

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



**“Evaluación del efecto antiinflamatorio tópico de la asociación del extracto de
Punica granatum L. “Granada” y *Plantago lanceolata* L. “Llantén” en animales de
experimentación – Arequipa 2016”**

Tesis presentada por los bachilleres en Farmacia y
Bioquímica:

Jácono Cárdenas, Daniel Amilcar

Zúñiga Ortiz, Gleizy Fátima

Para optar por el título profesional de:

Químico-Farmacéutico

Asesor: Mgter. Julitza Paredes Fuentes

AREQUIPA- PERU

2017

DEDICATORIA

A ti Dios mío por siempre estar a mi lado, por no abandonarme y darme la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mis padres por su apoyo constante y su gran amor a lo largo de mi vida, por sus palabras de aliento para siempre seguir adelante.

Esta tesis se la dedicó especialmente a una persona maravillosa que tuve la dicha de tenerla en mi vida, mi abuelito, “Mi papá Sócrates”, que siempre estuvo a mi lado apoyándome y dándome consejos para seguir adelante y poder lograr mis metas.

Gleizy Fátima, Zúñiga Ortiz.

A Dios, mis padres y familiares por su apoyo incondicional, por inculcarme, darme ánimo y o dejarme desfallecer en el camino para terminar satisfactoriamente este proyecto, prometo no defraudarlos.

Daniel Amilcar, Jacobo Cardenas

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su constante apoyo, sus consejos y por ser mi guía y ser mi ejemplo de valores y principios por enseñarme a ser fuerte y a luchar por mis metas y sueños.

A mis hermanas por sus consejos, apoyo y alegrías, que siempre me brindaron día a día. Gracias a mi tío John, por su apoyo y su gran corazón.

A mi asesora la Dra. Julitza Paredes Fuentes, por su constante apoyo y consejos brindados durante la realización del presente trabajo de investigación.

Al Dr. José Villanueva Salas, por su brindarnos sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

A mis jurados la Dra. Jenny López y la Dra. Mocita De la Fuente Torres por su asesoría y apoyo en la realización del presente trabajo de investigación.

A mis amigos por su apoyo incondicional, sus consejos y su aliento para seguir adelante.

Gleizy Fátima, Zúñiga Ortiz.

A Dios, mis padres y familiares por su apoyo incondicional, por inculcarme, darme ánimo y o dejarme desfallecer en el camino para terminar satisfactoriamente este proyecto, prometo no defraudarlos.

Gracias a todos.

Daniel Amilcar, Jacobo Cardenas

INDICE DEL CONTENIDO

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	VI
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	2
HIPOTESIS.....	3
 CAPITULO I	
MARCO TEORICO	
1.1.GRANADA (<i>Punica granatum</i>).....	4
1.2.LLANTÉN (<i>Plantago lanceolata</i>).....	8
1.3.INFLAMACION.....	10
1.4.COMPUESTOS FENOLICOS.....	17
1.5.GELES.....	21
1.6..EXTRACCION DE PRINCIPIOS VEGETALES.....	23
 CAPITULO II	
MATERIALES Y METODOS	
2.1. LUGAR DE INVESTIGACION.....	26

2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
2.3. MATERIALES.....	28
2.4. METODOS.....	30
2.5. ANALISIS CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.....	37
2.6. DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS.....	40
2.7. PREPARACION Y FORMULACION DEL GEL.....	42
2.8. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	47

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

I. IDENTIFICACION DE MUESTRAS.....	49
II. PREPARACION DE LAS MUESTRAS.....	50
III. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS.....	51
IV. DETERMINACION DE EXTRACTO SECO.....	51
V. IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS DE LLANTE GRANADA.....	54
VI. DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	57
VII. PREPARACION DE GELES DE LOS EXTRACTOS DE LLANTEN Y GRANADA.....	61

VIII.	INDUCCION DE INFLAMACION EN ANIMALES DE	
	EXPERIMENTACION.....	63
IX.	EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO ASISTIDO POR	
	EXTRACTOS DE GRANADA Y LLANTEN.....	66
	CONCLUSIONES.....	81
	SUGERENCIAS.....	82
	BIBLIOGRAFIA.....	83
	ANEXOS.....	88



Resumen

El presente estudio experimental se realizó con ratas de la raza “Holtzman”, especie *Rattus Rattus*, para poder evaluar el efecto antiinflamatorio, de los extractos de *Punica Granatum L* (Granada), *Plantago Lanceolata L* (Llantén), así como una asociación de ambos.

Para el caso de *Púnica Granatum L* (Granada), se procedió a utilizar la cascara, que fue desecada, pulverizada y uniformizada para la extracción de metabolitos secundarios, mediante el uso de metanol, seguidamente se procedió a evaluar el porcentaje de rendimiento del extracto seco. El rendimiento encontrado fue de un 32.88%.

Para el caso de *Plantago Lanceolata L* (Llantén), se procedió a utilizar hojas, que fueron previamente desecadas y pulverizadas para una correcta extracción de metabolitos secundarios, mediante el uso de metanol, posteriormente se procedió a evaluar el porcentaje de rendimiento del extracto seco el cual fue de 31.08%.

El extracto metanólico fue sembrado en placas de sílica gel, para proceder a realizar la cromatografía en capa fina, mediante el uso de fases ya establecidas así como un reactivo revelador; los resultados de la cromatografía señalan la presencia de flavonoides.

Dichos extractos fueron sometidos la determinación de ácido gálico (determinación de flavonoides), mediante el método de Folin Ciocalteau cuyo resultados son, para *Púnica Granatum L* 26.32 g por 100 g de muestra; y para *Plantago Lanceolata L*. 7.96g en 100 g por muestra.

Este mismo extracto fue utilizado para la elaboración de los geles a diferentes concentraciones (15%, 30%, y un gel mixto), estos poseen características organolépticas aceptables.

Una vez los geles fueron obtenidos, se procedió a evaluar el posibles efecto antiinflamatorio tanto de la Cascara de *Púnica Granatum L*, como de las hojas de *Plantago Lanceolata L*, así como los geles mixtos en animales de experimentación. Dicha inflamación fue causada por la aplicación de carragenina al 1% disuelta con suero fisiológico a una concentración de 1%. El volumen plantar (mL), fue medido antes de proceder a causar la inflamación a través del pletismometro digital. Este valor fue crucial para hallar el porcentaje de inflamación a distintos tiempos de medición.

Luego de aplicar los respectivos análisis estadísticos, se concluyó que el gel del extracto seco de *Plantago Lanceolata L* al 30%, tiene un mayor efecto antiinflamatorio, superior a su concentración similar al 15%, a los geles de *Punica Granatum L* (15% y 30%), y a la asociación de ambos. Por lo tanto podemos afirmar que no hay un sinergismo entre las plantas analizadas.

Palabras claves: *Púnica Granatum L*- *Plantago Lanceolata L*- Efecto antiinflamatorio-compuestos fenólicos.

Abstract

The present experimental study was conducted with rats 'Holtzman' race, species *Rattus Rattus*, to evaluate the anti-inflammatory effect of the extracts of *Punica Granatum L.* (Granada), *Plantago Lanceolata L.* (Llantén), as well as an association of both.

In case of *Punica Granatum L.* (Granada), proceeded to use the shell, which it was dried, powdered for extraction of secondary metabolites, through the use of methanol, then proceeded to assess the percentage of the dry extract performance. The performance found was of a 32.88%.

For the case of *Plantago Lanceolata L.* (Llantén), are proceeded to use leaves, that were previously dried and pulverized to a correct extraction of metabolites side, through the use of methanol, subsequently is proceeded to assess the percentage of performance of the extract dry which was of 31.08%.

The methanolic extract was planted in silica gel plates, to proceed to perform chromatography thin layer, using established phases as well as a reagent developer; chromatography results indicate the presence of flavonoids.

These extracts were subjected the determination of Gallic acid (determination of flavonoids), using the method of Folin Ciocalteu whose results are for *Punica Granatum L.* 26.32g per 100g of sample; and *Plantago Lanceolata L.* 7.96g per 100g of sample.

This same extract was used for the elaboration of the gels at different concentrations (15%, 30%, and a mixed gel), they have acceptable organoleptic characteristics.

A time them gels were obtained, is proceeded to assess the possible effect anti-inflammatory both of the shell of *Punica Granatum L.*, as of them leaves of *Plantago Lanceolata L.*, as well as those gels mixed in animals of experimentation. The inflammation was caused by the application of carrageenan 1% dissolved with physiological serum at a concentration of 1%. Volume (mL), planting was measured before proceeding to cause inflammation through the digital pletismometer. This value was crucial to find the percentage of swelling at various times of measurement.

After applying the respective statistical analyses, it was concluded that the dry extract of *Plantago Lanceolata L.* 30% gel, has a greater effect anti-inflammatory, exceeding its concentration similar to 15%, the gels of *Punica Granatum L.* (15% and 30%), and the Association of both. Therefore we can say that there is not synergy between the analyzed plants.

Keywords: *Punica Granatum L.*- *Plantago Lanceolata L.*- antiinflammatory effects- phenolics compounds.

INTRODUCCION

Dado que el Perú es un país emergente, con una amplia gama de estratos socioeconómicos, donde se distinguen 5 estratos (A, B, C, D, E) según el Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). La mayoría de la población peruana se ubica en los últimos estratos (D, E) percibiendo una remuneración mínima de 850 nuevos soles y en algunos casos esta remuneración no se cumple, por lo que solo pueden acceder a satisfacer necesidades básicas como alimentación y educación. Es por esto que muchas veces la salud queda desplazada, ya que los medicamentos tienen precios altos o poco accesibles.

En contraparte, nuestro país posee una gran biodiversidad tanto en flora como fauna, contando con una gran variedad de plantas medicinales usadas desde antaño, y algunas de ellas ya estudiadas; sin embargo, aún no se le da la importancia debida ya que carecen de una forma farmacéutica.

Por tanto el presente proyecto busca evaluar el efecto antiinflamatorio tópico del extracto de la cáscara de *Punica Granatum L.* “Granada” asociado al extracto de las hojas de *Plantago lanceolata L.* “Llantén” frente a edema plantar inducido en animales de experimentación. Es por tales motivos que nos planteamos evaluar dichas planta.

OBJETIVOS

1. Obtener los extractos metanólicos de las especies botánicas *Punica Granatum* L. “Granada” y *Plantago lanceolata* L. “Llantén”.
2. Identificar por Cromatografía en Capa Fina la presencia de flavonoides en el extracto de la cáscara de *Punica Granatum* L. “Granada”.
3. Identificar por Cromatografía en Capa Fina la presencia de flavonoides en el extracto de hojas *Plantago lanceolata* L. “Llantén”.
4. Preparar la forma farmacéutica tópica del extracto metanólico de *Punica Granatum* L. “Granada”, *Plantago lanceolata* L. “Llantén”. y combinación de ambos.
5. Evaluar los efectos antiinflamatorios tópicos de la *Punica Granatum* L. “Granada” y *Plantago lanceolata* L. “Llantén” y la asociación de ambos.

HIPOTESIS

Dado que existen antecedentes bibliográficos de la composición fitoquímica de la *Punica Granatum* L. “Granada” y *Plantago lanceolata* L. “Llantén” relacionados a un efecto antiinflamatorio es posible que la asociación de estos compuestos presenten sinergismo en cuanto al efecto antiinflamatorio tópico frente a un edema plantar en animales de experimentación.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

I. *Punica Granatum* L. “GRANADA”

La granada es una fruta atípica, ya que se caracteriza por tener una piel fuerte que contiene infinidad de pequeños gajos que son los que conforman esta fruta apetecible al paladar y totalmente beneficiosa para nuestra salud, y es que no solamente es un manjar, sino que también tiene muchas propiedades medicinales que nos ayudan a mantener una mejor salud, a continuación indicaremos la clasificación taxonómica realizada por el Herbarium Arequipense (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Myrtales</i>
Familia	<i>Lythraceae</i>
Género	<i>Punica</i>
Especie	<i>Punica granatum</i>

Fuente: Herbarium Arequipense (**Anexo 1**)

Nombre científico: *Punica granatum L.*

Nombres comunes: Granada, milgranos ^(1,2)

Aspectos ecológicos: El tipo de clima adecuado para su crecimiento es templado, caracterizado por las temperaturas diurnas y buena amplitud térmica diaria que coinciden con la maduración de la fruta. Su resistencia a la sequía, salinidad, asfixia radicular y clorosis férrica, así como a las bajas temperaturas invernales, hace que esta especie se pueda cultivar en terrenos marginales en los que es difícil adaptar las especies frutales más tradicionales. ⁽³⁾



Figura 1. *Punica granatum L.* “Granado”

Fuente: Imagen propia

Descripción morfológica:

Es un árbol que puede llegar a crecer hasta los 5 m de altura, su tronco es tortuoso, y sus ramas son delgadas. Las hojas nacen opuestas, siendo lanceoladas u oblongas, de pulgada y media dos pulgadas de largo, verdes brillantes, sostenidas por peciolo cortos,

como se muestra en la figura 1. Las flores están casi sentadas y ordinariamente solitarias. El cáliz es grueso, carnosos, de un amarillo rojizo, los pétalos están ondeados y como plegados, su color escarlata. ⁽⁴⁾

El fruto es globuloso, conocido como a caducifolio, espinoso y muy ramificado. El fruto es de forma esférica midiendo entre 5-12 cm, esférico, coriáceo, rojizo o amarillo-rojizo, coronado por los restos de los segmentos del cáliz, con lóculos en dos verticilos de ordinario el inferior con seis lóculos y el superior con tres, todos ellos separados por el endocarpo membranoso y amarillento.

Las semillas, maduras y frescas, tienen unos 12-15 por 5-7 mm, con la capa superficial del episperma, son de forma prismáticas, de un color que va desde el blanco hasta el rojo granate, y es dulce y comestible, como se muestra en la Figura 2. ⁽⁵⁾



Figura 2. Fruto de *Punica granatum* L. “Granada”.

Fuente: Elaboración Propia.

Composición

Contiene peletiraína y otros alcaloides piperidínicos, como la D-1-peletierina y la pseudopeletierina. Los taninos se presentan en forma de ácido punicotánico, además de ácido betúlico. Los granos del fruto son ricos en fitoestrógenos, como los derivados del estilbeno, quizá por eso tienen una acción sobre la fertilidad. ⁽¹⁾

Mediante métodos analíticos se detectaron la presencia de compuestos antioxidantes, como flavonoides y taninos, se encuentran presentes ácido ursólico, tocoferol, ácido elágico, quercitina, elagitaninos, luteolina y apigenina predominantemente en la corteza y raíces. ^(2, 4,6)

Usos terapéuticos

- Debido a la presencia de compuestos fenólicos se pudo demostrar la capacidad antioxidante, ya que demostró la existencia de elagitaninos, galataninos, taninos hidrolizables como punicalagina y punicalina a quienes se les atribuye dicha capacidad. ^(7,5,6)
- Capacidad anticancerígena ^(5,6), los extractos alcohólicos han demostrado una significativa capacidad anticancerígena tanto en modelos in vivo e in vitro. ⁽⁸⁾
- Capacidad antiinflamatoria ^(5,6), debido a su elevado contenido de compuestos fenólicos ha mostrado una inhibición potencial del ácido Nítrico (NO), disminuyendo significativamente el edema del ratón causado por carragenina. ⁽⁹⁾
- Capacidad antiaterosclerótica ^(5,6), debido a los compuestos fenólicos, puede ayudar prevenir varias enfermedades y reducir factores de riesgo incluyendo hipertensión arterial, colesterol alto, stress oxidativo. ⁽¹⁰⁾
- Acción bactericida y antifúngica ⁽⁵⁾, se determinó el efecto de la concentración del extracto metanólico de la droga tiene actividad *in vitro* de: *Proteus Mirabilis*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* a una concentración de 60.0µg/mL. La decocción de la droga cruda inhibe el crecimiento de: *Trichophyton tonsurans*, *T. rubrum*, *T. simii*, *Trichosporon beigeli*, *Microsporum fulvum*, *M. gypseum* and *Candida albicans*, cuando se le añade una concentración del 5% al medio de crecimiento. ⁽⁸⁾

II. LLANTEN (*Plantago lanceolata*)

Es una hierba muy común que crece espontánea en prados y campos no cultivados. Entre sus varias clases, la más usada es la que tiene hojas anchas y largas. Se usan las hojas y semillas. Es una planta rica en mucílago, y contiene además saponinas, ácido oxálico, ácido cítrico y potasio, a continuación indicaremos la clasificación taxonómica realizada por el Herbarium Arequipense (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación Taxonómica

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	<i>Lamiales</i>
Familia:	<i>Plantaginaceae</i>
Género:	<i>Plantago</i>
Especie:	<i>Plantago Lanceolata L.</i>

Fuente: Herbarium Arequipense (**Anexo 2**)

Descripción morfológica:

El llantén menor o lanceolado (*Plantago lanceolata L.*) es una planta perenne, su tamaño puede alcanzar entre 20 y 50 cm de altura. Las hojas se disponen en una roseta basal, son paralelinervias y presentan una forma linear lanceolada y pueden alcanzar los 20 cm de largo. Las flores son pequeñas, de color marrón claro, y forman espigas cilíndricas sobre largos pedúnculos acanalados más altos que las hojas. ⁽¹¹⁾

El llantén menor o lanceolado (*Plantago lanceolata L.*) se encuentra distribuido por toda Europa y Asia septentrional y central. (11,12)

La droga está constituida por las partes aéreas (*Plantaginis lanceolatae herba*) o, a veces, sólo por las hojas (*Plantaginis lanceolatae folium*). Éstas se presentan en fragmentos de color verde claro a verde grisáceo, glabros o ligeramente pelosos. Los nervios son de color verde blanquecino, dispuestos casi paralelamente, y sobresalen claramente en el envés. También se encuentran trozos de peciolo de color verde o negro pardusco con acanaladuras longitudinales. ^(11,12)

Composición química

Los componentes principales de la hoja de llantén, generalmente son los iridoides heterosídicos. Lo que más abunda es la aucubina (0.3- 2.5%), que va acompañada de catapol (0.3- 1.1%) y asperulósido. ⁽¹³⁾

Su contenido de mucilagos es de 6% con estructura de arabinogalactanos, ramnogalacturanos, glucomananos y pectinas. También contiene ácidos fenoles, como el ácido *p*-hidroxibenzoico; ácido Protocatético; ácido gentísico; ácido cafeico, y derivados de este último: ésteres cafeilquínico (ácido clorogénico), acteósido (verbascósido), planta majósido, etc. ⁽¹³⁾

Otros metabolitos secundarios son taninos, cumarinas, flavonoides y sales minerales con elevados porcentajes de zinc y potasio. ^(12,13)

Usos terapéuticos

- Se utilizan las hojas, la planta entera, raíz. ^(11,12)
- Tiene propiedades antibacterianas, pectorales, antiinflamatorias, cicatrizantes, astringentes y antihemorrágicas. ^(11,12)
- Es un buen remedio pectoral, por su contenido de mucilagos y además tiene una acción antiinflamatoria, recomendada en forma de gargarismos en la faringitis, laringitis, y afecciones catarrales de las vías respiratorias altas. ⁽¹⁾
- Por vía externa se aplica una hoja escaldada sobre las heridas recientes, donde corta la hemorragia por sus propiedades astringentes y antisépticas. ⁽¹⁾

- Se suele instilar el jugo de llantén sobre las muelas cariadas y dolorosas, así como en los oídos en caso de otitis. ⁽¹⁾



Figura 3. *Plantago lanceolata* L. “Llantén”

Fuente: Elaboración Propia.

