupos experimentales en el pletismómetro digital.
- Se administró 0.1 ml de una solución de carragenina al 1 % en suero fisiológico; en la pata derecha posterior de cada rata.
- Se administró los tratamientos:
 - Grupo 1: se administró tópicamente el gel con extracto seco de calaguala al 20 % en la pata posterior derecha.
 - Grupo 2 se administró tópicamente el extracto seco de calaguala diluido al 20 % en la pata posterior derecha.
 - Grupo control: se administró tópicamente el gel base en la pata posterior izquierda.
- Se realizó lectura de la pata posterior derecha después de 3, 5, 7, 9 y 15 horas, luego de cada lectura se aplicó un nuevo tratamiento.
- Se halló el porcentaje de inflamación de cada grupo, mediante la siguiente fórmula, considerando el volumen inicial medido.
(Anexos Fórmula N° 1)

2.4.8. GRUPOS DE ESTUDIO

En el presente trabajo se emplearon 20 ratas. Los animales de experimentación se dividieron en 2 grupos de 10 ratas cada uno como se describe a continuación:

- **GE1 Grupo experimental 1:** Aplicación tópica del gel con extracto seco *Polypodium crassifolium* (Calaguala) al 20 %, tres horas después de producirse la inflamación.
- **GE2 Grupo experimental 2:** Aplicación tópica del extracto seco de *Polypodium crassifolium* (Calaguala) diluido al 20 %, tres horas después de producirse la inflamación.
- **Grupo control:** Se le aplicó tópicamente gel base tres horas después de producir la inflamación, para medir la intensidad de la misma.

2.4.8.1 PROCEDIMIENTO

- Se procede a marcar la pata de la rata a nivel de la unión entre la fíbula y la tibia con el tarso para saber hasta dónde se va a introducir la pata en el recipiente del equipo pletismómetro digital.
- Medir el volumen inicial de la pata (T_0).
- Administrar 0.1 mL de carragenina al 1 % a través de una aguja hipodérmica de 25 G x 5/8 pulgada.
- Para evaluar la inflamación producida por la carragenina se espera un tiempo de 3 horas (previo ensayo) en el cual se logra la inflamación máxima (constante).
- Medir el volumen de la pata en tiempo antes mencionado (T_{max}).
- Seguidamente se le aplica los tratamientos a estudiar de *Polypodium crassifolium* (Calaguala), tomando en cuenta la distribución de grupos a trabajar (**Tabla N° 2.1**).
- Se procede a medir el volumen de la pata cada dos horas en el equipo antes mencionado (**Anexo N° 2**).
- Con los datos obtenidos por el pletismómetro digital, se determinó el porcentaje de inhibición de la inflamación haciendo uso de la siguiente fórmula. (**Anexo Fórmula N° 1**)

2.4.9. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La estadística nos permite evaluar y comparar cuantitativamente los efectos de las drogas. Para la interpretación y análisis de datos se usaron los siguientes instrumentos estadísticos. ^(42, 43,44)

2.4.9.1 PARÁMETROS DE DISTRIBUCIÓN

2.4.9.1.1 MEDIA ARITMÉTICA

La media aritmética también conocida como promedio aritmético se obtiene sumando todos los valores individuales de los elementos divididos por la cantidad de éstos. ^(42, 43,44)

$$\bar{X} = \frac{\alpha_i + \dots + \alpha_n}{n}$$

Dónde:

\bar{X} = Media aritmética o promedio

α_i = Correspondiente a cada valor

n = Número de Elementos

2.4.9.2 PARÁMETROS DE DISPERSIÓN

2.4.9.2.1 VARIANZA

Cuando los valores de un conjunto de observaciones se encuentran ubicados cerca de su media, la dispersión es menor que cuando están esparcidos. En consecuencia, se puede pensar intuitivamente que es posible medir la dispersión en

función del esparcimiento de los valores alrededor de su media. Esta medición se efectúa mediante lo que se conoce como *varianza*. Para calcular la varianza de una muestra de valores, se resta la media de cada uno de los valores individuales, las diferencias se elevan al cuadrado y después se suman entre sí. Esta suma de desviaciones elevadas al cuadrado de los valores con respecto a la media se divide entre el tamaño de la muestra, menos 1, para obtener la varianza de la muestra. Se le asigna la letra s^2 para simbolizar la varianza de la muestra, el procedimiento descrito se expresa como sigue: ^(42, 43,44)

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

2.4.9.2.2 DESVIACIÓN ESTÁNDAR

Índice numérico de la dispersión de un conjunto de datos (o población). Mientras mayor es la desviación estándar, mayor es la dispersión de la población. La desviación estándar es un promedio de las desviaciones individuales de cada observación con respecto a la media de una distribución. Así, la desviación estándar mide el grado de dispersión o variabilidad. En primer lugar, midiendo la diferencia entre cada valor del conjunto de datos y la media del conjunto de datos. Luego, sumando todas estas diferencias individuales para dar el total de todas las diferencias. ^(42, 43,44)

Por último, dividiendo el resultado por el número total de observaciones para llegar a un promedio de las distancias entre cada observación individual y la media. Este promedio de las distancias es la desviación estándar y de esta manera representa dispersión. ^(42, 43,44)

2.4.9.3 ESTADÍSTICA INFERENCIAL

2.4.9.3.1 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

El análisis de varianza sirve para comparar si los valores de un conjunto de datos numéricos son significativamente distintos a los valores de otro o más conjuntos de datos. El procedimiento para comparar estos valores está basado en la varianza global observada en los grupos de datos numéricos a comparar. ^(42, 43,44)

Típicamente, el análisis de varianza se utiliza para asociar una probabilidad a la conclusión de que la media de un grupo de puntuaciones es distinta de la media de otro grupo de puntuaciones. Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de varios factores. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los grupos que se desean comparar. ^(42, 43,44)

2.4.9.3.2 TEST HDS DE TUKEY

Se aplica una vez obtenidos los resultados del análisis de varianza ANOVA, requiere que haya diferencia significativa en ANOVA. Es una prueba de comparación múltiple de no hallarse significancia en la prueba de ANOVA, no será necesario realizar el Test de Tukey. ^(42, 43,44)

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los pares en comparación indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0 % de confianza. Se identifican los grupos homogéneos

según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. ^(42, 43,44)

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0 % de error al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0. ^(42, 43,44)



CAPÍTULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS Y DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.

Para la prueba piloto se realizaron tres tipos de extractos utilizando solventes de distintas polaridades a fin de identificar con qué tipo de solvente se extraerá mejor los metabolitos secundarios que tenga el efecto antiinflamatorio.

3.1.1. EXTRACCIÓN ETANÓLICA

Se pesó 10 g de muestra pulverizada, se empaquetó en papel filtro rápido para luego ser introducido en el equipo de digestión continua (Soxhlet), en el balón se colocó 100 mL de etanol como menstruo. (Figura N° 3.1)

Para la obtención del extracto seco se llevó este al rotavapor a una temperatura de 70 °C hasta obtener un volumen de 25 mL el cual es llevado a la estufa a 60 °C para desecación completa.

Luego se pesó el recipiente con el material seco siendo su rendimiento del 18%. (Tabla N° 3.1)



Figura N° 3.1: Extracción con etanol.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.2. EXTRACCIÓN HEXÁNICA

Se pesó 10 g de muestra pulverizada, se empaquetó en papel filtro para luego ser introducido en el equipo de digestión continua (Soxhlet), en el balón se colocó 100 mL de hexano como menstuo. (Figura N° 3.2)

Se debe de tener cuidado al trabajar con este solvente porque posee un punto de ebullición de 68 °C y es más volátil que el etanol.