III. INFLAMACION

Es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, de urgencia y por tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, además, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes. ⁽¹⁴⁾

Clásicamente la inflamación es considerada por los cuatro signos de Celso: calor, rubor, tumor y dolor. Como veremos posteriormente, el calor y rubor se deben a las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. El tumor

se produce por el edema y acúmulo de células inmunes, mientras que el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor.⁽¹⁵⁾

FASES DE LA INFLAMACION

De forma esquemática podemos dividir la inflamación en cinco etapas:

- Liberación de mediadores.^(14,17)
- Efecto de los mediadores.^(16,17)
- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.^(16,17)
- Regulación del proceso inflamatorio.^(14, 17)
- Reparación.^(14, 17)

Agentes causales de la inflamación

Agentes Biológicos: Son considerados las bacterias, virus, parásitos, hongos; las células de mamíferos disponen de receptores que captan la presencia de microbios; entre los receptores más importantes están los receptores de tipo Toll, que detectan la presencia de bacterias, virus y hongos, y desencadenan vías de señalización que estimulan la producción de diferentes mediadores.

Agentes Físicos: Se considera agentes físicos a toda situación que haya sido causada por traumatismos mecánicos, térmicos ya sea por calor o frío, radiaciones sea RX, luz infrarroja, luz ultravioleta, incluso la electricidad esta considerada.

Agentes químicos: Ácidos minerales, álcalis y gases irritantes actúan causando que las proteínas celulares se desnaturalicen, además sustancias como venenos, toxinas de origen animal y vegetal e especial aquellos que están formados por albumosas, peptonas, aminoácidos y grasas pueden generar inflamación, aunque la verdadera causa son las lesiones celulares que ocasionan los productos que se liberan en ellas.⁽¹⁸⁾

Clasificación de la inflamación:

Existen diferentes clasificaciones para la inflamación, según sus características del comienzo, del líquido sinovial y las manifestaciones clínicas, la inflamación articular se clasifica en aguda y crónica.

Tabla 3. Tipos de inflamación

	Tipo de respuesta	Forma de comienzo	Células que predominan	Manifestaciones clínica
Inflamación aguda	Inespecífica	Abrupta	Neutrófilos	Intensas
Inflamación crónica	Específica, mediada por células	Lesión aguda no neutralizada Ataques agudos repetidos Insidiosa desde el inicio	Macrófagos linfocitos	Discretas, aunque pueden llegar a ser intensas

Fuente: Elaboración propia

La primera según se muestra en la Tabla 1, es una respuesta inespecífica ante las agresiones; comienza de forma abrupta; presenta una clínica intensa (enrojecimiento, calor, tumefacción, dolor e impotencia funcional), aunque suele depender de la intensidad de la agresión y la susceptibilidad del paciente; se mantiene por corto tiempo; una vez eliminado el agente lesivo evoluciona favorablemente; en algunos casos, como las artritis infecciosas, puede dejar secuelas; y las células predominantes son los neutrófilos.

La inflamación crónica, por su parte, puede aparecer de 3 formas: tras la lesión aguda si no se neutraliza, por ataques repetidos de reacción aguda, y por un proceso insidioso desde el principio.

Por lo general, es una respuesta específica frente al agente agresor mediada por el sistema inmune, y las células que predominan son macrófagos o linfocitos.⁽¹⁹⁾

Mediadores químicos de la inflamación

Todo proceso inflamatorio está mediado por un grupo de sustancias químicas que son producidas por las células que intervienen en el proceso inflamatorio, o son activadas a partir de moléculas presentes en el plasma que pueden agruparse de la forma siguiente:

- Aminas vasoactivas.
- Proteasas plasmáticas.
- Complemento.
- Metabolitos del ácido araquidónico.
- Constituyentes lisosomales de las células fagocitarias.
- Radicales libres de oxígeno
- Citoquinas.

Aminas vasoactivas: La histamina se almacena en los gránulos de células cebadas, mastocitos y plaquetas, y es rápidamente liberada ante cualquier estímulo lesivo que afecte el tejido. Es responsable de la vasodilatación inicial mediada por receptores histaminérgicos H1 y H2, produciendo una contracción de las células endoteliales que crea brechas donde queda la membrana basal expuesta. La serotonina se sintetiza a partir del triptófano y produce vasoconstricción, excepto en la musculatura estriada. Ambas son responsables de producir dolor local de carácter urente. La bradicinina es el resultado final de un sistema compuesto por 4 proteínas que se activan cuando el factor Hageman (FH) o factor XII de la coagulación, se une a superficies de cargas negativas como los cristales de urato monosódico, pirofosfato dicálcico, lipopolisacáridos bacterianos, o colágenos de la membrana basal vascular. La bradicinina tiene un efecto vasodilatador de mayor duración que la histamina, un aumento de la permeabilidad vascular, broncoconstricción, aumento de la motilidad intestinal y la producción de dolor.^(16,17)

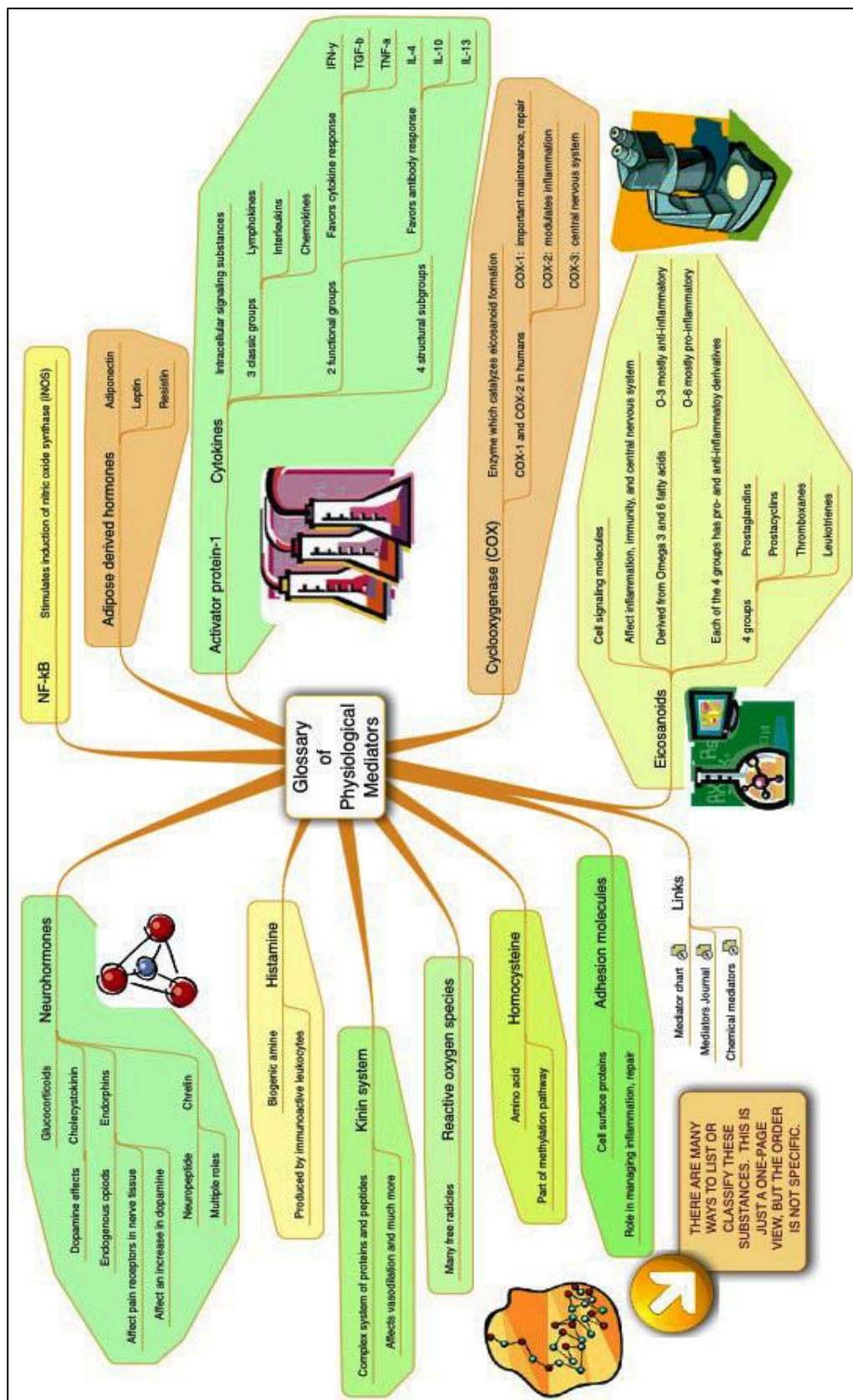


Figura 4. Mediadores químicos de la inflamación (INFLAMMATION, A review of the process)

Proteasas: Son enzimas liberadas por los leucocitos que tienen como función destruir de forma controlada la matriz extracelular, con el fin de facilitar su acceso hasta el agente lesivo, y así, retirar los tejidos afectados y facilitar su reparación. Están clasificadas en 4 grupos:

Aspartatoproteasas: la más importante es la catepsina D, que degrada los proteoglicanos del cartílago.

Cisteinproteasa: la más conocida son la catepsina B y L, que escinden los péptidos terminales del colágeno.

Serimproteasas: son la familia más importante de las proteasas, incluyendo proteínas de la coagulación y la fibrinolisis, complemento, tripsina, quimiopsina, elastasa y catepsina G. Actúan sobre la elastina, fibronectina, lámina y colágeno tipo II y IV.

Metaloproteasas: se caracterizan por requerir Zn^{++} para su actividad, entre los que se encuentran la collagenasa, capaz de degradar colágeno I, II, III, VIII, X; la lisina, que entre sus sustratos se encuentran colágeno, fibronectina, elastina y proteoglicanos; la gelatinasa, que degrada el colágeno IV y V; y la elastasa, que degrada elastina, proteoglicano, colágeno tipo IV y fibronectina.^(16,17)

Complemento: Sistema constituido por más de 30 proteínas séricas y de membrana que son activados de forma secuencial para dar origen a componentes con diversas acciones biológicas. Este sistema se puede activar por la vía clásica (mediante el complejo antígeno-anticuerpo), y por la vía alterna (por endotoxinas bacterianas, polisacáridos, veneno de cobra y agregados de inmunoglobulina). Como resultado de su activación se generan sustancias que tienen los efectos de aumentar la permeabilidad capilar, la adhesividad y la quimiotaxis de los PMN, así como facilitar la fagocitosis de las bacterias.^(17,18)

Metabolitos del ácido araquidónico El ácido araquidónico se encuentra formando parte de los triglicéridos y fosfolípidos en las membranas de la mayoría de las células,

bajo la acción de las enzimas fosfolipasas A o C queda liberado y dispuesto para sufrir la acción de otras vías enzimáticas. La cicloxigenasa se encuentra en todas las células nucleadas del organismo, y sus productos finales principales son las prostaciclina en los tejidos vasculares y los tromboxanos por las plaquetas. La lipooxigenasa aparece exclusivamente en neutrófilos, macrófagos, células cebadas y eosinófilos, y son los únicos capaces de reproducir como producto final leucotrienos. Los efectos biológicos de estas sustancias son muy variados, y difieren según sea el tejido donde se han producido. Sus efectos relacionados con la respuesta inflamatoria son principalmente vasoactivos: tanto vasodilatadores, como vasos constrictores. ^(17,18)

Radicales libres de oxígeno: Los macrófagos y polimorfo nucleares (PMN) durante su activación producen grandes cantidades de derivados de O_2 altamente activos con finalidad bactericida, que comienzan cuando el oxígeno molecular es reducido al radical libre mediante la NADPH oxidasa y forma anión superóxido (O_2^*), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso y radical hidróxido (OH^-), los que producen destrucción de la matriz intercelular para desnaturalizar las proteínas. ^(16, 17,18)

El factor activador de las plaquetas es producido por mastocitos, basófilos sensibilizados con IgE, además por monocitos, macrófagos, PMN, eosinófilos y células endoteliales, los que inducen agregación plaquetaria y liberación de sus constituyentes vesiculares, adhesión y quimotaxis de PMN, vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar con gran eficacia; es el quimiotáctico más potente de los eosinófilos.

Citoquinas: Son sustancias producidas por los linfocitos y macrófagos durante la respuesta inmunitaria con importantes funciones durante la inflamación. Se encuentran entre estas las interleuquinas desde la 1 a la 18, interferones alfa y beta, factor de necrosis tumoral alfa y beta, factores estimulantes de colonias de monocitos y granulocitos, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento de fibroblastos. Muchos de sus efectos son dirigidos a aumentar la actividad de los PMN y macrófagos, y a la expresión de moléculas de histocompatibilidad. Provocan fiebre y liberación de proteínas que forman parte de los

reactantes de la inflamación, e inducen la expresión de receptores y moléculas de adhesión, así como la proliferación de células endoteliales y fibroblastos. ^(16,18)

IV. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad englobando más de 8.000 compuestos distintos. Su forma más frecuente es la de polímeros o lignina insoluble, mientras que su presencia en los tejidos animales está relacionada con el consumo e ingestión de alimentos vegetales. ⁽²⁰⁾ La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular. ⁽²⁰⁾

Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa. ⁽²¹⁾

Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal tanto frescos como procesados. ⁽²⁴⁾ Su contribución a la pigmentación de los alimentos vegetales está claramente reconocida, a través de las antocianidinas, responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de las plantas y de sus productos. ^(20,25) Además, la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos hacia la formación de quinonas, catalizada por las enzimas polifenol oxidasas, produce un pardeamiento enzimático en los alimentos, ⁽²³⁾ fenómeno de vital importancia para asegurar la calidad de frutas y verduras durante el procesado. ⁽²⁰⁾ Igualmente los compuestos fenólicos, y en concreto los taninos condensados o proantocianidinas se asocian con la astringencia que presentan muchas de las frutas comestibles antes de la maduración. ⁽²⁰⁾

En la actualidad este grupo de compuestos fitoquímicos presenta un gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. Así, muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas

principalmente a la actividad antioxidante y las propiedades antinutritivas de estos compuestos, están relacionadas con la presencia y con el contenido de compuestos fenólicos.⁽²⁶⁾

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional. Así, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer así como en procesos de envejecimiento por lo que está siendo intensamente estudiado mediante ensayos "in vivo" e "in vitro".⁽²⁷⁾

El objetivo de esta revisión es proporcionar una visión general del aspecto nutricional de los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en la dieta.

Estructura química y clasificación

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metilésteres, glicósidos, etc.).⁽²⁷⁾ La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos.⁽²⁰⁾ Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden

encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos.⁽²⁸⁾

Según Harbome ⁽²⁹⁾ los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con un mayor interés nutricional:

Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos

Dentro de este grupo los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol están ampliamente distribuidos entre todas las especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainillínico, phidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos. Por el contrario existe poca información en la literatura científica sobre los ácidos fenilacéticos en los vegetales.⁽²⁵⁾

Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (cafeico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hallan presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido cafeico se encuentra esterificado con el ácido químico como ácidos clorogénico, isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico.⁽⁵⁾ Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido,⁽⁹⁾ mientras que los cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio.⁽²⁵⁾

Lignanós y neolignanós

Son metabolitos de las plantas de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de hidroxifenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno.⁽³⁰⁾ Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y alilbenceno.⁽³¹⁾ El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que

cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano.⁽³⁰⁾

Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación, dividiéndose en varias subclases con más de 5000 compuestos,⁽³²⁾ siendo los polifenoles más distribuidos en las plantas. Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos: dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico. Esta estructura básica presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonoides, catequinas, calconas, dihidrocalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas o flavandiol y proantocianidinas o taninos condensados (taninos no hidrolizables). Dentro de todos estos grupos las flavonas (apigenina, luteolina y diosmetina), los flavonoles (quercitina, mirecitina y kampferol) y sus glicósidos son los compuestos más abundantes en vegetales.⁽³³⁾

Taninos

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500 Y 3000 D. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales, siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras macromoléculas.

Los taninos pueden clasificarse en dos grupos: taninos hidrolizables y no hidrolizables o taninos condensados. Los taninos condensados tienen como núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa, y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente bien con el ácido gálico o bien con el ácido hexahidróxidifénico, formando los galotaninos y elagitaninos, respectivamente. Tras la hidrólisis con ácidos, bases o ciertas enzimas, los galotaninos dan glucosa y ácido gálico.⁽³⁴⁾

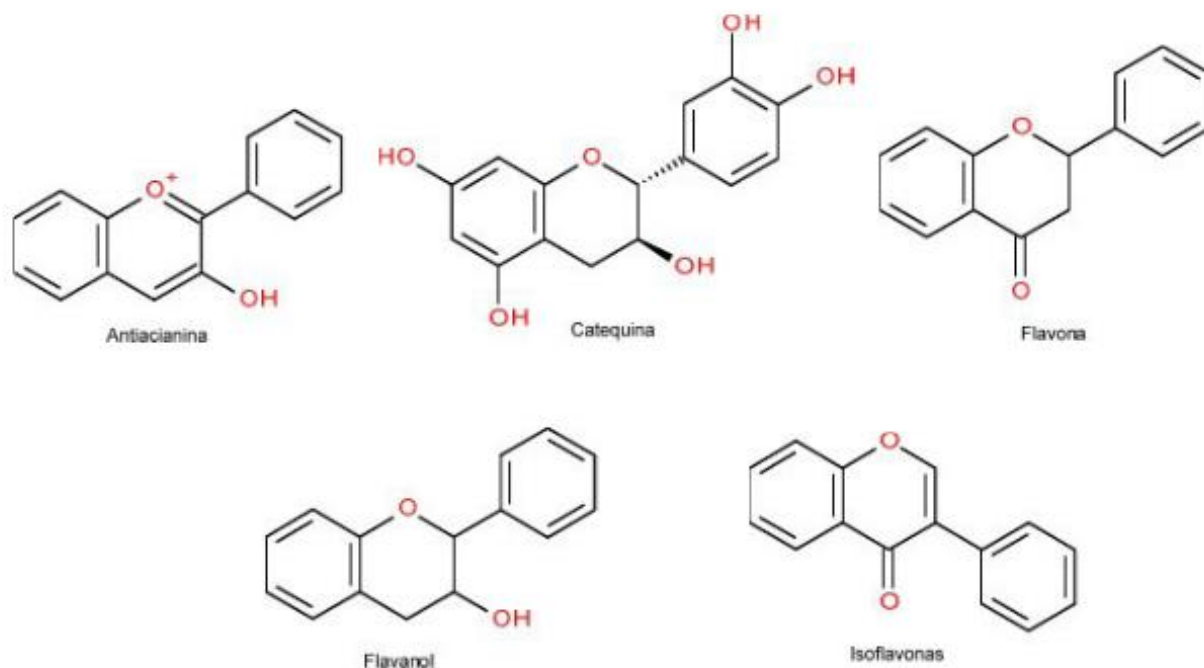


Figura 5. Estructura química de algunos compuestos fenólicos

V. GELES

Se denominan geles a coloides transparentes, son formas farmacéuticas de consistencia semirrígida, generalmente no tienen aceites grasos destinados a aplicarse sobre membranas mucosas, no tienen poder de penetración por eso se usan para ejercer acción tópica. Debido a que las partículas brownianas están cargadas eléctricamente, hay interacción entre ellas. Esto da lugar a que formen una estructura regular, lo que les da una consistencia que no es rígida como la de un cristal, pero tampoco la de un fluido que corresponde al líquido. ^(35, 36)

La característica común, es la presencia de un tipo de estructura continua que les proporciona las propiedades de los semisólidos. ⁽³⁵⁾, además de que no contienen generalmente aceites grasos, destinados a membranas mucosas, su poder de penetración es menor por lo que se utilizan para ejercer una acción tópica.

Clasificación

Dependiendo de su comportamiento frente al agua. ⁽³⁶⁾

Geles hidrófilos o hidrogeles: Constituidos por agua, glicerina, propilenglicol u otros líquidos hidrofílicos. Gelificados por sustancias de tipo poliméricas, goma tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros carboxílicos o silicatos de aluminio o magnesio. ⁽³⁶⁾

Geles hidrófobos o lipogeles: Constituidos por parafina líquida adicionada de polietileno o por aceites grasos gelificados por anhídrido silícico coloidal o por jabones de aluminio y zinc. ⁽³⁶⁾

Según el número de fases en que están constituidos

Geles Monofásicos: El medio líquido lo constituye una sola fase o líquidos miscibles; agua – alcohol, solución hidroalcohólica, aceite. ⁽³⁶⁾

Geles Bifásicos: Constituidos por dos fases líquidas inmiscibles, formándose una estructura transparente con propiedades de semisólido. Los geles bifásicos se subdividen en 2 grupos: ⁽³⁶⁾

- Los TOW gels, el lípido se incorpora a la micela que forma el emulgente, el cual se comporta como agente solubilizante. Los TOW gels, se presentan en forma de un sistema de cristales líquidos, transparentes y viscosos. Son sonoros o vibrantes a la percusión, también se les denomina con el nombre de ringing gels, a estos geles se les puede incorporar sustancias tanto lipófilas como hidrosolubles.

Esta formulación es simple en cuanto a ejecución y comprende: agua, un lípido líquido, un cosolvente que facilita la micelización del líquido, uno o más emulgentes hidrófilos de elevado HLB capaces de formar micelas. ⁽⁴⁷⁾

- Los TAS gels, son geles transparentes basados en emulsiones de siliconas W/S. Se considera como una crema trasparente de agua en siliconas, de gran aplicación cosmética. A esta formulación pueden incorporarse diversas sustancias como clorhidrato de aluminio, filtros solares. Se aplican cuando hay que formular geles hidrorrepelentes.⁽⁴⁷⁾

VI. EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS VEGETALES

Métodos de extracción

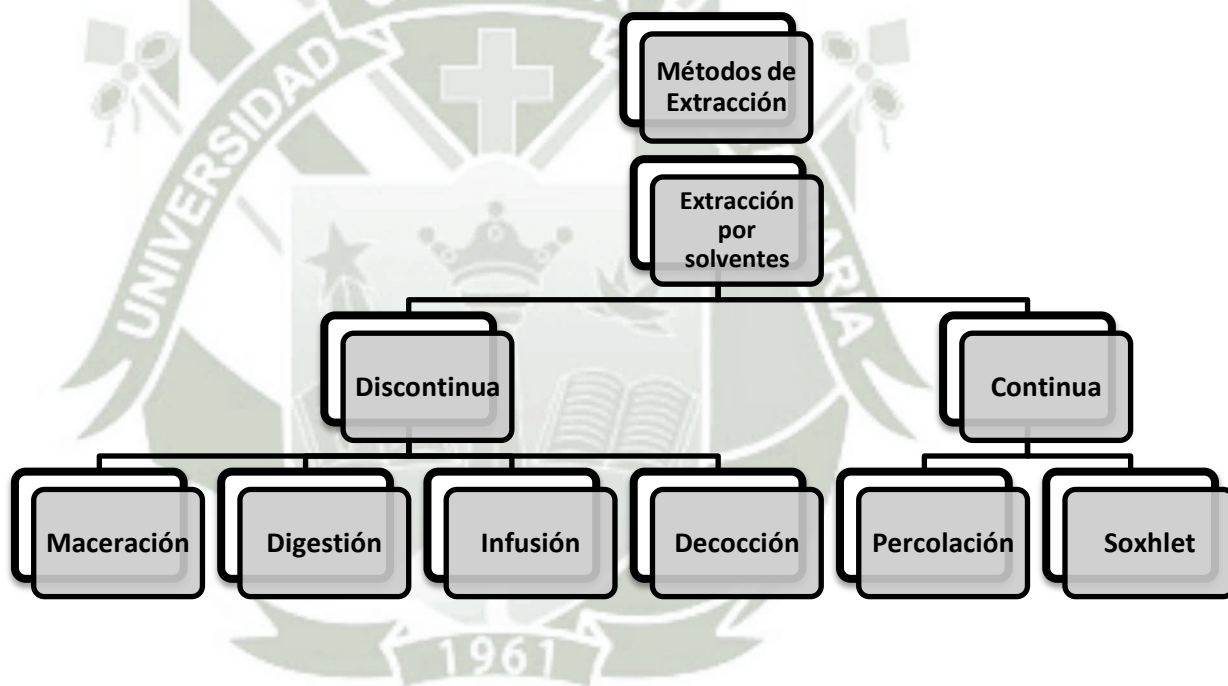


Figura 6. Métodos de extracción

Fuente: Elaboración propia

EXTRACCION DISCONTINUA

También llamada simultánea, en este proceso se sumerge la droga en el disolvente, por lo que el total de la droga contacta con él, difundándose los principios activos de la droga al disolvente hasta alcanzar el equilibrio. La droga seca y molida se pone en

contacto con el disolvente a temperatura ambiente, dejando la mezcla en reposo durante un tiempo determinado. Transcurrido el tiempo de maceración, se decante el extracto y se elimina el residuo vegetal. ⁽³⁷⁾

Maceración: La droga con el grado de tenuidad prescripto se pone en contacto con el solvente en un recipiente de cierre perfecto a temperatura ambiente. Se deben realizar agitaciones frecuentes a lo largo de varios días, tratando de influenciar el gradiente de concentración. Al principio de la extracción este gradiente está en su punto máximo, con el correr de los días a pesar de la agitación, va disminuyendo. Como norma se macera la droga por 7 días con agitación frecuente y protegido de la luz solar. Si el menstuo es agua, no sobrepasar las 48 horas para evitar fermentación y formación de mohos. Se separa el extracto del residuo por medio de un colado o prensado, se lava el residuo con el líquido de extracción. La maceración es útil cuando los principios son fácilmente solubles en frío y cuando la acción de la temperatura los altera. ^(37,38)

Digestión: Es un procedimiento similar a la maceración pero abreviado y efectuado con ayuda del calor (35 - 55 °C, aunque se acepta de 40 a 80 °C). Se emplea para principios activos que son poco solubles en frío y cuando el solvente a ebullición puede alterarlos o disolver otras sustancias perjudiciales o inactivas, la temperatura de trabajo previene el ataque microbiano. Cuando el menstuo es volátil se debe adaptar un sistema de refrigerante a reflujo. ^(37,38)

Infusión: Son formas farmacéuticas líquidas, constituidas por una solución extractiva, obtenida por la acción continuada del agua caliente durante 20 minutos, sobre la droga convenientemente dividida, se procede a verter el agua hirviendo sobre la droga dividida, en cantidad aproximadamente igual al total, se tapa el recipiente preferentemente de cierre perfecto y se macera durante 20 minutos, finalmente se filtra para clarificar la solución obtenida. La temperatura máxima que se alcanza es de 80 o 90 °C posteriormente se deja a enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente. ^(37,38)

Decocción: O también llamada cocimiento, es un método extractivo energético donde el solvente actúa a temperatura de ebullición durante 20 minutos se extrae los principios activos solubles de la droga, es una forma farmacéutica líquida de presentación extemporánea constituida por una solución extractiva, preparada por la acción del agua mantenida a ebullición, sobre la droga fraccionada, se debe reponer el agua conforme esta se vaya evaporando para que no se queme la droga. ^(37,38)

EXTRACCION CONTINUA

Percolación: Consiste en hacer pasar el solvente a través de la droga, hasta su extracción exhaustiva completa con el solvente renovado, en pequeña escala se realiza en percoladores, de cuerpo cilíndrico y cónico, provistos de un grifo en la parte inferior para regular el flujo del solvente, la capa de la droga debe ser igual al diámetro medio del equipo. ⁽³⁹⁾

Para dar inicio se debe humedecer la droga para así aumentar el contacto ya que aumenta la porosidad de la pared celular, para facilitar el paso de solventes y no permitir el paso de falsas vías que puedan perjudicar el proceso. Su principal problema es el abundante consumo de solvente. ^(39,40)

Soxhlet: Es el método estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en el siglo pasado, y actualmente, es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción, se utiliza esta técnica clásica como método oficial para la extracción continua de sólidos.

En este procedimiento la muestra sólida finamente pulverizada se coloca en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor soxhlet. Se calienta el disolvente extractante, situado en el matraz, se condensan sus vapores que caen, gota a gota, sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente. ^(39,40)

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

I. LUGAR DE LA INVESTIGACION

La realización del presente trabajo, incluyéndose la elaboración de extractos, investigación cromatografía, el análisis espectrofotométrico y el estudio en animales de experimentación fueron realizados en los laboratorios de Farmacognosia H-203, H-103 y H-104 de la Universidad Católica de Santa María.

II. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo es un estudio prospectivo, experimental se realizó con ratas machos y hembras de la especie *Rattus Rattus*, de la raza “Holtzman”.

Se utilizaron 35 ratas, tanto hembras como machos, con una variación de peso entre los 200 a 250 g, con una edad alrededor de 6 meses, éstas fueron divididas en 8 grupos, como se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Distribución de los animales de trabajo

Grupo	Nombre del grupo	Número de animales	Tratamiento
G1	Control	5	-
G2	Gel Base	5	Gel base sin principio activo
G3	Gel extracto llantén 15%	5	Gel extracto llantén 15%
G4	Gel extracto llantén 30%	5	Gel extracto llantén 30%
G5	Gel extracto Granada 15%	5	Gel extracto Granada 15%
G6	Gel extracto Granada 30%	5	Gel extracto Granada 30%
G7	Gel extracto llantén y granada mixto 15%	5	Gel extracto mixto 15%
G8	Gel extracto llantén y granada mixto 30%	5	Gel extracto mixto 30%

Fuente: Elaboración propia

III. MATERIALES

Material biológico

Para el siguiente trabajo de investigación se utilizó la cáscara previamente desecada de Granada (*Punica Granatum L.*) además de las hojas secas de Llantén (*Plantago lanceolata L.*).

Unidad Animal

Los animales fueron utilizados para determinar el efecto antiinflamatorio de Granada (*Punica Granatum L.*) y Llantén (*Plantago Lanceolata L.*), durante la realización de este trabajo se escogió 35 ratas tanto hembras como machos de la raza “Holtzman”, de la especie *Rattus Rattus*, con un peso promedio de 200 g hasta los 250 g, todos los

individuos usados fueron adultos jóvenes, sanos con un tiempo de vida de 6 meses, que fueron suministrados por el bioterio de la Universidad Católica de Santa María.

Material de Laboratorio

Material de Vidrio

- Baguetas
- Balones de 250 mL.
- Capilares
- Celdas para espectrofotometría
- Cuba cromatográfica
- Embudos
- Frascos de Vidrio
- Fiolas 25, 50 mL
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas de 1mL, 2mL, 5mL, 10mL.
- Probetas de 10mL, 50mL y 100mL
- Termómetro
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 500 mL.

Equipos

- Balanza Analítica OHAUS PIONEER TM.
- Baño María modelo Masson
- Cocina Eléctrica
- Equipo de extracción Soxhlet
- Espectrofotómetro SHIMADZU UV 160
- Estufa Esterilizadora 854 Shwabach - Germany.
- Lámpara de luz ultravioleta CAMAG
- Pletismómetro Digital L.E. 7500
- Procesador de alimentos OSTER 6400

Otros Materiales

- Algodón
- Atomizador
- Cámara fotográfica Canon 550D
- Dosificador de gel
- Espátulas
- Guantes
- Gradilla para Tubos de ensayos
- Jaulas metálicas para ratas.
- Jeringas de 1mL
- Mortero
- Placas de Sílica Gel
- Papel Aluminio
- Papel Filtro
- Papel Kraft
- Pinzas metálicas
- Pabilo
- Trípode
- Tijeras

Reactivos

- λ -carragenina
- Ácido Gálico P.A. SIGMA ALDRICH
- Acetato de etilo J.T. BAKER (Q.P.)
- Ácido Acético J.T. BAKER (Q.P.)
- Ácido Fórmico MERCK (Q.P.)
- Agua destilada
- Alcohol etílico comercial
- Carboximetilcelulosa LABOCHINI
- Carbonato de Sodio
- Cloruro de Sodio

- Metanol MERCK
- Metilparabeno NEQUINSA
- Propilenglicol MERCK
- Propilparabeno NEQUINSA
- Tricloruro de aluminio 1% RIEDEL DE HAEN (Q.P.)
- Trietilonamina MERCK
- Tritón
- Reactivo de Folin Ciocalteau P.A. MERCK

IV. METODOS

Procesamiento del material vegetal

Recolección

Las hojas de Llantén (*Plantago Lanceolata L.*) fueron recolectadas en el distrito de Majes ($16^{\circ}21'46''S$ $72^{\circ}11'27''O$) en la zona C parcela 45, ubicada en la provincia de Caylloma, ciudad de Arequipa, la cantidad recolectada fue aproximadamente 3 kilos en horas de la mañana en el mes de agosto, la muestra fue posteriormente trasladado a Arequipa; donde se realizó su respectiva limpieza con un paño húmedo para eliminar cualquier rastro de suciedad o algunas hojas marchitas. Para la identificación taxonómica de la especie en estudio se envió una muestra de la planta al laboratorio de botánica de la Universidad Nacional San Agustín, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias “HERBARIUM AREQUIPENSE”, donde se certificó que la presente especie es *Plantago Lanceolata L.* (Anexo 1)



Figura 7. Llantén

Fuente: Elaboración Propia.

El fruto del árbol Granado (*Punica Granatum L.*), fueron recolectados en el distrito de Majes ($16^{\circ}21'46''\text{S } 72^{\circ}11'27''\text{O}$) en la zona C parcela 45, la cantidad de fruta recogida fue aproximadamente 3 kilos en horas de la tarde, también fue recolectado de la zona denominada La colina parcela A 75, en este lugar se procedió a recolectar un aproximado de 2 kilos, ambas localidades ubicadas en la provincia de Caylloma, una vez con el producto recolectado se procedió a limpiar cada fruto con un paño húmedo para eliminar cualquier rastro de suciedad y eliminar las que estaban deterioradas.

El mencionado fruto fue trasladado a la ciudad de Arequipa, para su respectiva identificación taxonómica, se envió una muestra de la planta al laboratorio de botánica de la Universidad Nacional San Agustín, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias “HERMARIUM AREQUIPENSE”, donde se certificó que la presente especie es *Punica Granatum L.* (anexo 2)



Figura 8. Fruto de granada

Fuente: Elaboración Propia.

Selección

Una vez fueron recolectados e identificados taxonómicamente, tanto las hojas de Llantén (*Plantago Lanceolata L.*) y el fruto de la Granada (*Punica Granatum L.*), luego se procedió a escoger los mejores ejemplares, dejando de lado a aquellos que presentaban algún estado de deterioro, rupturas o hayan sido de alguna manera contaminados por insectos, para posteriormente lavarlos y así quitar cualquier otra impureza.

En cuanto a la parte de la granada a utilizar fue la cascara.

Estabilización

Para evitar la degradación de nuestros principios activos, tanto en las hojas de Llantén (*Plántago Lanceolata L.*) y la cáscara de granada (*Punica Granatum L.*), se procedió a estabilizar en seco en una estufa atemperada a 80°C por 5 minutos, luego de este tiempo se procedió a retirar la muestra.

Desecación

La desecación de las hojas de Llantén (*Plántago Lanceolata L.*), se realizó mediante calor artificial en estufa de desecación, con una temperatura constante de 50°C, donde permaneció hasta que se obtuvo un peso constante.

La desecación de la cáscara de Granada (*Punica Granatum L.*), se realizó mediante el método anterior, a una temperatura constante de 50°C, permaneciendo hasta que se obtuvo un peso constante, una vez terminado esto se procedió a guardar el material, dejándolo listo para realizar la siguiente fase de nuestro proyecto.