Para la obtención del extracto seco se llevó el recipiente a baño maría a una temperatura de 60 °C hasta obtener un extracto blando, el cual es llevado a la estufa a 50 °C para desecación completa. Luego se pesó

el recipiente con el material seco siendo su rendimiento del 6%.
(Tabla N° 3.1)



Figura N° 3.2: Extracción con hexano.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.3. EXTRACCIÓN CLOROFÓRMICA

Se pesó 10 g de muestra pulverizada, se empaquetó en papel filtro para luego ser introducido en el equipo de digestión continua (Soxhlet), en el balón se colocó 100 mL de cloroformo como menstuo. (**Figura N° 3.3**)

Se debe de tener cuidado al trabajar con este solvente porque posee un punto de ebullición de 61 °C y es más volátil que el etanol y el hexano. Para la obtención del extracto seco se llevó el recipiente a baño maría a una temperatura de 50 °C hasta obtener un extracto blando, el cual es llevado a la estufa a 50 °C para desecación

completa. Luego se pesó el recipiente con el material seco siendo su rendimiento del 8 %. (Tabla N° 3.1)



Figura N°3.3: Extracción con cloroformo.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.1: Porcentaje de Rendimiento de Extracto Seco Obtenido de los Diferentes Solventes de *Polypodium crasifolium* “Calaguala”

Solvente	Peso de muestra en gramos	Cantidad de solvente en mililitros	Peso de extracto seco en gramos	Porcentaje de rendimientos
Hexano	10.00 g	100.00 mL	0.60 g	6.00 %
Cloroformo	10.00 g	100.00 mL	0.80 g	8.00 %
Etanol	10.00 g	100.00 mL	1.80 g	18.00 %

Fuente: Elaboración propia

3.2. SCREENING FITOQUÍMICO.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del screening fitoquímico, realizado al extracto seco de *Polypodium crassifolium* “Calaguala”, el mismo arrojó la presencia de los siguientes metabolitos secundarios, como taninos, flavonoides, saponinas, y quinonas. La presencia de compuestos como flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas en su composición justifican las propiedades antiinflamatorias que registran estas especies en bibliografía. ^(25, 26) (Tabla N° 3.2)

Tabla 3.2: Screening Fotoquímico del Extracto Seco de *Polypodium crassifolium* “Calaguala”

ENSAYO	METABOLITO	RESULTADO
DRAGENDORFF	Alcaloides	Negativo (-)
WAGNER	Alcaloides	Negativo (-)
MAYER	Alcaloides	Negativo (-)
BALJET	Lactonas y Cumarinas	Negativo (-)
BORNTRAGER	Antraquinonas y Naftoquinonas	Positivo (+)
LIBERMAN BUCHARD	Triterpenos, esteroides	Negativo (-)
ESPUMA	Saponinas	Positivo (+)
CLORURO FÉRRICO	Taninos	Positivo (+)
SHINODA	Flavonoides	Positivo (+)

Fuente: Elaboración propia

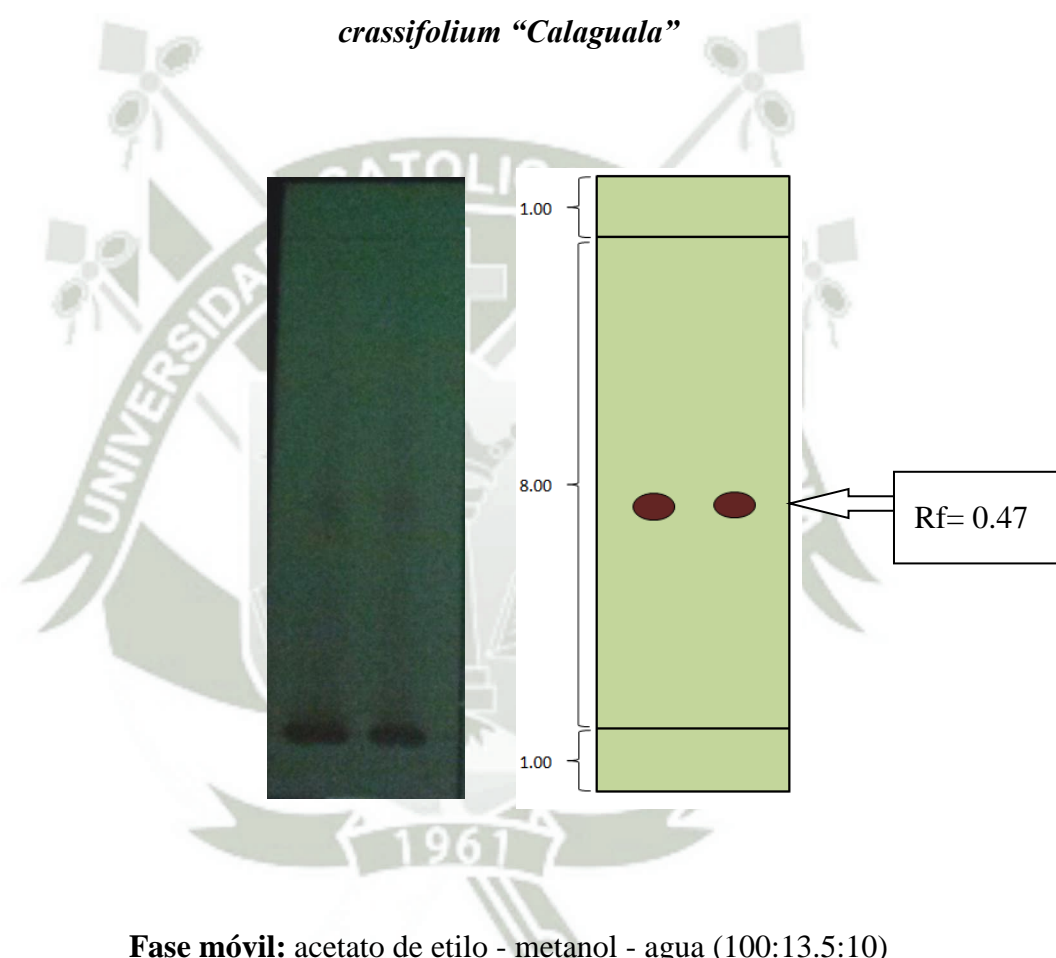
INTERPRETACIÓN DE LA TABLA:

- Respuesta positiva a la reacción. (+)
- Respuesta negativa a la reacción. (-)

3.3. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Se realizó la cromatografía en capa fina, con la finalidad de identificar algunos de los principales metabolitos secundarios que serían los posibles responsables del efecto antiinflamatorio.

Figura N° 3.4: Identificación de Quinonas mediante CCF del *Polypodium crassifolium* “Calaguala”



Fase móvil: acetato de etilo - metanol - agua (100:13.5:10)

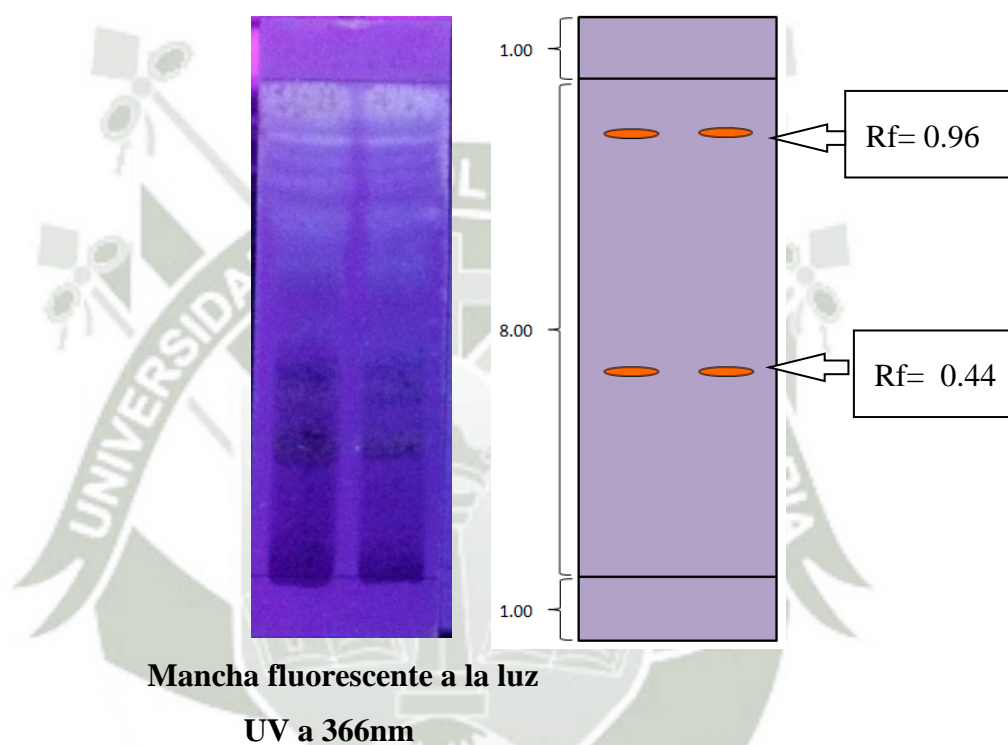
Revelador: KOH 10 %

Fuente: Elaboración propia

En la (Figura N° 3.4) podemos observar que en la placa revelada se observa una mancha de color rojo pardo, también se determinó su R_f de la mancha

identificada, encontrándose un valor de 0.47, por lo tanto se concluye que son revelaciones características de quinonas.

Figura N° 3.5: Identificación de Saponinas mediante CCF de *Polypodium crassifolium* “Calaguala”.



Fase móvil: n butanol - ácido acético - agua (50:10:40)

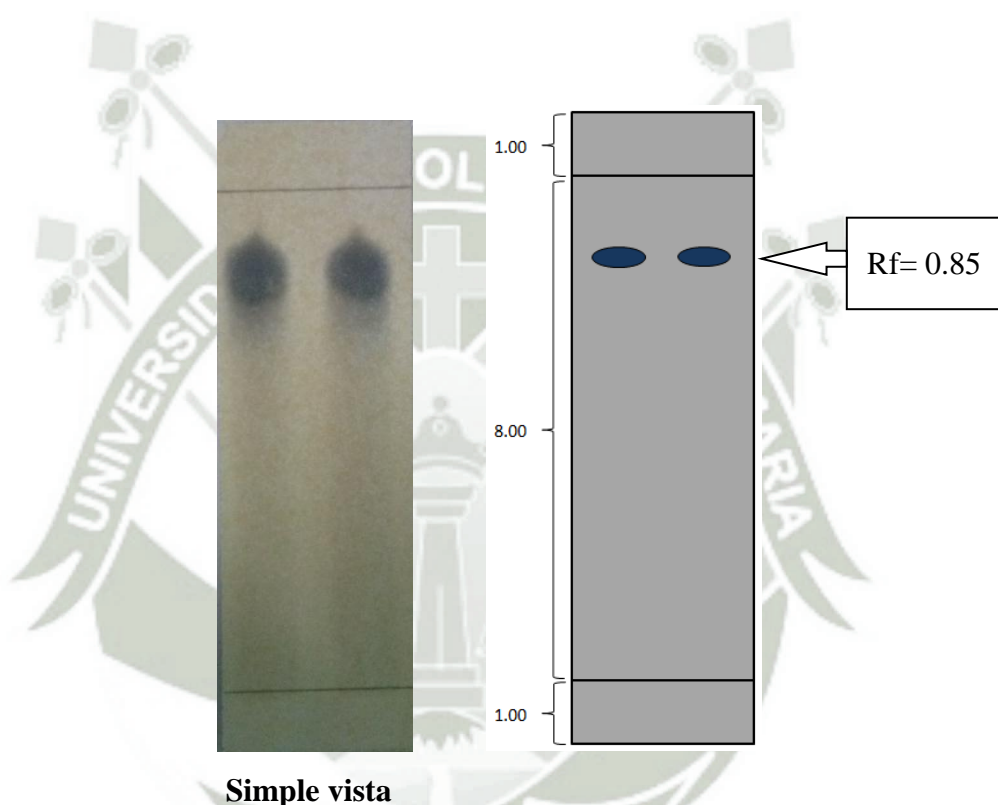
Revelador: vainillina / H₂SO₄

Fuente: Elaboración propia

En la (Figura N° 3.5) podemos observar que la placa revelada, muestra manchas de color anaranjadas rojizas, y también se determinó el R_f de dichas manchas identificadas, encontrándose un valor de 0,96 y 0.44, por lo tanto se concluye que son revelaciones características de saponinas.

En la (**Figura N° 3.6**) podemos observar que la placa revelada, muestra manchas de color azul oscuro. También se determinó el R_f de la mancha identificada, encontrándose valores de 0.84, por lo tanto se concluye que son revelaciones de taninos.

Figura N°3.6: Identificación de Taninos mediante CCF de *Polypodium crassifolium* “Calaguala”.



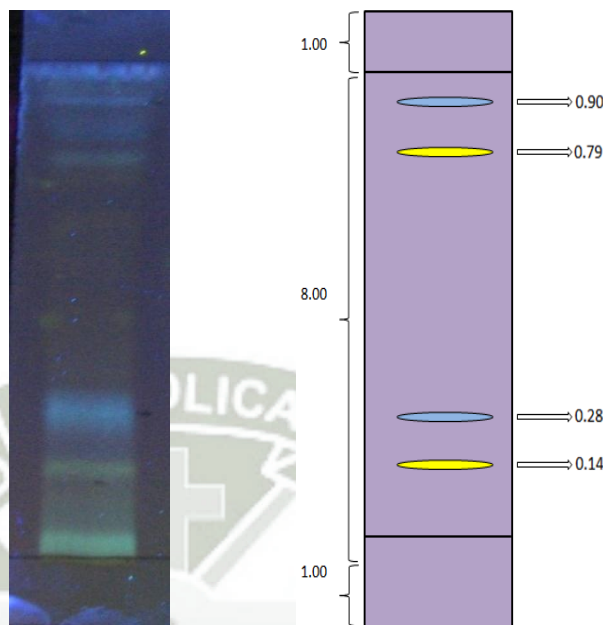
Fase móvil: metanol - agua (90:10)

Revelador: cloruro férrico 1 %

Fuente: Elaboración propia

En la (**Figura N° 3.7**) podemos observar que la placa revelada muestra manchas de color amarillo y celeste, también se determinó los R_f de las manchas identificadas, encontrándose valores de 0.14, 0.28, 0.79 y 0.9, por lo tanto se concluye que son revelaciones de flavonoides. (**Tabla N° 3.3**)

Figura N°3.7: Identificación de Flavonoides mediante CCF de *Polypodium Crassifolium* “Calaguala”.



**Manchas fluorescentes a la luz
UV a 366nm**

Fase Móvil: acetato de etilo – metanol (90:10)

Revelador: cloruro aluminio 1 %

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 3.3: Resultado del Análisis Cromatográfico De Flavonoides

Obs.	Color	Rf	Metabolitos
1	Amarillo	0.14	Flavonoides
2	Celeste	0.28	Flavonoides
3	Amarillo	0.79	Flavonoides
4	Celeste	0.90	Flavonoides

Fuente: Elaboración propia

3.4. PREPARACIÓN DEL GEL AL 20 % CON EXTRACTO SECO DE *Polypodium crassifolium* “Calaguala”.

3.4.1. FÓRMULA

Tabla N° 3.4: Fórmula del Gel al 20 %

INGREDIENTES	CANTIDAD
<i>Carbopol 940</i>	1 g
<i>Propilenglicol</i>	5 mL.
<i>Trietanolamina csp.</i>	pH = 7
<i>Nipagin</i> ®	0.08 g
<i>Nipazol</i> ®	0.02 g
<i>Extracto seco de calaguala</i>	20 g
<i>Etanol 96 %</i>	15 mL
<i>Agua destilada csp.</i>	100 g

Fuente: Elaboración propia.

Tabla N° 3.5: Caracteres Organolépticos

ORGANOLÉPTICO	DESCRIPCIÓN
Sabor	Ligeramente dulce
Color	Marrón
Olor	Característico de la planta
Aspecto externo	Uniforme, con cámaras de aire
Consistencia	Semisólido

Fuente: Elaboración propia.



Figura N° 3.8: Gel a base del extracto seco al 20 %.

Fuente: Elaboración propia.

3.5. ESTUDIO SOBRE EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO Y GEL de *Polypodium crassifolium* “Calaguala”.

Luego de la aclimatación de las ratas se procedió a la distribución de las mismas en forma aleatoria, procediendo al marcado para su identificación; se procedió a la medición del volumen de las patas de los animales (T_0) (**Figura N° 3.9**)



Figura N° 3.9: Medición del volumen de la pata a un T_0 .