Pulverización y almacenamiento

Luego de desecar convenientemente las hojas de Llantén (*Plántago Lanceolata L.*) se procedió a pulverizar con la ayuda de un mortero, siempre tratando de retirar cualquier impureza (ramas) hasta la obtención de un polvo fino y uniforme para así aumentar la superficie de contacto al momento de la extracción con los solventes y haciendo más

accesible la extracción de los metabolitos, seguidamente esto fue acopiado en papel Kraft previamente acondicionado y rotulado para guardarlo en un lugar cerrado, libre de humedad, a una temperatura adecuada y lejos de la luz solar.

En el caso de Granada (*Punica Granatum L.*), luego de ser desecada tiende a endurecer, por lo que se procedió a cortarla en pequeños trozos, una vez realizado todo este trabajo las piezas fueron colocadas en el procesador de alimentos OSTER 6400, hasta alcanzar la muestra fina e uniforme para aumentar la superficie de contacto al momento de la extracción, de la misma manera que la muestra anterior, fue almacenada en un acopiado de papel kraft, y rotulado siguiendo todos las pautas necesarias para su adecuada conservación.

V. PREPARACION DE EXTRACTOS

Extracción por Equipo Soxhlet

Es un método de extracción continua que se utiliza para materiales sólidos. Consiste en colocar el material a extraer, previamente molido y pesado en un cartucho de celulosa de clasificación rápida, que se introduce en la cámara de extracción, conectada por una parte a un balón de destilación y por otra a un refrigerante. El disolvente contenido en el balón se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material. Cuando alcanza el nivel conveniente sifón por el tubo regresando al balón. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento del deseado material. ⁽³⁸⁾

Procedimiento

Se procedió a pesar 25g una de las muestras a usar, seguidamente se empaquetó en una hoja de papel filtro, referido también como cartucho poroso y fue colocado en el extractor del equipo Soxhlet.

En el balón del equipo extractor se colocó 150 mL del solvente indicado, en este caso se procedió a utilizar metanol, luego se procedió a armar el equipo, y se sometió calor

constante de 70°C, por un tiempo de 7 horas hasta que el solvente haya consumido toda la muestra del cartucho poroso. Así como se muestra en la Figura 10 y la Figura 11.

Para posteriormente retirar toda la muestra que quedo en el cartucho, al terminar todo el proceso se dispuso a desarmar el equipo, que se dejó enfriar previamente.

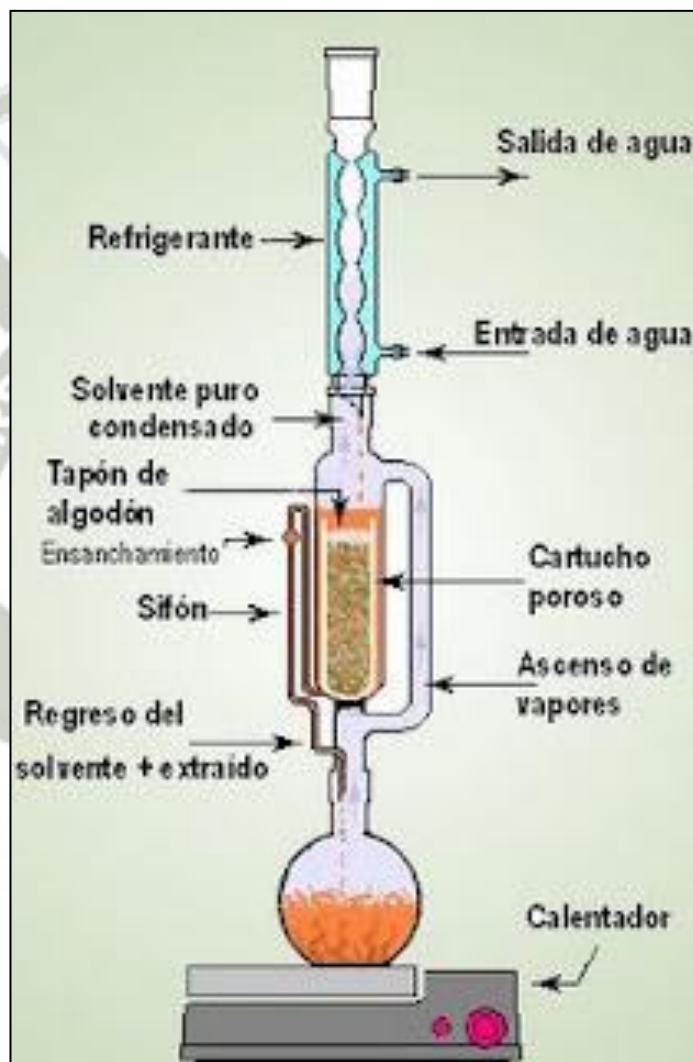


Figura 9. Equipo Soxhlet

Fuente: Obtención de aceites esenciales – Materias primas, Vicent Perales)

**Figura 10. Obtención del extracto de
Llantén**



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 11. Obtención del extracto de
Granada**



Fuente: Elaboración propia.

Determinación del extracto seco

Evaporación a sequedad

Se basa en la obtención del extracto seco a partir de la separación del solvente y del principio activo aplicando una temperatura adecuada y sometiéndose el extracto a Baño María, hasta la evaporación total del solvente, quedando el principio activo que se desea obtener en el fondo del recipiente.⁽³⁸⁾

Procedimiento

Se colocó el extracto metanólico obtenido por la extracción Soxhlet, en un vaso de precipitado previamente tarado y se puso a baño María a una temperatura de 70°C para proceder a la evaporación del solvente, se realizó hasta la aparición del residuo con peso constante, finalmente se procedió a calcular el rendimiento del extracto seco. (En la

figura 12 se muestra el extracto seco de Granada, y en la figura 13 se muestra el extracto seco de Llantén).

Figura 12. Extracto seco de Granada



Fuente: Elaboración propia.

Figura 13. Extracto seco de Llantén



Fuente: Elaboración propia.

Cálculos

$$\%ES = \frac{PF}{PI} * 100$$

Donde:

%ES= Porcentaje del extracto seco

PF= Peso Final

PI= Peso inicial

VI. ANALISIS CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

La cromatografía en capa fina, también conocida como TLC (Thin Layer Chromatography), es actualmente una de las técnicas más usadas para la separación, identificación y purificación de sustancias químicas.⁽⁴¹⁾

Fundamento:

La cromatografía en capa fina, es una técnica analítica que permite la separación de mezclas de moléculas mediante el principio del reparto entre dos fases. La fase móvil se hace pasar a una fase estacionaria (Sílica gel) mediante un correcto sembrado, permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interaccione. Un segundo medio (la fase móvil) que es inmiscible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para "lavar" (eluír) a las moléculas en la muestra.⁽⁴²⁾

Debido a que las distintas moléculas en la muestra presentan diferente coeficiente de reparto, la fase móvil "lavará" a los distintos componentes con diferente eficiencia, de modo que aquellos que "prefieren disolverse" en la fase móvil serán eluidos más rápido que los que sean preferencialmente solubles en la fase estacionaria. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes se separan en bandas o en zonas que pueden analizarse cualitativamente.⁽⁴²⁾

Procedimiento:

Se procedió a preparar las placas de sílica gel 60 F₂₄₅ con un tamaño de 10 x 3 cm y 10 x 2 cm, una vez realizado esto se trazó una línea con un lápiz en cada borde dejando un tamaño de 1 cm tanto en la parte de arriba como en la parte de abajo. Luego se procedió a realizar el sembrado mediante la ayuda de capilares previamente cargados con la sustancia a sembrar (como se muestra en la figura 12), para terminar se colocaron las placas en la cuba cromatográfica, que contenía la fase móvil adecuada para realizar la corrida. El solvente subirá por capilaridad e irá arrastrando las moléculas, las cuales se moverán según la afinidad que muestren por la fase estacionaria. Si la mezcla de muestras que se está analizando presenta color, se verán los distintos colores migrando a

distintas velocidades. Una vez terminado esto las placas fueron rotularas en la parte de atrás y guardaras en un contenedor especial para evitar algún futuro deterioro, y siempre protegido de la luz solar, para más adelante hacer una correcta identificación de los componentes, se utilizó un revelador químicos y el uso de la lámpara UV

Figura 14. Sembrado de placa sílica gel



Fuente: Elaboración propia.

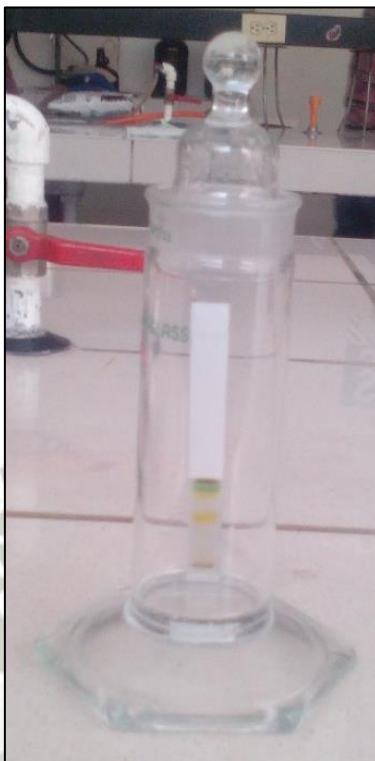
Factor de Retraso o Retención

También conocido como R_f es el factor que mide la movilidad relativa de cada componente con respecto al máximo posible, la distancia recorrida por el frente de la fase móvil, como se observa en la Figura 13. ⁽⁴⁴⁾

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}}$$

La distancia recorrida se mide desde el centro de la mancha. Para que los R_f se puedan calcular se necesita cumplir una serie de requisitos: fase estacionaria, cantidad de muestra, espesor de la placa, fase móvil. El valor máximo de R_f es 1, se debe tener en cuenta que si las manchas no son simétricas la medición será en base a la posición de la intensidad máxima. ⁽⁴⁴⁾

Figura15. Corrida de muestra en cuba cromatográfica



Fuente: Elaboración propia.

Identificación de Flavonoides:

Preparación de la Fase móvil:

Tabla 5. Proporción de la fase móvil

Acetato de Etilo	Ácido Acético	Ácido Fórmico	Agua
100	11	11	26

Se procedió a colocar las sustancias mencionadas en un vaso de precipitado haciendo la equivalencia para 5 mL, se puso 3.82 mL de acetato de etilo, 0.37 mL de ácido acético, 0.37 mL de ácido fórmico y 0.44 mL de agua, una vez listo se colocó esta mezcla en la cuba cromatográfica.

Preparación de la fase estacionaria:

Se procedió a preparar la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ en láminas de 2 x 10 cm y 3 x 10 cm (ancho: largo), se trazó la zona de sembrado para ambas muestras con un lápiz dejando 1 cm de espacio tanto en la parte de arriba como en la parte de abajo.

Preparación de la muestra:

Se tomó con el capilar la solución metanólica del extracto, tanto de Granada (*Punica Granatum L.*) como Llantén (*Plántago Lanceolata L.*), y se colocó en el lugar trazado en la placa de sílica gel 60 F₂₄₅ teniendo mucho cuidado de no malograr o ensuciar la placa, la placa fue sembrada un total de 15 veces.

Desarrollo:

Una vez se terminó el sembrado se dejó secar la placa por un lapso breve de tiempo para seguidamente colocarla en la cuba cromatográfica, cerrada herméticamente y cargada con la fase móvil, luego se esperó hasta que el solvente ascienda hasta la marca del borde superior.

Detección:

Al culminar de ascender, se retiró la placa, se dejó que seque al medio ambiente, y se procedió a revelar con AlCl₃ al 1% en etanol (0.2 mg de Tricloruro de Aluminio en 20 mL de Etanol), se secó al medio ambiente.

Determinación de R_F:

Se calculó los R_f de cada una de las manchas halladas en las placas de sílica gel F₂₄₅, los flavonoides son de color amarillo, verde, amarillo verdoso.

VII. DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES (CFT)

Se determinó los compuestos Fenólicos Totales mediante el método de Folin - Ciocalteu.

METODO FOLIN –CIOCALTEU

Su fundamento se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin- Ciocalteu, a pH básico, obteniendo así una coloración azul susceptible a ser determinada fotométricamente a 765nm. El contenido de este reactivo es una mezcla de wolframio sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formando dos sales en el medio ácido), de color amarillo el reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles. ⁽⁴⁵⁾

DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

Para empezar con la determinación de compuestos fenólicos por el método de Folin- Ciocalteu se preparó Carbonato de Sodio al 7.5%, tomando 1, 875 gr de Carbonato de Sodio y diluyéndolo en 25 mL de agua destilada. ⁽⁴⁵⁾

Luego se preparó la solución madre de ácido gálico de 800 ppm, pesando 0,004 gr. para una fiola de 50 mL luego ser diluido en 50 mL de agua destilada. A partir de esta disolución se prepararán 10 mL de disoluciones diluidas de concentraciones de ácido gálico de entre 0 y 200 ppm. ^(45,46)

Tabla 6. Preparación de las soluciones estándar de ácido gálico

Concentración de Ácido Gálico (mg/L)	Volumen medido de la Solución Patrón de ácido gálico 800 ppm (mL)
0	0
40	0,5
80	1,0
120	1,5
160	2,0
200	2,5
400	5.0

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 7. Preparación de la curva de calibración de ácido gálico

N° de Patrón	Blanco	Std. 1	Std. 2	Std.3	Std. 4	Std. 5	Std. 6
Concentración de Ácido Gálico (ppm)	0	40	80	120	160	200	400
Solución Patrón de Ácido Gálico (mL)	0	1	1	1	1	1	1
Agua destilada (mL)	4	3	3	3	3	3	3
Reactivo de Folin-Ciocalteu (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Carbonato de Sodio al 7,5% (mL)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Volumen Final de los tubos de ensayo (mL)	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL	6 mL

Fuente: Elaboración propia

Finalmente se procedió a medir las absorbancias a 760 nm en el espectrofotómetro y así obtener la curva estándar. Para medir las muestras obtenidas por Extracción Soxhlet se hizo el mismo procedimiento de la Tabla N°6 solo que en lugar de usar la Solución de Ácido Gálico se usaron nuestros extractos, de los cuales se tomó 1,5 gramos y 10 mL de solvente y a partir de esta disolución se procedió con el método de Folin- Ciocalteu. . Todas las muestras antes de ser leídas fueron puestas en oscuridad por media hora y a temperatura ambiente.

VIII. PREPARACION Y FORMULACION DEL GEL

Objetivo

Describir el proceso para la elaboración de los geles a base de hojas de Llantén y cáscara de Granada usando como gelificante carbopol.

Componentes usados para la elaboración del gel

- Agua destilada
- Carbopol 940

- Metilparabeno
- Propilparabeno
- Propilenglicol
- Trietanolamina
- Etanol
- Extracto seco de Granada (*Punica Granatum L.*)
- Extracto seco de Llantén (*Plántago Lanceolata L.*)

Formulación del Gel base, Gel con extracto seco de Llantén (*Plántago Lanceolata L.*) 15 y 30%, Gel con extracto seco de Granada (*Punica Granatum L.*) 15 y 30%, y Gel mixto 15 y 30%

Elaboración del gel:

Para la adecuada elaboración del gel, se procedió a revisar la adecuada limpieza de todos los materiales y utensilios necesarios para la elaboración del gel, se pesó con atención cada componente. Seguidamente se dispersó el carbopol en parte del diluyente, mediante agitación constante, evitando así la formación de grumos.

Se dejó reposar hasta la total inhibición del diluyente, posteriormente se agitó constantemente para evitar la incorporación de aire, hasta la obtención de un gel uniforme, después de eso se disolvió los extractos en un solvente adecuado (etanol 96%).

En un vaso de precipitado extra, se disolvió el metilparebano, el propilparebano, el propilenglicol, los extractos previamente diluidos y agua destilada en Baño María a una temperatura de 50°C.

Una vez que todo estuvo bien disuelto, se obtuvo un gel de aspecto uniforme, al obtener este gel uniforme, se procedió a adicionar trietanolamina hasta alcanzar un pH de 7, finalmente se envasó el gel en recipientes previamente rotulados y adecuados para su conservación.

IX.TECNICA PARA MEDIR EL GRADO DE INFLAMACIO_n EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION:

Método:

El edema plantar causado por la aplicación de carragenina, fue elaborado por Winter et al. Siendo modificado posteriormente por Sugishita et al. (1981).

Fundamento:

El método de edema plantar inducido por carragenina consiste en la administración subcutánea de una solución de carragenina (un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondus crispus* a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por la liberación de diversos factores del complemento que están implicados en la amplificación de la respuesta. ⁽⁴⁸⁾

Una hora después de la administración de la sustancia problema, la histamina y la serotonina tienen un papel principal como mediadores. Aproximadamente de una hora y media a dos horas y media después de la inyección de carragenina, intervienen en las cininas como mediadores. La última fase esta mediada por prostaglandinas (PGE1, PGE2 y PGF2). La respuesta vascular máxima ocurre a las cuatro horas de la administración y coincide con la dase mediada por las prostaglandinas. ⁽⁴⁸⁾. La inflamación fue medida con el Pletismómetro digital LE 7500 equipo que fue utilizado en nuestro estudio.

Figura 16. Pletismómetro Digital



Fuente: Elaboración propia.

Procedimiento:

Una vez seleccionadas las ratas, se procedió a distribuir los animales según el grupo que se les asignó para su respectivo tratamiento, se tomó el volumen inicial de la pata derecha posterior de las ratas en el pletismómetro digital (Figura 14), a su vez se empezó a preparar solución la carragenina 1% con suero fisiológico a una temperatura de 30°C para así asegurar que se disuelva bien y evitar la formación de grumos. Con todos los animales previamente marcados y en sus respectivos grupos se procedió a cargar la jeringa con 0.1 mL de carragenina al 1% y posteriormente se aplicó en la pata derecha posterior de cada animal.

Se administraron los siguientes tratamientos:

- **Grupo control:** Se procedió solo a tomar la medida de las patas derechas posteriores sin aplicación de gel o carragenina.
- **Grupo Gel base:** Se procedió a aplicar la carragenina con un gel blanco, sin principio activo alguno.
- **Grupo 1:** Se procedió a aplicar el gel Llantén al 15% en la pata derecha posterior.
- **Grupo 2:** Se procedió a aplicar el gel de Llantén al 30 % en la pata derecha posterior.
- **Grupo 3:** Se procedió a aplicar el gel de Granada al 15% en la pata derecha posterior.
- **Grupo 4:** Se procedió a aplicar el gel de Granada al 30% en la pata derecha posterior.
- **Grupo 5:** Se procedió a aplicar la asociación del gel de Granada y el del de llantén a 15% en la pata derecha posterior.
- **Grupo 6:** Se procedió a aplicar la asociación del gel de Granada y el del de llantén a 30 % en la pata derecha posterior.