Fuente: Elaboración propia.

Seguidamente se administró 1 mL de la solución irritante constituida por carragenina al 1 %. (**Figura N° 3.10**)



Figura N°3.10: Aplicación de la inyección de carragenina

Fuente: Elaboración propia

Luego de 3 horas en el cual se logra la máxima inflamación se procede a su medición, inmediatamente se administró los tratamientos respectivos según los grupos de estudio y el procedimiento antes mencionado. Los porcentajes de inflamación se presentan a continuación.

Estas lecturas sirvieron de base para determinar el porcentaje de inhibición de la inflamación de cada grupo, se hizo uso de la siguiente fórmula. (**Anexo Fórmula N° 1**).

En la (**Tabla N° 3.6**) encontramos los resultados del porcentaje de inhibición de la inflamación correspondiente al grupo de estudio “gel a base del extracto etanólico seco al 20 %” calculados a partir de las unidades en mililitros dados por el pletismómetro (ver **Anexo N° 2**), planteando la fórmula (**Anexo Fórmula N° 1**).

Tabla N° 3.6: Porcentaje (%) de Inhibición de la Inflamación del Gel a Base del Extracto Etanólico Seco al 20 %

N° de Ratas	2 h (%)	4 h (%)	6 h (%)	12 h (%)
1	33.34	43.48	63.76	75.36
2	30.88	44.11	61.76	72.05
3	31.08	44.59	62.16	71.62
4	34.38	46.48	64.06	75.00
5	33.34	45.33	61.33	74.67
6	36.76	42.65	66.17	77.94
7	34.72	41.67	62.50	70.83
8	30.67	44.00	61.33	74.67
9	32.46	42.85	67.53	71.43
10	33.34	43.06	65.28	73.61
Media	33.10	43.82	63.59	73.72
Desviación Std.	1.92	1.40	2.16	2.23

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010)

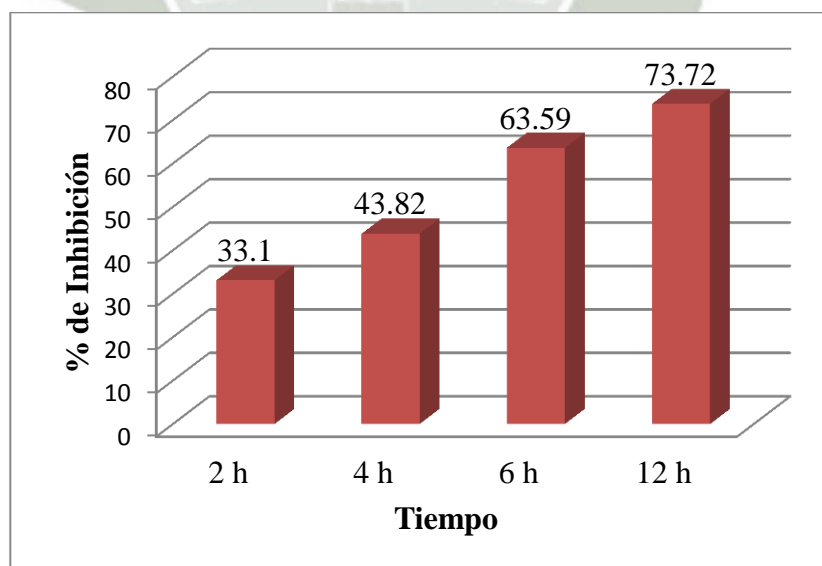


Gráfico N° 3.1: Medias de los % de inhibición de inflamación del gel al 20 % VS tiempo.

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

Observando el (**Gráfico N° 3.1**) se puede afirmar que el gel a base del extracto seco de *Polypodium crassifolium* (Calaguala) 20 % presentó un porcentaje inhibitorio de la inflamación promedio de 63.59 % a las 6 horas. Dando un resultado apto para satisfacción de dicho efecto. Quedando óptimo por su buena efectividad.

Tabla N°3.7: Porcentaje (%) de Inhibición de la Inflamación del Extracto Etanólico Seco Diluido Al 20 %

N° de Ratas	2 h (%)	4 h (%)	6 h (%)	12 h (%)
1	22,06	30,88	52,94	60,29
2	24,65	34,24	49,31	65,75
3	19,17	32,87	53,42	64,38
4	22,54	36,62	50,70	66,19
5	25,00	36,11	51,38	68,07
6	26,56	34,37	56,45	62,50
7	27,94	35,29	52,94	60,29
8	29,33	34,67	57,34	65,30
9	28,38	31,08	51,35	63,51
10	31,64	39,24	54,43	65,82
Media	28.39	34.23	53.01	63.88
Desviación Std.	2.53	3.45	2.29	3.14

FUENTE: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

En la (**Tabla N° 3.7**) encontramos los resultados del porcentaje de inhibición de la inflamación correspondiente al grupo de estudio “extracto etanólico seco diluido al 20 %” calculados a partir de las unidades en

mililitros dados por el pletismómetro (ver **Anexo N° 2**), planteando la fórmula (**Anexo Fórmula N° 1**).

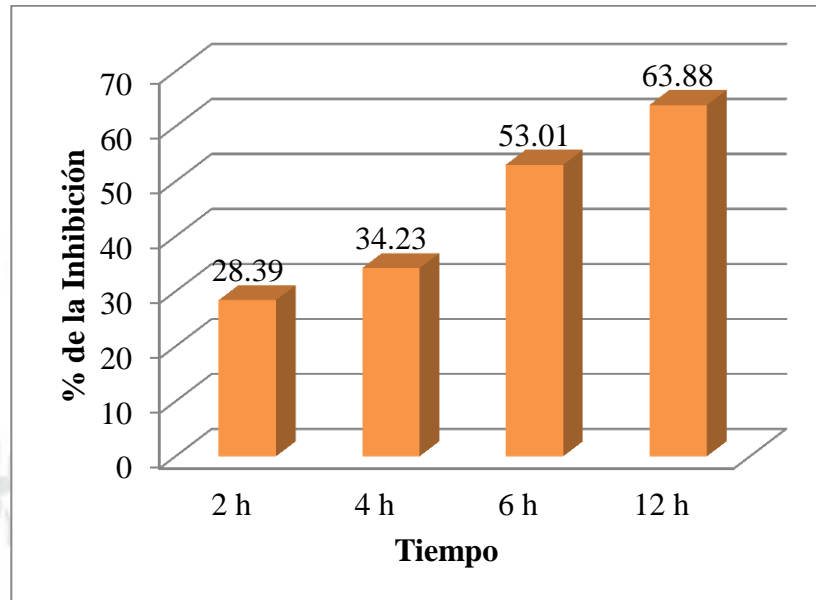


Gráfico N° 3.2: Medias de los % de inhibición de inflamación del extracto al 20 % VS tiempo.

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

Observando el (**Gráfico N° 3.2**) se puede afirmar que el extracto seco diluido de *Polypodium crassifolium* (Calaguala) 20 % presento un porcentaje inhibitorio de la inflamación promedio de 53.01 % a las 6 horas. Dando un resultado apto para satisfacción de dicho efecto. Quedando óptimo por su buena efectividad.

En la (**Tabla N° 3.8**) encontramos los resultados del porcentaje de inhibición de la inflamación correspondiente al grupo de estudio “gel base” o “grupo control” calculados a partir de las unidades en mililitros dados por el pletismómetro (ver **Anexo N° 2**), planteando la fórmula (**Anexo Fórmula N° 1**).

Tabla N° 3.8: Porcentaje (%) de Inhibición de la Inflamación del Grupo Control

N° de Ratas	2 h (%)	4 h (%)	6 h (%)	12 h (%)
1	0.00	2,89	4,34	8,69
2	1,53	1,53	6,15	9,23
3	1,41	4,22	5,63	8,45
4	0.00	2,73	4,11	8,22
5	2,78	4,17	5,56	8,33
6	1,41	1,41	4,22	9,85
7	1.34	1.34	4.00	6.67
8	0.00	1.33	2.89	5.79
9	1.43	2.86	4.29	7.14
10	2.73	4.11	6.84	8.22
Media	0.92	2.41	4.51	6.96
Desviación Std.	1.12	1.34	1.67	1.01

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

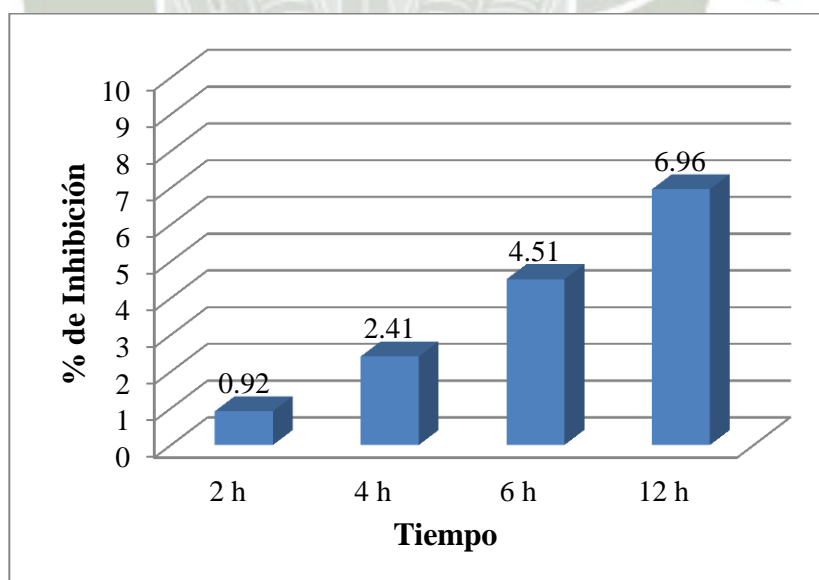


Gráfico N°3.3: Medias de los % de inhibición de inflamación del gel base VS tiempo.

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

En el (**Gráfico N° 3.3**) se puede observar que el grupo tratado con el gel base (grupo control) presentó un porcentaje de inhibición de la inflamación promedio de 6.96 % a las 12 h, podemos afirmar que el grupo “gel base” no presenta un efecto antiinflamatorio significativo en comparación a los otros grupos de estudio.

Tabla N° 3.9: Resumen del Porcentaje (%) de Inhibición Promedio de cada Grupo de Estudio

Promedios de Inflamación	2 h (%)	4 h (%)	6 h (%)	12 h (%)
Gel base	0.92	2.41	4.51	6.96
Gel al 20 %	28.39	34.23	53.01	63.88
Extracto al 20 %	33.10	43.82	63.59	73.72

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010)

En la (**Tabla N° 3.9**) se observa el resultado promedio en porcentajes de inhibición de la inflamación de los diferentes grupos experimentales calculados a partir de las unidades en mililitros dados por el pletismómetro (**Anexo N° 2**), planteando la fórmula (**Anexo Fórmula N° 1**).

En el (**Gráfico N° 3.4**) Observamos que existe un mayor efecto antiinflamatorio en los grupos experimentales G 1 y G 2 (**Tabla N° 2.1**) a comparación del grupo experimental gel base (grupo control), por lo

expuesto los grupos experimentales G 1 y G 2 son significativamente diferentes entre ellos a pesar de que se usó la misma concentración del extracto 20 %, esto se debe a que la forma farmacéutica contribuyó de manera importante sobre el extracto de tal modo que superó al grupo tratado solo con extracto, ya que el gel de *Polypodium crassifolium* (Calaguala), se mantiene en el lugar de la inflamación en cambio el extracto se dispersa y se evapora por ser un extracto alcohólico.

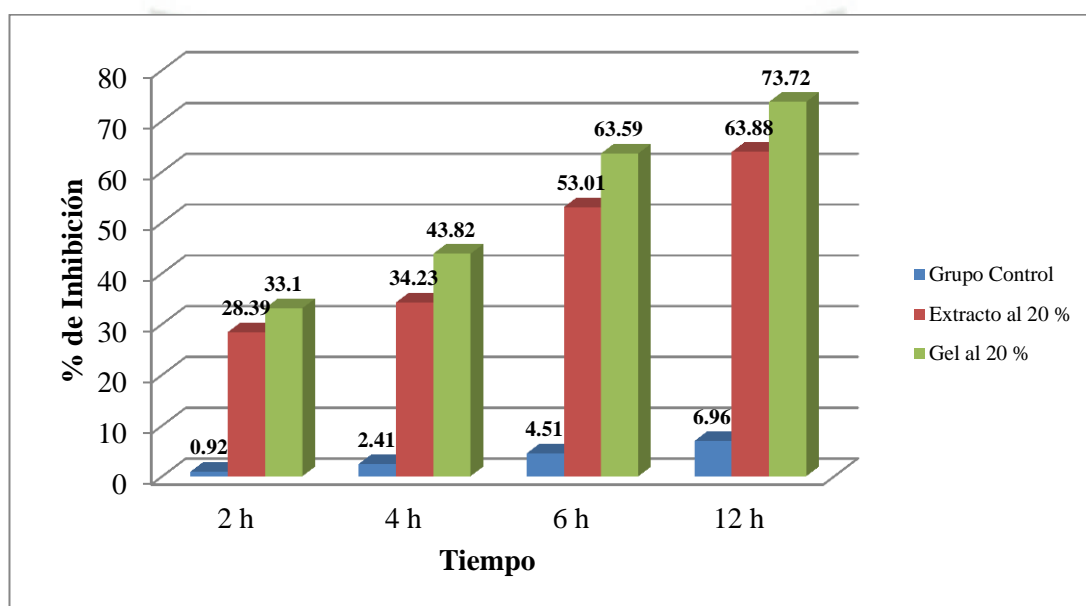


Gráfico N° 3.4: Promedio de las medias de los porcentajes de inhibición de inflamación de los grupos de estudio.

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

3.6. ANALISIS ESTADISTICO INFERENCIAL ANOVA Y TEST DE TUKEY

En el presente trabajo los datos son continuos y se tiene más de dos factores. La prueba estadística recomendada en este caso es el análisis de varianza (ANOVA) multifactorial. Este análisis nos permite determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de % inhibición, el factor tiempo y el factor tratamiento, con un nivel del 95.0 % de confianza.

Debido a que el ANOVA multifactorial solo nos informa sobre la similitud o diferencia estadística entre los grupos y no de manera específica; vimos la necesidad de aplicar una prueba estadística de comparación múltiple que nos señale en forma precisa y específica que grupos (de los tres) son similares o diferentes. Esta prueba es la prueba de TUKEY.

Tabla N° 3.10: Análisis de Varianza (ANOVA) para porcentaje de Inhibición

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tratamientos	55134.4	2	27567.2	621.65	0.0000
B:Tiempo	15029.2	3	5009.73	112.97	0.0000
Residuos	5055.36	114	44.3453		
Total (corregido)	75219.0	119			

Fuente: Elaboración propia (Statgraphics centurión).

La (Tabla N° 3.10) nos muestra los resultados del análisis de varianza (ANOVA multifactorial) realizado mediante el paquete estadístico Statgraphics centurión; este estadístico fue calculado con la finalidad de observar si los grupos experimentales difieren entre sí. En este sentido apreciamos que las tres formulaciones experimentales y los tres tiempos difieren entre sí. Se llega a esta conclusión debido a que el valor de $p << 0.05$.

Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula que asume que los grupos experimentales en tratamiento y tiempo no difieren entre sí, aceptándose entonces la hipótesis alternativa la cual asume que los grupos si son estadísticamente diferentes.

Variable dependiente: % de inhibición

Factores:

Tratamiento A: $H_0 : T_1 = T_2 = T_3$
H_i : $T_1 \neq T_2 \neq T_3$

Tiempo B: $H_0 : t_1 = t_2 = t_3$
H_i : $t_1 \neq t_2 \neq t_3$

Número de casos completos : 120

Nivel de confianza : 95 %

Debido a que el ANOVA solo nos informa la diferencia estadística entre los grupos y no de manera específica; aplicamos una prueba estadística de comparación múltiple (Tukey) que nos señala en forma precisa y específica que grupos (de los tres) son similares o diferentes.