Las lecturas se hicieron en la pata posterior derecha luego de 1, 2, 5, 6, 8, y 9 horas.

Grupos de estudio:

Como ya se ha mencionado en el presente trabajo se utilizó 35 ratas, los animales se dividieron en 8 grupos cada uno con 5 individuos como describiremos:

- **G1 Grupo Control:** No se aplicó ningún tratamiento ni se causa inflamación.
- **G2 Grupo Gel Base:** Se aplicó el gel blanco, sin principio activo.
- **G3 Grupo gel con extracto llantén 15%:** se aplicó el gel con extracto de llantén al 15%.
- **G4 Grupo gel con extracto llantén 30%:** se aplicó el gel con extracto de llantén al 30%.
- **G5 Grupo gel con extracto granada 15%:** se aplicó el gel con extracto de granada al 15%.
- **G6 Grupo gel con extracto de granada al 30%:** se aplicó el gel con extracto de granada al 30%.
- **G7 Grupo gel mixto 15%:** se aplicó el gel mixto al 15%.
- **G8 Grupo mixto al 30%:** se aplicó el gel mixto al 30%.

Procedimiento:

Se marcó la pata de la rata hasta donde se introducirá en el pletismómetro digital., ahí mediremos el volumen inicial de la pata (t_0), después de eso se procedió a la administración de 0.1 mL de carragenina al 1% con una aguja de tuberculina, para evaluar la inflamación producida se espera 1 hora para ver cómo va la inflamación, seguidamente se vuelve a medir a las 2 horas donde la inflamación será más notoria. Posteriormente se aplicaron los tratamientos a evaluar (geles llantén, granada, mixtos), luego de un tiempo prudente, se volvió a medir el volumen de la pata marcada con un intervalo de 2 horas.

Tabla 8. Esquema de procedimientos pre y post aplicación de Carragenina al 1%

Antes de iniciar los tratamientos se procedió a medir los volúmenes basales de la patas 15 minutos de la aplicación de carragenina, teniendo como volumen basal de 0.814 ± 0.05 mL

Hora	Minutos	Numero de lectura	Procedimiento
8.00	0 '		Aplicación de carragenina 1%
8.05	5 '	1ra lectura	
9.05	65 '	2da lectura	
10.30	150 '	3era lectura	
11.00	180 '		Aplicación del gel Tópico (2.5 mg)
12.30	270 '	4ta lectura	
14.00	360 '	5ta lectura	
15.30'	450 '	6ta lectura	
17.00	540 '	7ma lectura	

Elaboración: Fuente propia

X. TECNICAS PARA EL ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

La estadística nos permite determinar y cotejar cuantitativamente los resultados de la investigación realizada, para una correcta interpretación y análisis de las variables se usaran los siguientes instrumentos estadísticos. ^(59, 60)

PARAMETROS DE DISTRIBUCION

- **Media aritmética:** También llamada como promedio aritmético, puede ser hallada mediante la suma de todos los valores individuales de las variables y divididos por la cantidad de variables totales. ^(59,60)

$$\bar{X} = \frac{\alpha_1 + \dots + \alpha_n}{n}$$

Donde:

$\bar{x}$ = Promedio

a_i = valor correspondiente a cada elemento

n = número de elementos.

PARAMETROS DE DISPERSION

- **Desviación estándar:** También conocida como índice numérico de dispersión de un grupo de datos, mientras la dispersión estándar sea mayor, mayor será la dispersión de la población. La desviación estándar mide el grado de dispersión, midiendo la diferencia entre cada valor del conjunto de variables, así como en conjunto.⁽⁶⁰⁾ Finalmente si dividimos el resultado por el número total de observaciones, llegaremos a un promedio de las distancias entre variables individuales y media. Dicho promedio es la desviación estándar y así representa dispersión.^(59,60)
- **Varianza:** La varianza es la media aritmética del cuadrado de las desviaciones respecto a la media de una distribución estadística. Cuando los valores del grupo de estudio se encuentran cerca de su media, la dispersión será menor que cuando están distantes. Se puede medir la dispersión en función del esparcimiento de valores alrededor de su media. Para calcular, debemos restar la media de cada uno de los valores individuales, las diferencias se elevan al cuadrado y se suman entre sí.

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

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

I. IDENTIFICACION DE MUESTRAS.

Las hojas de “Llantén” fueron recolectadas en el distrito de Majes de la provincia de Caylloma-Arequipa, las cuales fueron llevadas a la Facultad de Biología de la Universidad Nacional San Agustín para su identificación taxonómica.

En la Tabla 9 se observa los resultados obtenidos luego de la identificación, siendo la especie específica *Plantago lanceolata* L. (Anexo 2)

Tabla 9. Clasificación y especie de Llantén

División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliosidae</i>
Subclase	<i>Asteriae</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Plantaginaceae</i>
Género	<i>Plantago</i>
Especie	<i>Pantago lanceolata</i> L

Fuente: Herbarium Arequipense (HUSA)

Así mismo, el fruto del árbol Granado, *Púnica Granatum L.* fueron recolectadas en el distrito de Majes de la provincia de Caylloma-Arequipa, las cuales fueron llevadas a la Facultad de Biología de la Universidad Nacional San Agustín para su identificación taxonómica.

En la Tabla 10 se observa los resultados obtenidos luego de la identificación, siendo la especie específica *Punica granatum L.* (Anexo 1)

Tabla 10. Clasificación y especie de Granada

División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsidae</i>
Subclase	<i>Myrtales</i>
Orden	<i>Lythraceae</i>
Familia	<i>Punicoideae</i>
Género	<i>Punica</i>
Especie	<i>Punica granatum L</i>

Fuente: Herbarium Arequipense (HUSA)

II. PREPARACION DE LA MUESTRA

Una vez recolectados e identificados taxonómicamente, tanto las hojas de *Plantago lanceolata L.* “Llantén” y la cáscara de *Punica granatum L.* “Granada”, se procedió a escoger los mejores ejemplares, lavarlos y así quitar cualquier otra impureza.

Posteriormente se procedió a estabilizar en seco en una estufa atemperada a 80 °C por 5 minutos, luego se desecaron las hojas de Llantén a una temperatura constante de 50°C, hasta que se obtuvo un peso constante. De la misma forma se deseco la cascara de Granada.

Luego de desecar convenientemente las hojas de *Plantago lanceolata L.* “Llantén” se procedió a pulverizar con la ayuda de un mortero, hasta la obtención de un polvo fino y uniforme con fin de aumentar la superficie de contacto al momento de la extracción con los solventes, haciendo más accesible la extracción de los metabolitos, seguidamente esto fue acopiado en papel Kraft previamente acondicionado y rotulado para guardarlo en un lugar cerrado, libre de humedad, a una temperatura adecuada y lejos de la luz; en

el caso de *Punica granatum L.* “Granada”, luego de ser desecada tiende a endurecer, por lo que se procedió a cortarla en pequeñas piezas, una vez se realizó todo este trabajo las piezas fueron colocadas en el procesador de alimentos OSTER 6400, hasta la obtención de una muestra fina y luego se almacenó al igual que el Llantén, como fue descrito en el Capítulo II, Materiales y métodos.

III. PREPARACION DE EXTRACTOS

El extracto metanólico de Llantén; fue obtenido por el método de Soxhlet; tal como se mencionó en el capítulo anterior; 25g de muestra fue empaquetada en una hoja de papel filtro y colocado en el equipo, sistema que se muestra en la Figura 9. El solvente fue sometido a calor constante de 70°C, por un tiempo de 7 horas, momento en el cual el metanol que entraba en contacto con la muestra ya no presentaba color; suponiendo que el solvente ha extraído todos los componentes de la muestra.

IV. DETERMINACION DEL EXTRACTO SECO

Se obtuvieron los extractos metanólico y etanólico obtenidos por la extracción Soxhlet desarrollando los métodos presentados en el capítulo anterior.

1. COMPARACION DE RENDIMIENTOS ASISTIDO POR ETANOL Y METANOL EN *Plantago lanceolata L* “LLANTEN”

En la Tabla 11 se puede observar los resultados del rendimiento obtenido luego de la extracción Soxhlet de la muestra usando etanol y metanol. Donde se observa que para la extracción con etanol se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 28.48 % y con metanol de 31.08 %.

Tabla 11. Rendimiento de extracto seco de *Plantago lanceolata L* “Llantén”

Solvente	Etanol	Metanol
Rendimiento (%)	28.48	31.08

2. COMPARACION DE RENDIMIENTOS ASISTIDO POR ETANOL Y METANOL EN *Punica Granatum L.* “GRANADA”

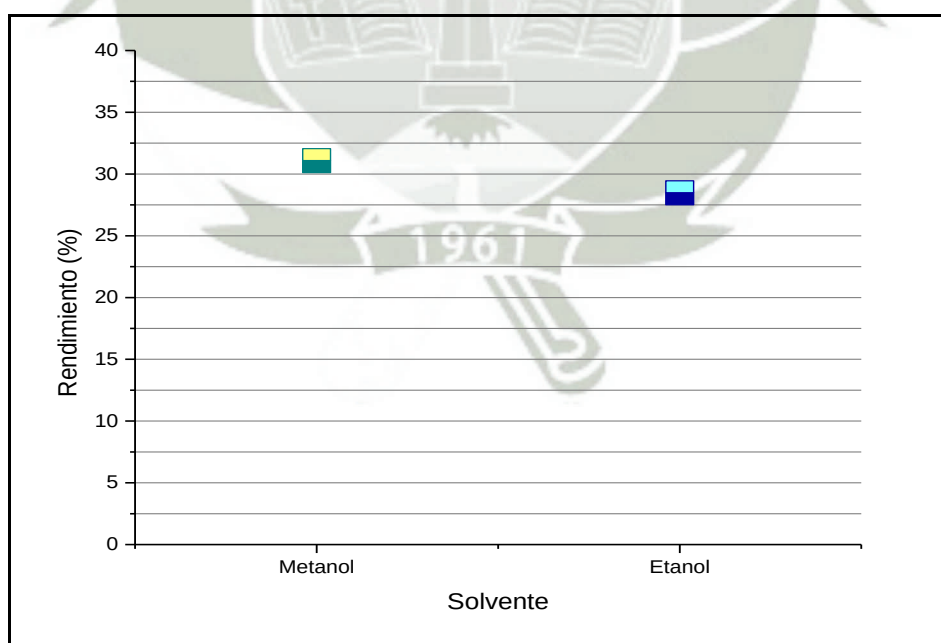
En la Tabla 12 se puede observar los resultados del rendimiento obtenido luego de la extracción Soxhlet de la muestra usando etanol y metanol. Donde se observa que para la extracción con etanol se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 30.96 % y con metanol de 32.88 %.

Tabla 12. Rendimiento de extracto seco de *Punica granatum L.* “Granada”

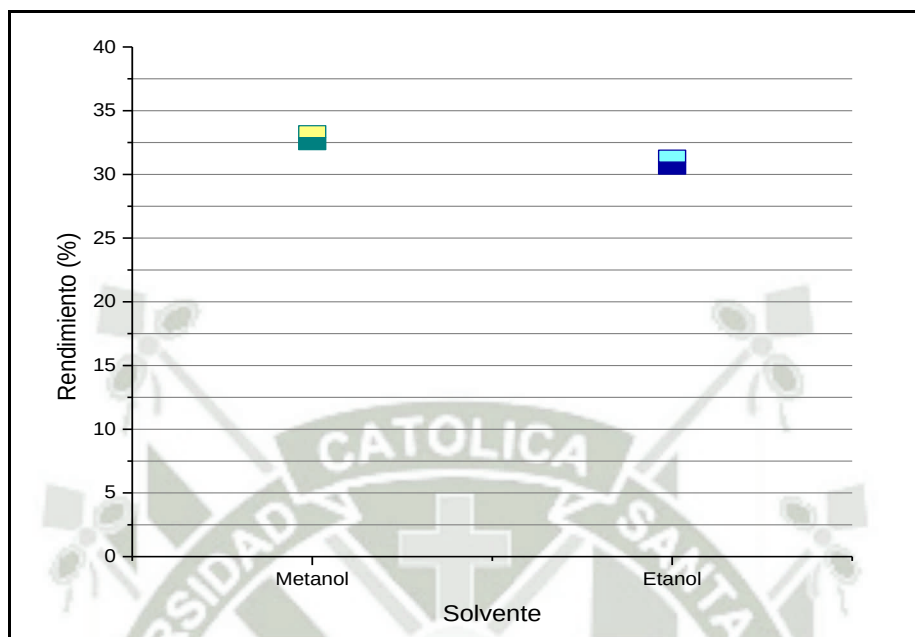
Solvente	Etanol	Metanol
Rendimiento (%)	30.96	32.88

Por otro lado en las Figura 17 y 18 se observa, que con metanol se obtiene un porcentaje de rendimiento ligeramente mayor a los valores de etanol, por lo cual a lo largo del proyecto las extracciones se realizaron con metanol.

Figura 17. Rendimiento de extracto seco de *Plantago lanceolata L* “Llantén”



Fuente: Elaboración propia.

Figura 18. Rendimiento de extracto seco de *Punica granatum* L. “Granada”

Fuente: Elaboración propia.

Gordana ⁴⁹ en su investigación evaluó diversos solventes para la extracción de compuestos fenólicos totales en *Calendula officinalis* L., siendo los solventes usados etanol, metanol, éter de petróleo, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol, obteniendo como resultado que el metanol presentó mejores resultados que los demás solventes.

Echavarría ⁵⁰ evaluó la actividad antioxidante y determinó el contenido de compuestos fenólicos en extractos de macro algas del caribe colombiano, comparando la extracción asistida por etanol, hexano y metanol, obteniendo como resultado que el metanol presentó mayor rendimiento que el hexano.

Ratheesh ⁽⁵¹⁾ en su investigación de la actividad antiinflamatoria de *Ruta Graveolens* Linn causando edema plantar inducido por carragenina en ratas macho Wistar, comparo el extracto etanólico y metanólico de la planta referida, dando como resultado que el metanol presento mayor rendimiento que el etanol.

En el presente proyecto se encontró que el extracto metanólico presentó una ligera diferencia frente al etanólico por lo cual se tomó como referencia las investigaciones de

Goradana, Echavarría y Ratheesh para optar por el uso de los extractos metanólicos en el desarrollo del presente proyecto.

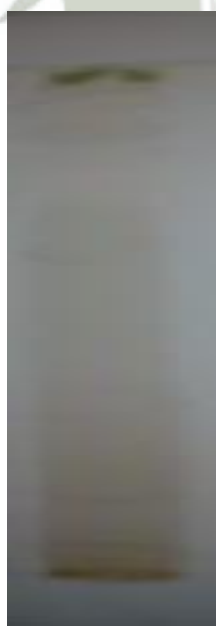
V. IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS DE LLANTEN Y GRANADA

1. LLANTEN

Para la identificación de flavonoides se utilizó una fase móvil de acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26) y como revelador $AlCl_3$ al 1% en etanol luego se secó a temperatura ambiente.

En la Figura 19 se puede observar la placa cromatográfica correspondiente al extracto de llantén, pudiendo diferenciar claramente la variedad de tonos amarillo verdosos que son los indicativos de la presencia de flavonoides. Así mismo en la Figura 20 podemos ver bandas nítidas al ser expuesta la placa a la luz UV.

Figura 19. TLC del extracto seco de *Plantago lanceolata* L. “Llantén”



Fuente: Elaboración propia.

Figura 20 TLC del extracto seco de *Plantago Lanceolata* L. UV



Fuente: Elaboración propia.

LLANTÉN		
Nº	Color	Rf
1	Azul	0.96
2	Naranja	0.87
3	Amarillo	0.81
4	Amarillo	0.42
5	Amarillo	0.37
6	Amarillo	0.16

Tomando en cuenta investigaciones realizadas y teóricamente mencionadas en el atlas titulado “Plant Drug Analysis”, cuyos autores son H. Wagner y S. Bladt, y cuya fase móvil es acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26) y como revelador AlCl_3 al 1% en etanol.

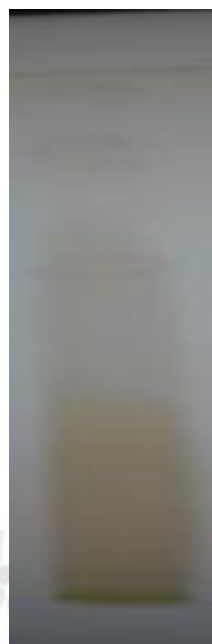
Podemos observar en la figura 20, fluorescencias de color anaranjado, amarillo, celeste a una luz UV de 366nm, esto evidenciaría la presencia de flavonoides en extracto metanólico de *Plantago Lanceolata L.* (Llantén).

Los flavonoides presentes en *Plantago Lanceolata L.* (Llantén) son principalmente quercitina, la rutina, la epicatequina, el kaempferol, lespedina y Acido cafeico.

2. GRANADA

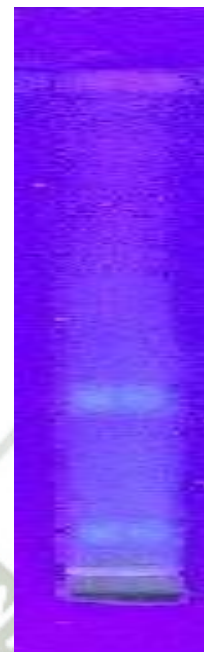
Se utilizó la misma fase móvil que en el Llantén, también el mismo revelador AlCl_3 . En la Figura 22 se puede observar la placa cromatográfica correspondiente al extracto de granada (Figura 21), Asimismo se puede observar las bandas nítidas al ser expuesta la placa a la luz UV en la Figura 23, pudiendo diferenciar claramente la variedad de tonos amarillo verdosos que son los indicativos de la presencia de flavonoides.

Figura 22. TLC del extracto seco de *Punica Granatum L.* “Granada”



Fuente: Elaboración propia.

Figura 23. TLC del extracto seco de *Punica Granatum L.* UV



Fuente: Elaboración propia.