En la (Tabla N° 3.11), (Tabla N° 3.12) y (Gráfico N° 3.5) evidenciamos que hay una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento.

Tabla N° 3.11: Pruebas de Múltiples Rangos para % de Inhibición por Tratamiento

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Gel Base	40	4.196	1.05292	X
Extracto 20%	40	44.375	1.05292	X
Gel 20%	40	53.5562	1.05292	X

Fuente: Elaboración propia (Statgraphics centurión)

Tabla N° 3.12: Diferencia entre Grupos

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Extracto 20 % - Gel 20 %	*	-9.18125	3.53608
Extracto 20 % - Gel Base	*	40.179	3.53608
Gel 20 % - Gel Base	*	49.3602	3.53608

* Indica una diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia (Statgraphics centurión)

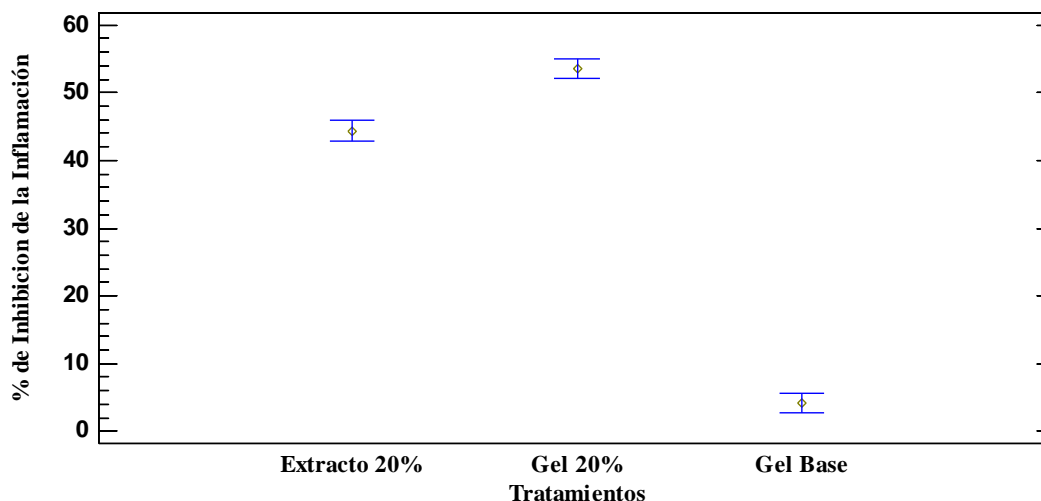


Gráfico N° 3.5: Medias para intervalos HSD de Tukey para % de inhibición de la inflamación para cada uno de los niveles de tratamiento.

El (**Gráfico N° 3.5**) muestra la media de % de inhibición de la inflamación para cada uno de los tratamientos empleados. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Todos los intervalos se traslaparán 95,0 %. Se Evidencia que los tratamientos con extracto al 20 % no se traslapan verticalmente por ende tienen una diferencia estadísticamente significativa.

En la (**Tabla N° 3.13**), (**Cuadro N° 3.14**) y (**Grafico N° 5.6**) evidenciamos que hay una diferencia significativa en los diferentes grupos de tiempo.

Tabla N° 3.13: Pruebas de Múltiple Rangos para % Inhibición de la Inflamación por Tiempo

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	30	20.029	1.2158	X
4	30	27.006	1.2158	X
6	30	40.4723	1.2158	X
12	30	48.6623	1.2158	X

Fuente: Elaboración propia (Statgraphics centurión)

Tabla N° 3.14: Diferencia entre Grupos

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
2 - 4	*	-6.977	3.40613
2 - 6	*	-20.4433	3.40613
2 - 12	*	-28.6333	3.40613
4 - 6	*	-13.4663	3.40613
4 - 12	*	-21.6563	3.40613
6 - 12	*	-8.19	3.40613

* Indica una diferencia significativa.

Fuente: Elaboración propia (Statgraphics centurión).

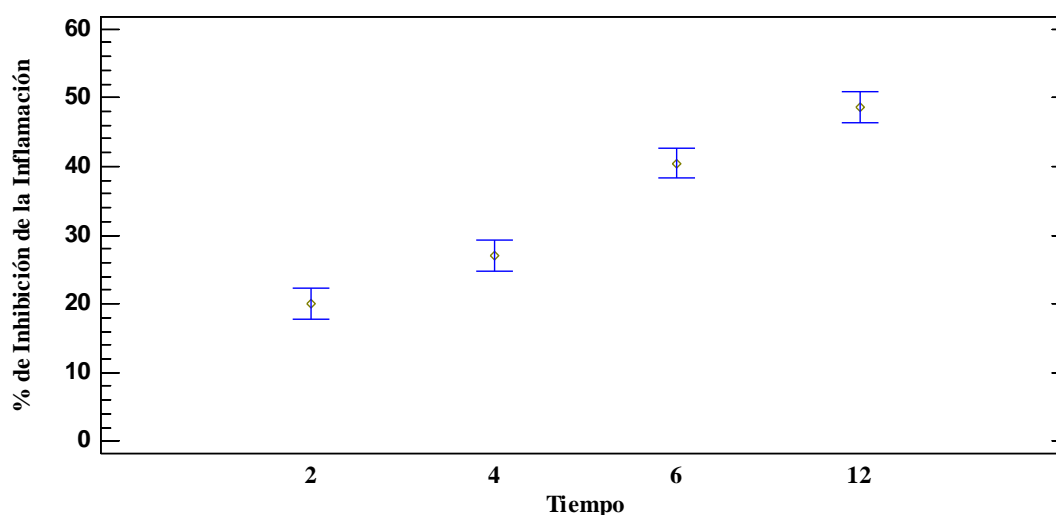


Gráfico N° 3.6: Medias para intervalos HSD de Tukey para % de inhibición de la inflamación para cada uno de los niveles de tratamiento.

El (**Gráfico N° 3.6**) muestra la media de % de inhibición para cada uno de los niveles de tiempo. También muestra un intervalo alrededor de cada media. Todos los intervalos se traslaparán 95,0 %. Cualquier par de intervalos que no se traslapen verticalmente corresponden a pares de medias que tienen una diferencia estadísticamente significativa.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el rendimiento por el método de extracción con disolventes (continuo) en el equipo Soxhlet con diferentes solventes (hexano, cloroformo y etanol) dando un mejor rendimiento con el solvente polar (etanol), con un porcentaje de rendimiento del 18.00 %.
2. Se logró determinar la presencia de taninos, flavonoides, saponinas y quinonas en el extracto etanólico seco de *Polypodium crassifolium* “Calaguala” empleando pruebas como el screening fitoquímico y la cromatografía en capa fina.
3. El grupo tratado con el gel a base del extracto etanólico seco al 20 % presentó mayor efecto inhibitorio de la inflamación que el extracto puro, aplicado directamente sobre el edema plantar, esto se debe a que la forma farmacéutica contribuyó de manera importante sobre el extracto de tal modo que superó al grupo tratado solo con extracto, ya que el gel de *Polypodium crassifolium* (Calaguala), se mantiene en el lugar de la inflamación en cambio el extracto se dispersa y se evapora por ser un extracto alcohólico.

SUGERENCIAS

PRIMERA

Realizar estudios en otras especies de animales con el objetivo de confirmar el efecto antiinflamatorio del gel a base del extracto etanólico seco de *Polypodium crassifolium* “Calaguala” en una concentración de 20%.

SEGUNDA

Realizar estudios pre clínicos con el objetivo de confirmar la eficacia del gel a base del extracto etanólico seco de *Polypodium crassifolium* “Calaguala” en una concentración de 20% el cual presenta actividad antiinflamatoria tópica.

TERCER

Realizar una separación de los metabolitos presentes en el extracto seco de *Polypodium crassifolium* “Calaguala” y determinar cuál de estos grupos posee efecto inhibitorio de la inflamación.

CUARTA

Confirmar las otras propiedades medicinales que atribuye la población al *Polypodium crassifolium* “Calaguala”, mediante investigaciones que utilicen el método científico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bussmann, Rainer.: “ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NORTHERN PERUVIAN MEDICINAL PLANTS” Arnaldoa - 2008.
2. Pastor Soplin, Santiago.: “INFORME NACIONAL PARA LA CONFERENCIA TECNICA INTERNACIONAL DE LA FAO SOBRE LOS RECURSOS FITOGENÉTICOS”, Lima, Julio - 1995
3. Herrera, Fortunato L.: “CATALOGO ALFABÉTICO DE LOS NOMBRES VULGARES Y CIENTÍFICOS DE PLANTAS QUE EXISTEN EN EL PERÚ”, Publicado por la Universidad Mayor de San Marcos. Lima - 1939
4. Banco de Datos NON WOOD PROJETO: “EXTRATIVISMO NÃO MADEIREIRO E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL NA AMAZÔNIA” (ITTO – PD 31/99 Ver. 3 (I)”. Brasil - 1999
5. Quijandría Acosta, Gabriel.: *Director Técnico del Proyecto* “ESTUDIO ETNOBOTÁNICO EN LAS CUENCAS ALTAS DE LOS RIOS TAMBOPATA – INAMBARI” Madre de Dios, 2002
6. Gómez & Alba, Arbelaez.: “FLORA DIGITAL DE LA SELVA” Organización para Estudios Tropicales. Julio - 2009
7. Mantilla Holguín, Julio & Olazábal Castillo, Oscar.: “LAS PLANTAS MEDICINALES DE NUESTRA MADRE TIERRA” Inst. de Ecología y Plantas Medicinales. Perú 2008
8. Walter, Jhon B. MD.: “PATOLOGÍA HUMANA”. 1ª Edición 1996. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V.
9. Lock de Ugaz, Olga.: “INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA” Fondo Editorial de la PUCP 2ª Edición . Lima, 1994.

10. Ibarra Bouroncle, Isaac.: “COMPENDIO DE CIRUGÍA GENERAL” Escuela de Posgrado U.C.S.M Arequipa, 1993.
11. Ortiz, Frutos E. & Miranda, Nestor E.: “CIRUGÍA” 3ª Edición. Librería *El Ateneo* Editorial.
12. Martínez Morillo, M.: “MANUAL DE MEDICINA FÍSICA” 1ª Edición. 1998. Harcourt Brace de España, S.A.
13. Vinay Kumar, Charles.: “PATOLOGÍA HUMANA”, 5ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
14. Stanley, Robbins; Vinay, Kumar.: “MANUAL DE PATOLOGÍA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL” 6ª Edición. McGraw-Hill Interamericana de México, 2003.
15. Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto.: “PATOLOGÍA ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL ROBBINS Y COTRAN” 7ª Edición. Editorial Elsevier España, 2005.
16. Flórez, Jesús.: “FARMACOLOGÍA HUMANA” 5ª Edición. 2008. Editorial Elsevier España.
17. Vogel, Gerhard H.: “DRUG DISCOVERY AND EVALUATION” Pharmacological Assays 2ª Edición, 2002. Editorial Springer-Verlag Berlin Heidelberg Printed in Germany.
18. Guadarrama Flores, Berenice.: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE DOS MUESTRAS DE *Sphaeralcea Angustifolia* Y LA INTERACCIÓN DEL EXTRACTO ACTIVO CON FÁRMACOS DE USO CLÍNICO” México Diciembre, 2006
19. M. Poma, Elizabeth.: “ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA *Annona muricata* L. (GUANÁBANA) DE CUZCO” Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM 2011.

20. Matiz, Eduardo Germán.: “ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF FLOWERS AND LEAVES OF CAESALPINIA PULCHERRIMA L. (SWARTZ)” Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Cartagena 2011.
21. J. Juve, A. Viscasillas, A. del Pozo.: “MEDICAMENTOS Y SERVICIOS PROFESIONALES” Unidad de Tecnologías Farmaceuticas, Universidad de Barcelona Abril 2007
22. W. AA. “REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA” 2ª Edicion, 2002 Boletin Oficial del Estado ESPAÑA 2002
23. Farmacopea de los Estados Unidos de América, “USP NF 2012” USP 35 oficial desde el 1º de Mayo de 2012
24. Vila Jato, José Luis (Editor).: “TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA”. 1ª Edición 2001. Editorial SINTESIS S.A.
25. Kuklinski, Claudia.: “FARMACOGNOSIA ESTUDIO DE LAS DROGAS Y SUSTANCIAS MEDICAMENTOSAS DE ORIGEN NATURAL” 1ª Re- Impresión 2003 Ediciones OMEGA S.A.
26. Torres Tovar, Humberto; Pino Figueroa, Alejandro.: “GUÍA DE PRÁCTICAS DE FARMACOGNOSIA II” (Arequipa, U.C.S.M.; 2004).
27. Mostacero J.; Mejia F.; Gamarra O.: “TAXONOMÍA DE LAS FANERÓGAMAS ÚTILES DEL PERÚ” 1ª Edición. 2002. Editorial Normas Legales S.A.C. Perú.
28. Perea Layme, Carla y Valero Condoy, Onelia: “ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS FLORES DE *Calendula officinalis* L (Caléndula) Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE FLAVONOIDES”. Universidad Católica de Santa María, Arequipa. 2002.
29. Rang H. & Dale M.: PHARMACOLOGY, 6ª Edition, 2007. Editorial Elsevier.

30. Rodes Teixidor, Guardia Massó.: “MEDICINA INTERNA” Editorial Masson SA. España 1997.
31. Rowe R.; Sheskey P. & Owen S. (Editores): “HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS.” 5ª Edition. 2006. Pharmaceutical Press.
32. Sharapin, Nikolai.: “FUNDAMENTOS DE TEGNOLOGÍA DE PRODUCTOS FITOTERAPÉUTICOS” 1ª Edición. 2000. Santa Fe de Bogotá, Colombia.
33. Skoog D.; Leary J.: “ANÁLISIS INSTRUMENTAL” 4ª Edición. 1994. Editorial McGraw-Hill.
34. Sotta Apaza, Norma.: “PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS DE LA REGIÓN AREQUIPA” 1ª Edición 2000. Ediciones CORDAID.
35. Rouessac F, Rovessac A.: “ANÁLISIS QUÍMICO, MÉTODOS Y TÉCNICAS DE INSTRUMENTOS MODERNOS” Universidad Granada 2003
36. ”CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA”. DISPONIBLE EN INTERNET: <http://www.textoscientíficos.com/química/cromatografía/capa-fina> FA: 2011/10/25 Textos Científicos.
37. Villar Del Fresno A. (Editor):. “FARMACOGNOSIA GENERAL” 1ª Edición 2000. Editorial Síntesis S.A.
38. Voig, Rudolf.: “TRATADO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA” 3ª Edición. 1982. Editorial Acribia, España.
39. Castillo Garcia B.: “MÉTODOS ANALÍTICOS Y TÉCNICAS INSTRUMENTALES EMPLEADAS EN EL AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS P.A PRESENTES EN PLANTAS MEDICINALES”
40. Varro E. Tyler.: “FARMACOGNOSIA” Editorial El Ateneo 2ª Edición. Argentina – Buenos Aires 1979.

41. Domínguez, Xorge Alejandro.: “MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA” Editorial Limusa S.A. 1ª Edición México D.F. 1973.
42. Chirinos Pacheco, Julio; Valdivia Dueñas, Enrique.: “FARMACOLOGÍA GENERAL” 1ª Edición Arequipa, 1994.
43. Hernández S, Roberto; Fernández C, Carlos; Baptista L, María del Pilar. :”METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN” Editorial Mc Growhill 5ª Edición. México, 2010.
44. Wayne W. Daniel.: “BIOESTADÍSTICA” Editorial Limusa Wiley. 4ª Edición México 2007.
45. Del Pilar Aguay Saquicaray, Magdalena.: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA MEZCLA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*), TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*), ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) MEDIANTE EL TEST DE EDEMA INDUCIDO EN RATAS (*Rattus norvegicus*)” Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. Ecuador, 2012.
46. Guerra Corado, Álvaro.: “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 (*Phlebodium pseudoaureum*) A NIVEL DE LABORATORIO” Universidad de San Carlos de Guatemal 2005.
47. Torres Cubiña, Manuel.: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE Arrayán, Calaguala y Canayuyo” Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. Ecuador, 2012.
48. Yien Yep Chu, Man; Hoyos Vargas, Kelly Melissa.: “DISEÑO DE UNA FÓRMULACIÓN DE APLICACIÓN TÓPICA A BASE DE *Baccharis latifolia* (CHILCA), CON EFECTO ANTIINFLAMATORIO” Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima 2008.