GRANADA		
Nº	Color	Rf
1	Naranja	0.97
2	Azul	0.81
3	Azul	0.65
4	Amarillo	0.16

Tomando en cuenta investigaciones realizadas y teóricamente mencionadas en el atlas titulado “Plant Drug Analysis”, cuyos autores son H. Wagner y S. Bladt, y cuya fase móvil es y cuya fase móvil es acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100:11:11:26) y como revelador AlCl_3 al 1% en etanol. Podemos observar en la figura 23, fluorescencias de color anaranjado, amarillo, celeste, a una luz UV de 366nm, esto evidenciaría la presencia de flavonoides en extracto metanólico de *Punica Granatum L.* (Granada).

Los flavonoides presentes en *Punica Granatum L.* (Granada) son principalmente la Quercitina, Kaempferol, Ácido clorogénico y Ácido cafeico.

VI. DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS POR ESPECTROFOTOMETRIA

Para la determinación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu se necesita una solución de carbonato de Sodio al 7.5%, la cual tiene que ser preparada cada día que se vaya a realizar la prueba en mención. Posteriormente se preparó la solución madre de ácido gálico (agente antioxidante) de 800 ppm, a partir de esta disolución se prepararán 10 mL de disoluciones diluidas a concentraciones entre 40 y 400 ppm de ácido gálico (Figura 24).

Figura 24 Diluciones de ácido gálico a concentraciones entre 40 y 400 ppm.



Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado se preparó un gráfico de calibración tomando 1 mL de cada solución patrón de ácido gálico, luego se adicionaron 3 mL de agua destilada, 0.5 mL de Reactivo de Folin-Ciocalteu y 1.5 mL de carbonato de sodio 7.5 % para un volumen final de 6 mL en tubos de ensayo. Finalmente se midieron las absorbancias a 760 nm.

GRÁFICO DE CALIBRACION

En la Tabla 13 se pueden observar las absorbancias promedio correspondientes a concentraciones de 40, 80, 120, 160, 200 y 400 ppm de ácido gálico.

Tabla 13. Absorbancias promedio a 760 nm

CONCENTRACIÓN (mg/L)	ABSORBANCIA			PROMEDIO	s	CV %
40	0.054	0.065	0.046	0.055	0.010	6.24
80	0.128	0.139	0.119	0.129	0.010	5.25
120	0.187	0.168	0.179	0.178	0.010	5.12
160	0.248	0.235	0.237	0.240	0.007	2.92
200	0.312	0.306	0.306	0.308	0.003	0.97
400	0.639	0.626	0.642	0.636	0.009	1.42

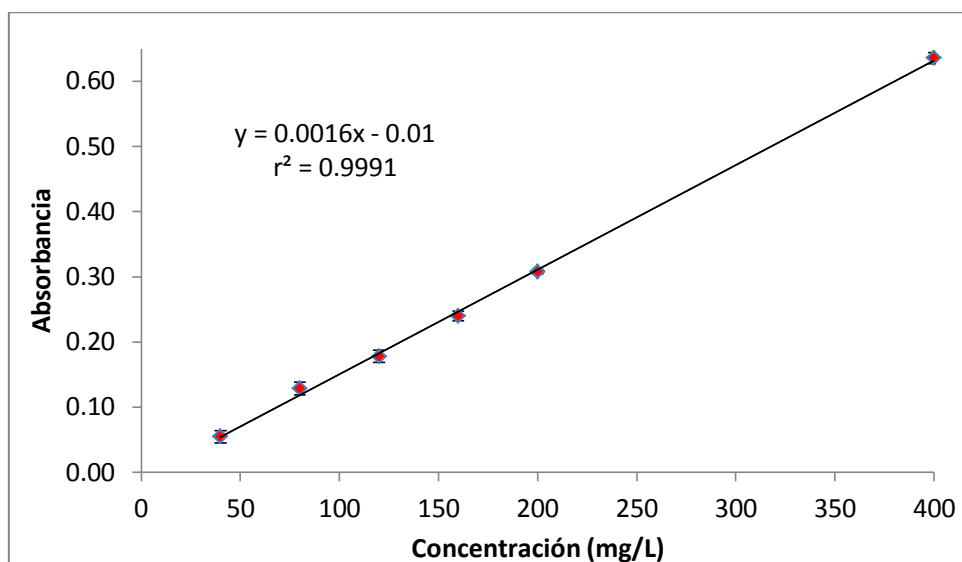
Elaboración: Fuente propia

Así mismo, en la Figura 25 se observa la ecuación de la recta así como el coeficiente de correlación lineal de 0.9991, el cual nos indica que existe una correlación lineal entre la concentración y la respuesta (absorbancia promedio), ya que la USP indica que para que un método sea lineal es necesario que el valor de r^2 sean mayores o iguales a 0.995.

Según la ecuación dada por Horwitz, para determinar el coeficiente de variación (CV), el cual nos dice que, el coeficiente de variación de los valores medios dados aumentarán a medida que disminuya la concentración del analito, por lo tanto para la precisión del método, el coeficiente de variación debe ser menor al 10% (6,24- 5,25- 5,12- 2,92- 0,97- 1,42).

Por lo tanto, se puede decir que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango aceptado.

Figura 25. Gráfico de calibración



Fuente: Elaboración propia.

Ecuación de la recta

$$y = 0.0016x - 0.01$$

a: Intercepto -0.01
b: Pendiente 0.0016
y: Absorbancia
x: Concentración (mg/L)

Con dichos resultados es probable cuantificar compuestos fenólicos en los extractos de Llantén y Granada.

CUANTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS EN EXTRACTOS

EXTRACTO METANOLICO DE GRANADA

En la Tabla 14 se observa las absorbancias obtenidas luego de analizar el extracto metanólico de *Punica Granatum L.* “Granada” obteniéndose una concentración promedio de 394.8 mg/L de compuesto fenólicos usando la ecuación de la recta y como compuestos fenólicos totales se obtuvo un 26% lo que significa 26g de polifenoles por cada 100 g de muestra.

Tabla 14. Concentración de compuestos fenólicos en *Punica Granatum L.* “Granada”

Muestra	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN (mg/L)
1	0.628	398.8
2	0.633	401.9
3	0.604	383.8
Promedio		394.8

Fuente: Elaboración propia

EXTRACTO METANOLICO DE LLANTEN

En la Tabla 15 se observa las absorbancias obtenidas luego de analizar el extracto metanólico de *Plantago lanceolata L.* “Llantén” obteniéndose una concentración promedio de 115.4 mg/L de compuesto fenólicos usando la ecuación de la recta y como compuestos fenólicos totales se obtuvo 7.96%, lo que significa que hay 7.76g de polifenoles por cada 100g de muestra.

Tabla 15. Concentración de compuestos fenólicos en *Plantago lanceolata L.* “Llantén”

Muestra	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN (mg/L)
1	0.174	115.0
2	0.185	121.9
3	0.165	109.4
Promedio		115.4

Fuente: Elaboración propia

VII. PREPARACION DE GELES DE LOS EXTRACTOS DE LLANTEN Y GRANADA

En la Tabla 16 se observa la técnica de elaboración de geles siendo las concentraciones trabajadas de 15% y 30% como se muestra a continuación:

- Gel con extracto seco de *Plantago lanceolata* L. 15 y 30%,
- Gel con extracto seco de *Punica Granatum* L. 15 y 30%,
- Gel de ambos extractos 15 y 30%

Tabla 16. Elaboración de geles de los extractos de Granada y Llantén

Gel	Blanco	Llantén	Llantén	Mixto	Mixto	Granda	Granda
		15%	30%	15%	30%	15%	15%
Carbopol	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g	2 g
Propilenglicol	5 mL	5 mL	5 mL	6 mL	7 mL	5 mL	5 mL
Metilparabeno	0.08 g	0.08 g	0.08 g	0.08 g	0.08 g	0.08 g	0.08 g
Propilparabeno	0.02 g	0.02 g	0.02 g	0.02 g	0.02 g	0.02 g	0.02 g
Trietanolamina csp.	pH = 7	pH = 7	pH = 7	pH = 7	pH = 7	pH = 7	pH = 7
Extracto seco Llantén	-	15 g	30 g	7.5 g	15 g	-	-
Extracto seco Granada	-	-	-	7.5 g	15 g	15 g	30 g
Etanol 96°	15 mL.	15 mL.	15 mL.	15 mL.	15 mL.	15 mL.	15 mL.
Agua destilada csp.	100 mL.	100 mL.	100 mL.	100 mL.	100 mL.	100 mL.	100 mL.

Fuente: Elaboración propia.

A continuación, en la Figura 26 se observan los geles preparados en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María los cuales presentaron buena estabilidad y fueron aptas para continuar con los objetivos del presente proyecto.

Figura 26. Gel Blanco



Fuente: Elaboración propia.

Figura 27. Geles de los extractos de Granada y Llantén



Fuente: Elaboración propia.

VIII. INDUCCION DE INFLAMACION EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

ENSAYO BLANCO

Se tomaron un grupo de ratas a las cuales se les midió el volumen inicial de la pata derecha posterior con el pletismómetro digital, dicho procedimiento se repitió durante 9 horas en intervalos de tiempo determinados (Tabla 17). Como muestra en dicha tabla los valores de volumen de pata no varían en función del tiempo debido a que no se administró ningún agente que produzca inflamación.

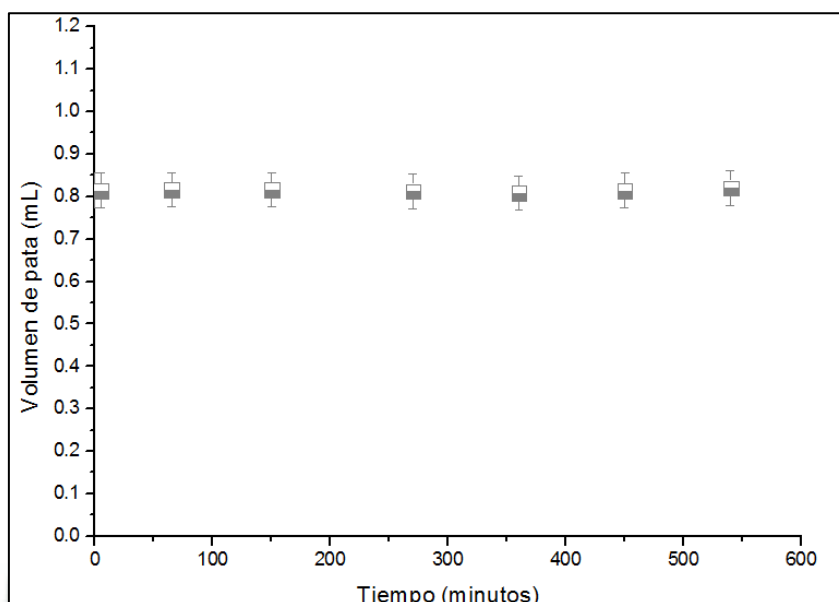
Tabla 17. Volumen inicial de la pata posterior de ratas blanco

Tiempo (Minutos)	Volumen de pata (mL)	Desviación Estándar
0	0.814	0.05
5'	0.814	0.05
65'	0.816	0.05
150'	0.816	0.05
270'	0.812	0.05
360'	0.808	0.04
450'	0.814	0.05
540'	0.820	0.05
Promedio	0.814	

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 28 se observa que durante las 9 horas de seguimiento a las ratas del grupo blanco los volúmenes de pata se mantienen constantes, oscilando en un promedio de (0.814 ± 0.05) mL.

Figura 28. Volumen de pata en el grupo Blanco.



Fuente: Elaboración propia.

GRUPO CONTROL (APLICACIÓN DE CARRAGENINA)

El grupo control de ratas fueron evaluadas midiendo el volumen inicial de la pata derecha de cada una, luego se administró 0.1 mL de una solución de carragenina al 1 % para luego hacer un seguimiento en intervalos de tiempo durante 8 horas (Figura 29).

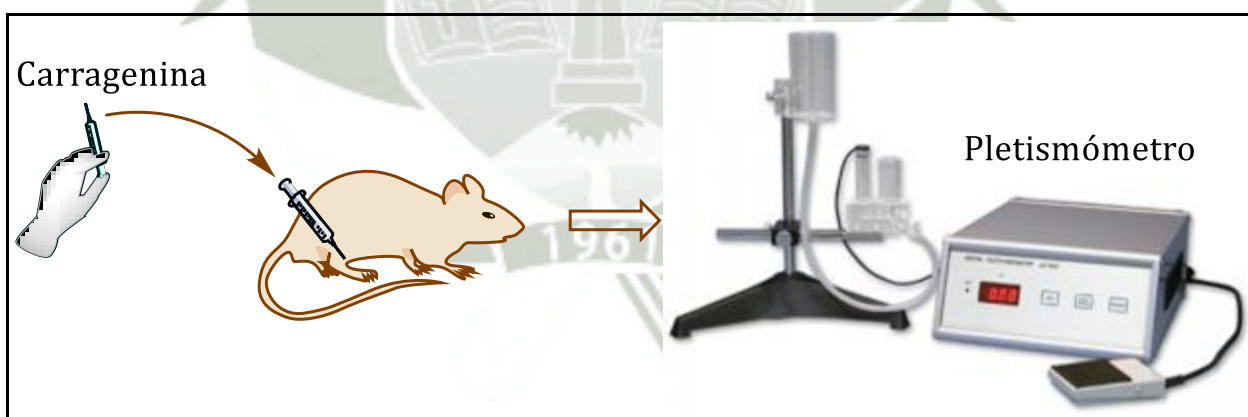


Figura 29. Administración de carragenina y medición en un pletismómetro

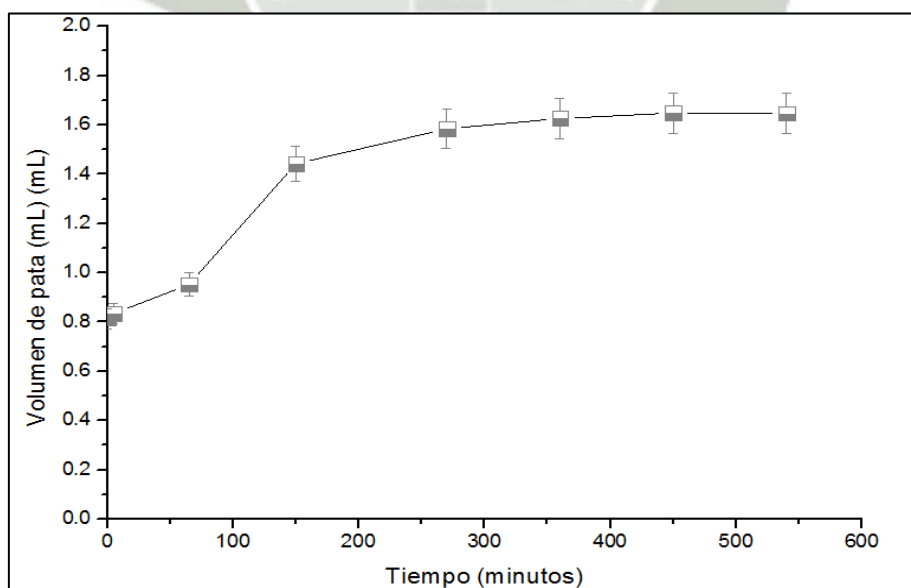
En la tabla 18 se presentan los resultados obtenidos luego de la aplicación de carragenina a cada rata del grupo control en la cual se ve un incremento en el volumen de la pata.

Tabla 18. Volúmenes de pata del grupo control post aplicación de carragenina

Tiempo (Minutos)	Volumen de pata (mL)	Desviación Estándar
0	0.814	0.048
5'	0.834	0.028
65'	0.952	0.048
150'	1.442	0.046
270'	1.584	0.045
360'	1.626	0.039
450'	1.648	0.043
540'	1.646	0.040

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 30 se evidencia la efectividad de la carragenina al 1 % debido a que se produjo un incremento en el volumen de la pata de cada rata (inflamación) a partir de las primeras horas incrementándose desde 0.814 hasta 1.646 mL. Sin embargo se nota que a partir de las 5 horas la tendencia de la inflamación tiende a ser constante.

Figura 30. Aumento del volumen de pata (inflamación) producido por carragenina

Fuente: Elaboración propia.

IX. EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO ASISTIDO POR EXTRACTOS DE GRANADA Y LLANTEN

1. EFECTO ANTIINFLAMATORIO de *Plantago lanceolata* L. “LLANTEN”

Para evaluar el efecto antiinflamatorio de *Plantago lanceolata* L. “Llantén” se midió el volumen de pata inicial de cada rata, luego de media hora aproximadamente se administró 0.1 mL de carragenina al 1 % y se midió el volumen de inflamación producida.

A las 3 horas aproximadamente se aplicaron los geles de 15 % y 30 % de *Plantago lanceolata* L. “Llantén” (Ver figura 31) preparados y se procedió a medir el volumen de pata en el pletismómetro.



Figura 31. Aplicación de gel antiinflamatorio

En la Tabla 19 se observa los resultados obtenidos antes y después de aplicar los geles de *Plantago lanceolata* L. “Llantén” a concentraciones de 15 % y 30 %. Como se muestra en dicha tabla a las 8.05 horas se produce la aplicación de la carragenina, posterior a dicha aplicación se produce una inflamación incrementando el volumen de pata a valores de 1.19 mL y 1.33 mL, posteriormente a las 3.55 horas se aplicaron ambos geles mostrándose una disminución de la inflamación producida hasta valores de 0.98 mL para el gel de 15 % y 0.94 % para el gel de 30 %.

Tabla 19. Resultados del efecto antiinflamatorio de *Plantago lanceolata* L. “Llantén”

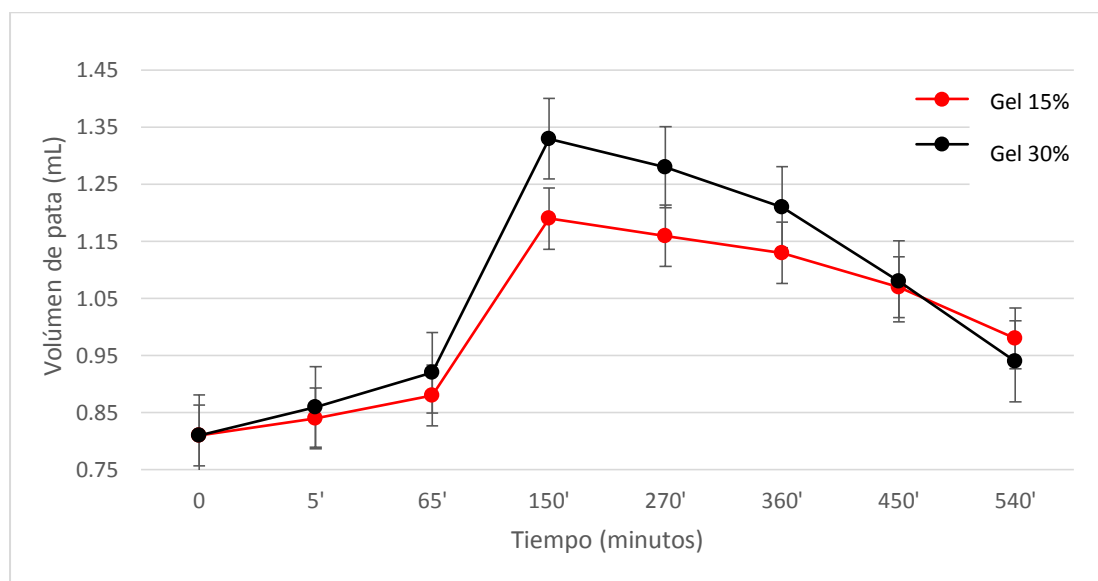
Tiempo (Minutos)	Gel (15%)	Gel (30%)
0	0.81	0.81
5'	0.84	0.86
65'	0.88	0.92
150'	1.19	1.33
270'	1.16	1.28
360'	1.13	1.21
450'	1.07	1.08
540'	0.98	0.94

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 32 se puede evidenciar que al aplicar carragenina a la media hora aproximadamente (0.6 horas) se produce un incremento en el volumen de la pata (inflamación), sin embargo cuando se aplican los geles dicha inflamación empieza a disminuir a medida que avanza el tiempo tanto con el gel de 15 % como del 30 %.

Al evidenciar una disminución de la inflamación cuando se aplicaron ambos geles fue necesario establecer la concentración más adecuada para que se produzca un mejor efecto antiinflamatorio por lo cual se procedió a comparar ambos geles de diferente concentración, mediante la ayuda del pletismómetro, que medirá el nuevo volumen que la pata tendrá luego de la aplicación de carragenina y haber esperado un tiempo prudente para dejar que esta actué e inflame la pata donde fue administrada previamente.

Figura 32. Efecto antiinflamatorio de *Plantago lanceolata* L. “Llantén”



Fuente: Elaboración propia.

Sin embargo, para comparar dichos efectos en la tabla 20, se expresaron los resultados obtenidos en porcentaje de disminución de la inflamación a partir de la aplicación de ambos geles que fue a las 3.55 horas, como este tiempo corresponde a la inflamación máxima producida se le considero como tiempo cero ya que a partir de este se evaluara el efecto de los extractos.

Tabla 20. Porcentajes de disminución de la inflamación

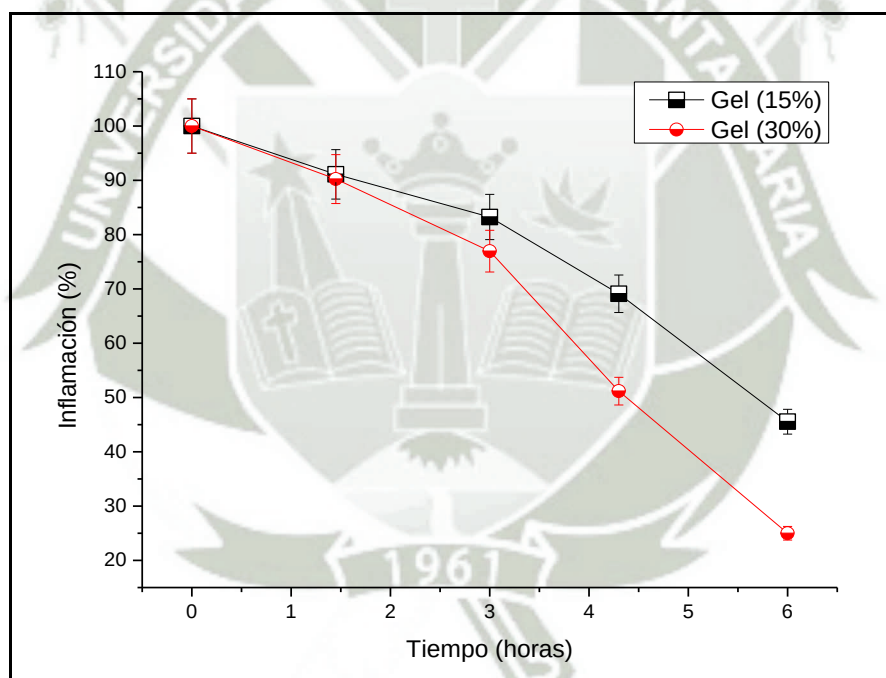
GEL DEL EXTRACTO DE LLANTEN		
Tiempo (horas) aplicado el tratamiento	Gel (15%)	Gel (30%)
0.0	100.00	100.00
1.5	91.10	90.23
3.0	83.25	76.95
4.3	69.11	51.17
6.0	45.55	25.00

Fuente: Elaboración propia.

En la figura 33 se esquematiza los resultados obtenidos en la tabla 19 y se observa que la inflamación disminuye en función del tiempo en que el gel tiene contacto con el área donde se aplicó carragenina logrando un porcentaje de disminución de la inflamación de 75 % para el gel de *Plantago lanceolata* L. “Llantén al 30 %” seguido de un 54.45 % para el gel de concentración del 15 % donde se puede concluir que a mayor concentración del extracto (gel al 30 %) posee mayor efectividad.

Pasadas las 6 horas no se llegó al estado inicial de la pata del animal, sin embargo se puede notar una diferencia significativa, si es que comparamos la pata con el grupo control de la carragenina frente a la última medición después de haber administrado los tratamientos.

Figura 33. Disminución de la inflamación porcentual por geles de llantén



Fuente: Elaboración propia.

Para poder establecer si existe alguna diferencia significativa se procedió a realizar un análisis estadístico usando el test F. en la Tabla 22 se observan los resultados obtenidos luego de aplicar dicha herramienta estadística donde se observa que el F práctico (0.163) es mayor que el F teórico lo que indica que existe diferencia significativa al 95 % de

confianza entre los geles de Llantén a concentraciones de 15 % y 30 %, con lo cual se concluye que el gel al 30 % presenta mayor efectividad al disminuir en mayor proporción la inflamación.

Tabla 21. Inflamación a las 6 horas de tratamiento para Llantén

Rata	Gel 15%	Gel 30 %
1	45.83	23.35
2	44.90	25.74
3	45.36	23.62
4	46.29	26.01
5	45.36	26.27

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 22. Prueba F para varianzas de dos muestras (Llantén)

	Gel 15%	Gel 30 %
Media	45.55	25
Varianza	0.279	1.951
Observaciones	5	5
Grados de libertad	4	4
F	0.163	
P(F<=f) una cola	0.043	
Valor crítico para F (una cola)	0.157	

Fuente: Elaboración propia.

2. EFECTO ANTIINFLAMATORIO de *Punica Granatum L.* “GRANADA”

Para evaluar el efecto antiinflamatorio de *Punica Granatum L.* “Granada” se midió el volumen de pata inicial de cada rata, luego de media hora aproximadamente se administró 0.1 mL de carragenina al 1 % y se midió el volumen de inflamación producida. A las 3 horas aproximadamente se aplicaron geles de 15 % y 30 % de *Punica Granatum L.* “Granada” y se procedió a medir el volumen de pata en el pletismómetro. (Ver Figura 34). Por otro lado, en la Tabla 23 se observa los resultados obtenidos antes y

después de aplicar los geles de *Punica Granatum L.* “Granada” a concentraciones de 15 % y 30 %. Como se muestra en dicha tabla a las 0.6 horas se produce la aplicación de la carragenina, posterior a dicha aplicación se produce una inflamación incrementando el volumen de pata a valores de 1.37 mL y 1.41 mL, posteriormente a las 3.55 horas se aplicaron ambos geles mostrándose una disminución de la inflamación producida hasta valores de 1.28 mL para el gel de 15 % y 1.19 % para el gel de 30 %.

Tabla 23. Resultados del efecto antiinflamatorio de *Punica Granatum L.* “Granada”

Tiempo (Minutos)	Gel (15%)	Gel (30%)
0	0.80	0.82
5'	0.83	0.84
65'	0.93	0.91
150'	1.37	1.41
270'	1.36	1.37
360'	1.35	1.31
450'	1.32	1.28
540'	1.28	1.19

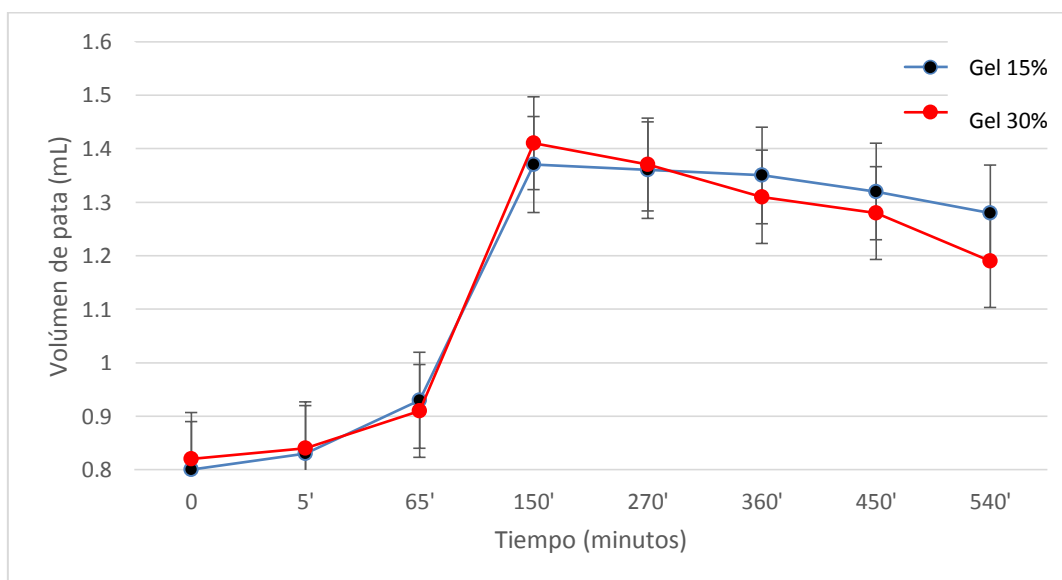
Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 34 se puede evidenciar que al aplicar carragenina a la media hora aproximadamente (0.6 horas) se produce un incremento en el volumen de la pata (inflamación), sin embargo cuando se aplican los geles dicha inflamación empieza a disminuir a medida que avanza el tiempo tanto con el gel de 15 % como del 30 %.

Al evidenciar una disminución de la inflamación cuando se aplicaron ambos geles fue necesario establecer la concentración más adecuada para que se produzca un mejor efecto antiinflamatorio por lo cual se procedió a comparar ambos geles de diferente concentración, mediante el uso del pletismómetro digital, que volverá a medir el nuevo volumen, causado por la carragenina, previamente administrada, y que causo la

inflamación pertinente, luego se aplicó los geles mencionados previamente y se volvió a medir para obtener en cuanto se redujo la inflamación.

Figura 34. Efecto antiinflamatorio de *Punica Granatum L.* “Granada”



Fuente: Elaboración propia.

Sin embargo, para comparar dichos efectos en la Tabla 24 se expresaron los resultados obtenidos en porcentaje de disminución de la inflamación a partir de la aplicación de ambos geles.

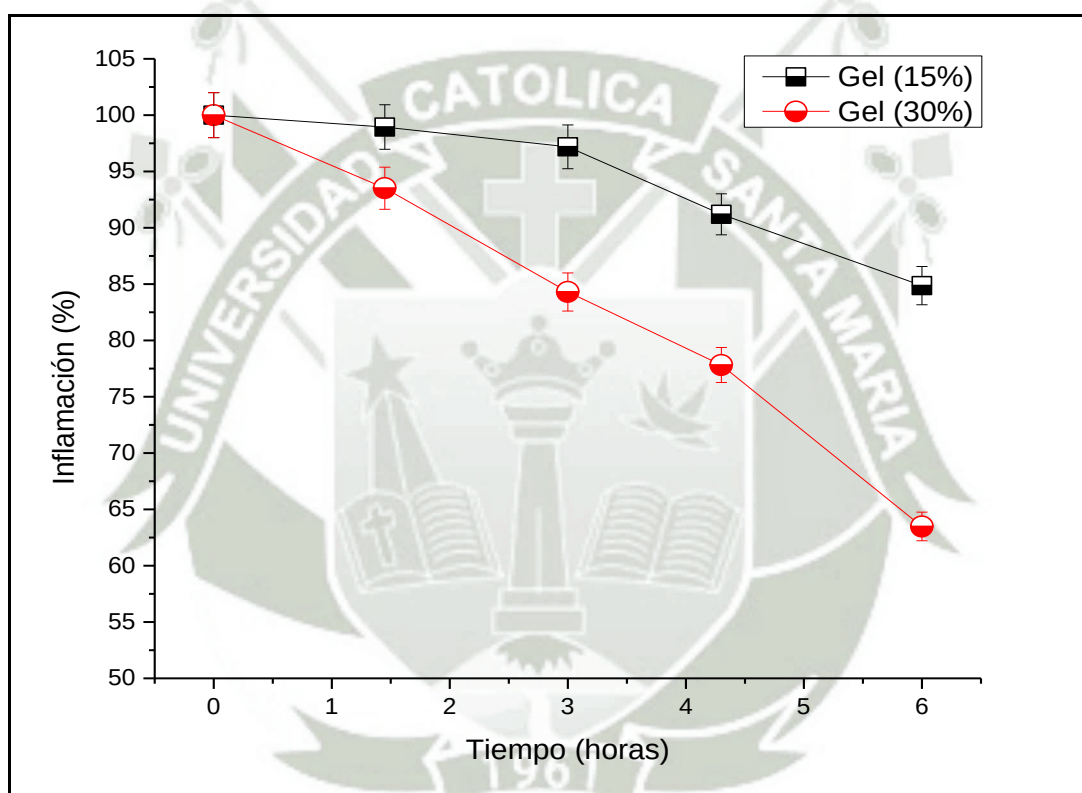
Tabla 24. Porcentajes de disminución de la inflamación

GEL DEL EXTRACTO DE GRANADA		
Tiempo después de la aplicación (horas)	Gel (15%)	Gel (30%)
0.0	100.00	100.00
1.45	98.94	93.52
3.00	97.18	84.30
4.30	91.20	77.82
6.00	84.86	63.48

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 35 se esquematiza los resultados obtenidos en la tabla 23 y se observa que la inflamación disminuye en función del tiempo en que el gel tiene contacto con el área donde se aplicó carragenina logrando un porcentaje de disminución de la inflamación de 36.52 % para el gel de 30 % y un 15.14 % para el gel de 15 % donde se puede concluir que el gel al 30 % posee mayor efectividad.

Figura 35 Disminución de la inflamación porcentual por geles de Granada



Fuente: Elaboración propia.

Para poder establecer si existe alguna diferencia significativa se procedió a realizar un análisis estadístico usando el test F. en la Tabla 26 se observan los resultados obtenidos luego de aplicar dicha herramienta estadística donde se observa que el F práctico (0.711) es mayor que el F teórico lo que indica que existe diferencia significativa al 95 % de confianza entre los geles de Granada a concentraciones de 15% y 30 %, con lo cual se

concluye que el gel al 30 % presenta mayor efectividad al disminuir en mayor proporción la inflamación.

Tabla 25. Inflamación a las 6 horas de tratamiento para Granada

Rata	Gel 15%	Gel 30 %
1	89.36	62.84
2	85.39	59.11
3	80.09	66.57
4	85.39	64.97
5	84.07	63.91

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 26. Prueba F para varianzas de dos muestras (Granada)

	Gel 30 %	Gel 15%
Media	63.48	84.86
Varianza	7.856	11.042
Observaciones	5	5
Grados de libertad	4	4
F	0.711	
P(F<=f) una cola	0.375	
Valor crítico para F (una cola)	0.157	

Fuente: Elaboración propia.

Como se puede observar en los resultados previos, los geles a base de Granada tienen un menor efecto antiinflamatorio si los comparamos frente a los geles a base de Llantén.

3. EFECTO ANTIINFLAMATORIO de *Punica Granatum* L. “GRANADA” EN COMBINACION CON *Plantago lanceolata* L “LLANTEN”

Para evaluar el efecto antiinflamatorio de *Punica Granatum* L. “Granada” en combinación con *Plantago lanceolata* L “Llantén” se midió el volumen de pata inicial de cada rata, luego de media hora aproximadamente se administró 0.1 mL de carragenina al 1 % y se midió el volumen de inflamación producida.

A las 3 horas aproximadamente se aplicaron geles de 15 % y 30 % de *Punica Granatum* L. “Granada” en combinación con *Plantago lanceolata* L “Llantén” (50:50) y se procedió a medir el volumen de pata en el pletismómetro. Por otro lado en la Tabla 25 se observa los resultados obtenidos antes y después de aplicar los geles a concentraciones de 15 % y 30 %.