49. Rodríguez Yanes, Esperanza.: “EFECTOS DEL EXTRACTO DE *Polypodium leucotomos* SOBRE LA TUMOROGÉNESIS INDUCIDA POR LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA” Universitat Rovira I Virgili, 2011.





ANEXO 1: FÓRMULACIÓN DE LOS GELES UTILIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO

Tabla N° 1: Formulación del Gel Base (Control)

INGREDIENTES	CANTIDAD
<i>Carbopol 940</i>	1 g.
<i>Propilenglicol</i>	5 mL.
<i>Trietanolamina csp.</i>	pH = 7
<i>Nipagin</i> ®	0.08 g.
<i>Nipasol</i> ®	0.02 g.
<i>Etanol 96 %</i>	15 mL.
<i>Agua destilada csp</i>	100 g.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla N° 2 Formulación del Gel de Calaguala al 5 %

INGREDIENTES	CANTIDAD
<i>Carbopol 940</i>	1 g.
<i>Propilenglicol</i>	5 mL.
<i>Trietanolamina csp.</i>	pH = 7
<i>Nipagin</i> ®	0.08 g.
<i>Nipasol</i> ®	0.02 g.
<i>Extracto seco de calaguala</i>	5 g.
<i>Etanol 96 %</i>	15 mL.
<i>Agua destilada csp.</i>	100 g.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla N° 3 Formulación del Gel de Calaguala al 10 %

INGREDIENTES	CANTIDAD
<i>Carbopol 940</i>	1 g.
<i>Propilenglicol</i>	5 mL.
<i>Trietanolamina csp.</i>	pH = 7
<i>Nipagin ®</i>	0.08 g.
<i>Nipasol ®</i>	0.02 g.
<i>Extracto seco de calaguala</i>	10 g.
<i>Etanol 96 %</i>	15 mL.
<i>Agua destilada csp.</i>	100 g.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla N° 4 Formulación del Gel de Calaguala al 20 %

INGREDIENTES	CANTIDAD
<i>Carbopol 940</i>	1 g.
<i>Propilenglicol</i>	5 mL.
<i>Trietanolamina csp.</i>	pH = 7
<i>Nipagin ®</i>	0.08 g.
<i>Nipasol ®</i>	0.02 g.
<i>Extracto seco de calaguala</i>	20 g.
<i>Etanol 96 %</i>	15 mL.
<i>Agua destilada csp.</i>	100 g.

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO N° 2: CUADROS DE RESULTADOS EN MILILITROS DADOS POR EL EQUIPO
PLETISMÓMETRO**

TABLA N° 5: Resultados del grupo experimental 1 Gel a Base del Extracto Etanólico Seco Al 20 % en mL.

T	Gel Etanólico 20 %									
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Rata 7	Rata 8	Rata 9	Rata 10
T ₀	0,92 mL.	0,88 mL.	0,81 mL.	0,87 mL.	0,83 mL.	0,85 mL.	0,86 mL.	0,80 mL.	0,83 mL.	0,89 mL.
T _{max} (3 hrs)	1,61 mL.	1,56 mL.	1,55 mL.	1,51 mL.	1,58 mL.	1,53 mL.	1,58 mL.	1,55 mL.	1,60 mL.	1,57 mL.
T ₁ (5 hrs.)	1,38 mL.	1,35 mL.	1,30 mL.	1,29 mL.	1,33 mL.	1,28 mL.	1,33 mL.	1,32 mL.	1,35 mL.	1,33 mL.
T ₂ (7 hrs)	1,31 mL.	1,26 mL.	1,22 mL.	1,21 mL.	1,24 mL.	1,24 mL.	1,28 mL.	1,22 mL.	1,27 mL.	1,26 mL.
T ₃ (9 hrs)	1,17 mL.	1,14 mL.	1,09 mL.	1,10 mL.	1,12 mL.	1,08 mL.	1,13 mL.	1,09 mL.	1,08 mL.	1,10 mL.
T ₄ (15 hrs)	1,09 mL.	1,07 mL.	1,02 mL.	1,03 mL.	1,02 mL.	1,00 mL.	1,07 mL.	0,99 mL.	1,05 mL.	1,04 mL.

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

TABLA N° 6: Resultados del grupo experimental 2 Extracto Etanólico Seco Diluido al 20 % en mL.

T	Extracto Seco 20 %									
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Rata 7	Rata 8	Rata 9	Rata 10
T₀	0,83 mL.	0,82 mL.	0,80 mL.	0,89 mL.	0,84 mL.	0,90 mL.	0,89 mL.	0,81 mL.	0,79 mL.	0,81 mL.
T max (3 hrs)	1,51 mL.	1,55 mL.	1,53 mL.	1,60 mL.	1,56 mL.	1,54 mL.	1,57 mL.	1,56 mL.	1,53 mL.	1,60 mL.
T₁ (5 hrs.)	1,36 mL.	1,37 mL.	1,39 mL.	1,44 mL.	1,38 mL.	1,37 mL.	1,38 mL.	1,34 mL.	1,32 mL.	1,35 mL.
T₂ (7 hrs)	1,30 mL.	1,30 mL.	1,29 mL.	1,34 mL.	1,30 mL.	1,32 mL.	1,33 mL.	1,30 mL.	1,30 mL.	1,29 mL.
T₃ (9 hrs)	1,15 mL.	1,19 mL.	1,14 mL.	1,25 mL.	1,19 mL.	1,18 mL.	1,21 mL.	1,13 mL.	1,15 mL.	1,17 mL.
T₄ (15 hrs)	1,10 mL.	1,07 mL.	1,06 mL.	1,13 mL.	1,07 mL.	1,14 mL.	1,16 mL.	1,07 mL.	1,06 mL.	1,08 mL.

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

TABLA N° 7: Resultados del grupo experimental Control (gel base) en mL.

T	Gel Base									
	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Rata 7	Rata 8	Rata 9	Rata 10
T₀	0,84 mL.	0,86 mL.	0,81 mL.	0,83 mL.	0,83 mL.	0,78 mL.	0,83 mL.	0,84 mL.	0,87 mL.	0,82 mL.
T max (3 hrs)	1,53 mL.	1,51 mL.	1,52 mL.	1,56 mL.	1,52 mL.	1,49 mL.	1,58 mL.	1,53 mL.	1,57 mL.	1,55 mL.
T₁ (5 hrs.)	1,53 mL.	1,50 mL.	1,51 mL.	1,56 mL.	1,50 mL.	1,48 mL.	1,57 mL.	1,53 mL.	1,56 mL.	1,53 mL.
T₂ (7 hrs)	1,51 mL.	1,50 mL.	1,49 mL.	1,54 mL.	1,49 mL.	1,48 mL.	1,57 mL.	1,52 mL.	1,55 mL.	1,52 mL.
T₃ (9 hrs)	1,50 mL.	1,47 mL.	1,48 mL.	1,53 mL.	1,48 mL.	1,46 mL.	1,55 mL.	1,51 mL.	1,53 mL.	1,50 mL.
T₄ (15 hrs)	1,47 mL.	1,45 mL.	1,46 mL.	1,50 mL.	1,46 mL.	1,42 mL.	1,53 mL.	1,49 mL.	1,52 mL.	1,49 mL.

Fuente: Elaboración propia (Microsoft Excel 2010).

FÓRMULA N° 1: Determinación del Porcentaje de Inhibición de la Inflamación

$$\% \text{ Inhibicion} = \frac{(T_{max} - T_x)}{(T_{max} - T_0)} \times 100$$

DONDE:

T_{max}: Tiempo en el que el grado de inflamacion es maximo (3h)

T_x: Volumen de inflamacion (mL.) que se va adeterminar.

T₀: Volumen de la pata de la rata en un tiempo inicial