Tabla 27. Resultados del efecto antiinflamatorio de *Punica Granatum* L. “Granada” con *Plantago lanceolata* L “Llantén”

Tiempo (Minutos)	Gel (15%)	Gel (30%)
0	0.80	0.77
5'	0.83	0.80
65'	0.92	0.95
150'	1.42	1.52
270'	1.39	1.46
360'	1.35	1.43
450'	1.31	1.34
540'	1.22	1.15

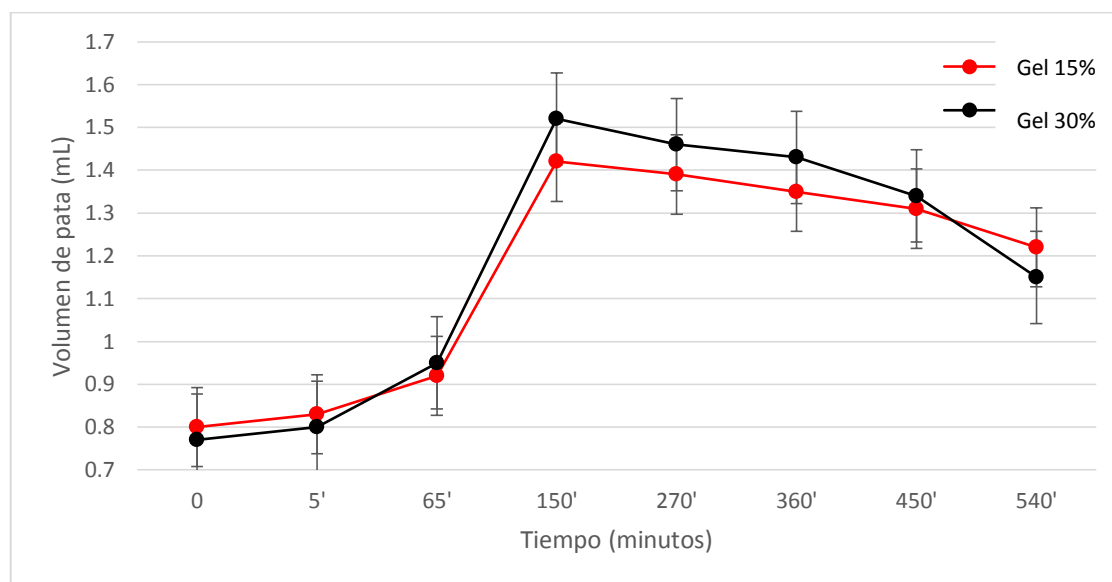
Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 36 se puede evidenciar que al aplicar carragenina a la media hora aproximadamente (0.6 horas) se produce un incremento en el volumen de la pata (inflamación), sin embargo cuando se aplican los geles dicha inflamación empieza a disminuir a medida que avanza el tiempo tanto con el gel de 15 % como del 30 %.

Al evidenciar una disminución de la inflamación cuando se aplicaron ambos geles fue necesario establecer la concentración más adecuada para que se produzca un mejor efecto antiinflamatorio por lo cual se procedió a comparar ambos geles de diferente

concentración, sin embargo, para comparar dichos efectos en la Tabla 28 se expresaron los resultados obtenidos en porcentaje de disminución de la inflamación a partir de la aplicación de ambos geles.

Figura 36. Efecto antiinflamatorio de *Punica Granatum* L. “Granada” con *Plantago lanceolata* L. “Llantén”



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 28. Porcentajes de disminución de la inflamación.

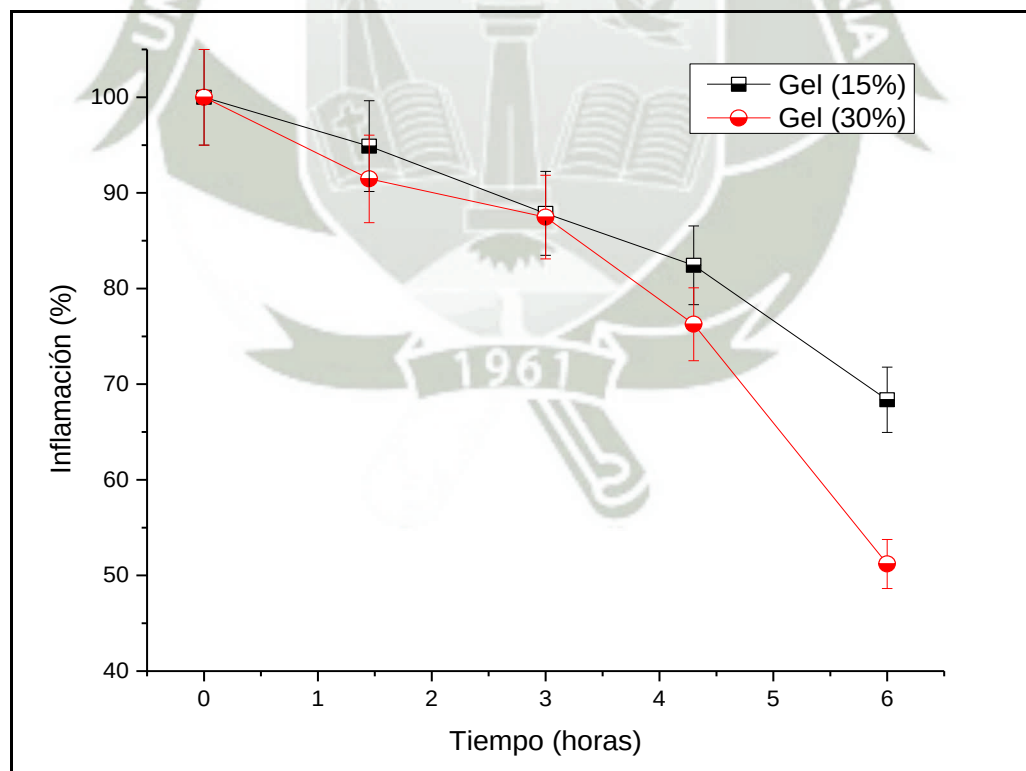
GEL DE EXTRACTO DE LLANTEN Y GRANADA		
Tiempo después de la aplicación (horas)	Gel (15%)	Gel (30%)
0.00	100.00	100.00
1.45	94.89	91.47
3.00	87.86	87.47
4.30	82.43	76.27
6.00	68.37	51.20

Fuente: Elaboración propia.

En la Figura 37 se esquematiza los resultados obtenidos en la tabla 28 y se observa que la inflamación disminuye en función del tiempo en que el gel tiene contacto con el área donde se aplicó carragenina logrando un porcentaje de disminución de la inflamación de 48.80 % para el gel de 30 % y un 31.63 % para el gel de 15 % donde se puede concluir que el gel al 30 % posee mayor efectividad.

Para poder establecer si existe alguna diferencia significativa se procedió a realizar un análisis estadístico usando el test F. en la Tabla 30 se observan los resultados obtenidos luego de aplicar dicha herramienta estadística donde se observa que el F práctico (0.199) es mayor que el F teórico lo que indica que existe diferencia significativa al 95 % de confianza entre los geles de Granada con Llantén a concentraciones de 15% y 30 %, con lo cual se concluye que el gel al 30 % presenta mayor efectividad al disminuir en mayor proporción la inflamación.

Figura 37. Disminución de la inflamación porcentual por geles de Granada con Llantén



Fuente: Elaboración propia.

Tabla 29. Inflamación a las 6 horas de tratamiento para Granada con Llantén

Rata	Gel 15%	Gel 30 %
1	65.91	58.56
2	62.00	52.80
3	69.82	43.92
4	72.62	51.02
5	71.50	49.69

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 30. Prueba F para varianzas de dos muestras (Granada con Llantén)

	Gel 15%	Gel 30 %
Media	68.37	51.2
Varianza	19.126	28.011
Observaciones	5	5
Grados de libertad	4	4
F	0.683	
P(F<=f) una cola	0.360	
Valor crítico para F (una cola)	0.157	

Fuente: Elaboración propia.

4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS TRES GELES

En la tabla 31 se observan los resultados de los tratamientos de los tres geles al 30 % ya que a esta concentración demostraron una mayor efectividad frente a la inflamación producida por carragenina.

Tabla 31. Efecto antiinflamatorio de geles al 30 %

TIEMPO (horas)	GEL DEL EXTRACTO DE LLANTEN	GEL DEL EXTRACTO DE GRANADA	GEL DEL EXTRACTO DE GRANADA Y LLANTEN
0.0	100.00	100.00	100.00
1.5	90.23	93.52	91.47
3.0	76.95	84.30	87.47
4.3	51.17	77.82	76.27
6.0	25.00	63.48	51.20

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, en la tabla 32 presentan los porcentajes de disminución obtenidos luego de la aplicación de los geles al 30 % tanto de Granada, Llantén y la combinación de ambos.

Como se observa en la tabla 32 se puede evidenciar que el extracto de Llantén tiene mayor efecto antiinflamatorio tanto de la combinación de ambos extractos como de la Granada solamente. Por lo cual no existe un sinergismo al combinar ambos extractos.

Tabla 32. Porcentajes de disminución de la inflamación

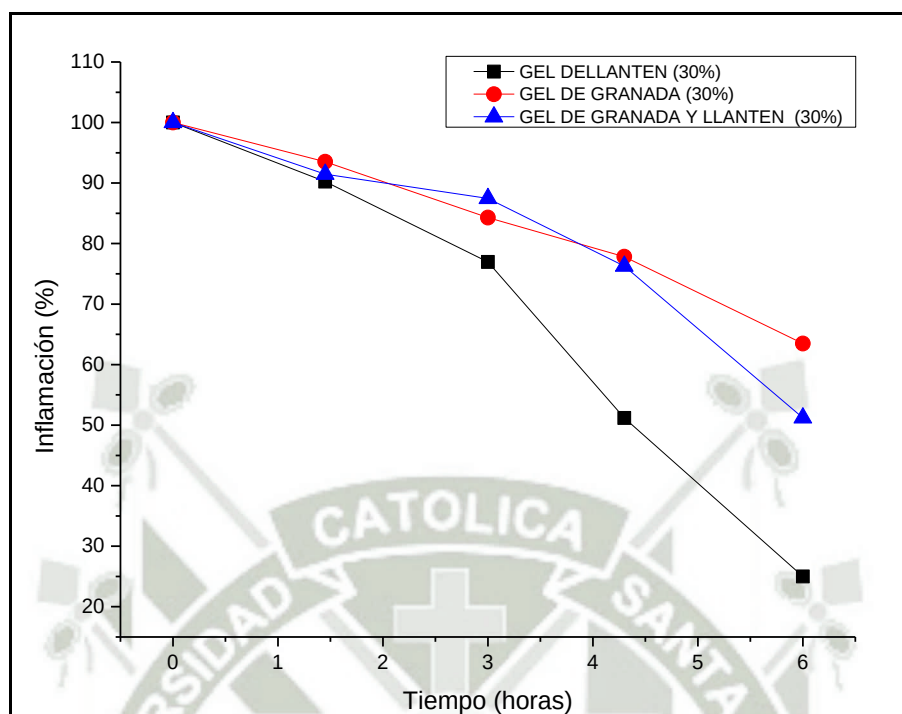
TRATAMIENTO	% de disminución de la inflamación a las 6 horas
GEL DEL EXTRACTO DE LLANTEN (30%)	75.00
GEL DEL EXTRACTO DE GRANADA (30%)	36.52
GEL DEL EXTRACTO DE GRANADA Y LLANTEN (30%)	48.80

Fuente: Elaboración propia.

Así mismo en la Figura 38 se evidencia que el mejor gel que logra un porcentaje antiinflamatorio de un 75.00 % es el de *Plantago lanceolata* L. “Llantén”, por otro lado la combinación de ambas muestras presenta un porcentaje antiinflamatorio de 48.80 %, este es claramente menor a la de solo Llantén, sin embargo el gel de *Punica Granatum* L. “Granada disminuye solo un 36.52 %, es probable que incrementando el tiempo de aplicación o concentración de Granada se logre resultados más óptimos.

Posiblemente los taninos curten la piel y puede que estos eviten que pase el llantén por eso se ve una disminución en el efecto del llantén o tal vez presentan otras estructuras químicas que al juntarlas se antagonizan.

Figura 38. Efecto antiinflamatorio de los geles al 30 % de cada tratamiento



Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

1. Se lograron obtener los extractos alcohólicos de las especies botánicas *Plantago Lanceolata* L. “Llanten” y *Punica Granatum* L. “Granada” previamente identificadas.
2. Se identificó la presencia de flavonoides en los extractos metanólicos de *Punica Granatum* L. “Granada”, mediante TLC habiendo usado una fase móvil de acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100: 11: 11: 26) y como revelador AlCl_3 al 1%.
3. Se identificó la presencia de flavonoides en los extractos metanólicos de *Plantago Lanceolata* L. “Llantén”, mediante TLC habiendo usado una fase móvil de acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico: agua (100: 11: 11: 26) y como revelador AlCl_3 al 1%.
4. Se prepararon los geles de 15 y 30% respectivamente a partir de los extractos metanólicos de *Plantago Lanceolata* L. “Llanten” y *Punica Granatum* L. “Granada”, así como el gel mixto a 15 y 30%.
5. Se evaluó el efecto antiinflamatorio de *Plantago Lanceolata* L. “Llanten” encontrándose que el gel al 30% disminuyó la inflamación en un 75%, siendo este superior al obtenido por el gel al 15% que disminuyó un 54.45%; mientras que en *Punica Granatum* L. “Granada”, el gel al 30% disminuyó la inflamación un 36.22%, mientras que el gel al 15% disminuyó un 15.14%. Finalmente el gel mixto a una concentración de 30% redujo la inflamación en 48.80%, mientras que el gel mixto al 15% redujo la inflamación en 31.63%. El gel a base de *Plantago lanceolata* L. a una concentración del 30% es mucho más efectivo que los demás, incluso que el gel mixto, por lo tanto podemos afirmar que no presenta sinergismo.

Sugerencias

1. Realizar nuevas pruebas en otras especies de animales de experimentación con el objetivo de confirmar el efecto antiinflamatorio de los geles a base de *Punica Granatum L.*, *Plantago Lanceolata L.* y el gel mixto a sus diferentes concentraciones.
2. Se sugiere realizar estudios de la capacidad antiinflamatoria de las mismas plantas pero ubicadas en una zona diferente del país, ya sea otro valle o incluso ciudad, para así poder cotejar resultados y ver si el factor climático afecta la capacidad antiinflamatoria de dichas plantas.
3. Realizar una separación de los metabolitos presentes en los extractos secos por *Punica Granatum L.* y *Plantago Lanceolata L.* y así determinar cuál de estos posee el efecto que inhibe la inflamación.
4. Confirmar demás propiedades medicinales que la población atribuye a dichas plantas, mediante pruebas que utilicen el método científico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Osuna, Tapia, Aguilar. : Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, 2005.
2. De La Peña R., “Catálogo de nombres vulgares de la flora argentina”, 1997.
3. Moreno Alberto, “Actividades de Riego abonado y tratamiento en cultivos”, 2015.
4. León Jorge, Fundamentos botánicos de cultivos tropicales, 1968.
5. Sánchez C., Carbonell A., “La fruta granada cultivada en España”, 2000
6. Pamplona J., “Alimentos que curan”, 1995
7. Arbayza, Ruiz, Venegas, Ruidias., “Capacidad Antioxidante de zumo y de los extractos hidroalcohólicos y acuoso obtenidos de *Punica Granatum* y su relación con el contenido de polifenoles”, 2014.
8. OMS., WHO monographs on selected medical plants, volume 4, 2014
9. Lee, Chen, Liang, Wang., “Anti-Inflammatory effects of Punic Granatum Linne in vitro and in vivo”, 2009
10. Zarfeshany, Asgary, Javanmard, “Potent health effects of pomegranate”, 2014.
11. Begoña Milo, Unidad de Farmacología y Farmacognosia. Facultad de farmacia. Universidad de Barcelona, Begoña Milo Vol 21 Núm 4 Abril 2002
12. Berdonces, José L., “Gran enciclopedia de las plantas medicinales de la A a la Z.
13. Agapito Teodoro R. “Fitomedicina 1100 Plantas Medicinales TOMOII”.
14. Gallin, JI. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) Fundamental Immunology. Raven Press, New York, 1989
15. Arias J., Aller M., Arias J., Lorente L., “Fisiopatología quirúrgica”, 1999
16. Ishizaka, K. Most cell activation an mediator release. Progress in Allergy, 1984
17. Roit, IM; Brostoff, J; Male, DK: Inmunología. 2ª ed. Barcelona: Salvat, 1992

18. E. Ortiz, E. Miranda, J. Moirand, C. Fassi.: Cirugia 3era edición, 2000
19. Snyderman, R; Pike, MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. Ann. Rev. Immunol. 1984.
20. Andary C y Mondolot-Cosson L. Histolocalization of plant polyphenols in tissues and cell walls. Some applications. En: Polyphenols in foods. Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop, 1997 Aberdeen, Scotland. 1997
21. Butler LG. Protein polyphenol interactions: nutritional aspects. En: Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol, 1992; Volume 16, Part 11
22. Borse, B. B.; Kumar, H. V. and Rao, L. J. M. 2007. Radical scavenging conserves from unused fresh green tea leaves. J. Agric. Food Chem. 55:1750-1754.
23. McEvily AJ, lyenger R y Gross AT. Inhibition of polyphenols oxidase by phenolics compounds. En: Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I: Analysis, Occurrence and Chemistry, Ho, C.T., Lee, C.T. y Huang, M.T. Eds., ACS Symposium Series 506. American Chemical Society, Washington, DC, 1992
24. Clifford MN. Sensory and dietary properties of phenols. En: Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol, Volume 16, Part 11
25. Belitz y Grosch. Química de los alimentos. Ed. Acribia España: Zaragoza, 1988
17* Crozier, A.; Lean, M.; McDonald, M. and Black, C. 1997. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. J. Agric. Food Chem.
26. Berra B, Caruso D, Cortesi N, Fedeli E, Rasetti MF, Galli G. Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. Riv. It. Sost. Grasse 1995
27. Tsimidou, M.. Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. Ital J Food Sci 1998
28. Bravo L. Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutr Rev, 1998
29. Harborne JB. General procedures and measurements of total phenolics. In: Harborne J .B. Ed. Plant Phenolics, vol 1, from "Methods in Plant Biochemistry Series": Academic Press, London. 1989

30. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Windholz, M. Ed . U.S.A
31. Chesson A, Russell WR y Provan GJ. Metabolites of the phenylpropanoid pathway - common origin, common properties? In: Polyphenols in foods. Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop 1997, Aberdeen, Scotland 1997
32. Harborne JB. The flavonoids: Advances in Research Since 1986. Chapman y Hall Ed., London, 1993
33. Hertog MGL, Hollman PCH, Van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. J Agric Food Chem. 1993
34. Chung K-T, Wong T-Y, Wei C-I, Huang Y-W y Lin Y. Tannins and Human Health: A review. Crit. Rev. Food Sci. : 1998
35. Le Hir, A. Farmacia Galénica. Masson, S.A, Barcelona; 1995.
36. Remington, Farmacia, Tomo I, 19ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires; 1998.
37. Kuklinski, Claudia.: “Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural” 1º Reimpresion 2003 Ediciones Omega S.A.
38. Villar del Fresno A.: “Farmacognosia general” 1º Edicion 2000. Editorial Sintesis S.A.
39. Sharapin Nikolai, Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos, CYTED, 2000
40. Zygodlo, Iabucklas, López, Torres, Maestri; Fundamentos teorico practico de química orgánica, Encuentro grupo Editor, 2008.
41. Matissek y colaboradores, Análisis de los Alimentos. Fundamentos, Métodos y Aplicaciones, Ed. Acribia
42. D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, Química Orgánica Experimental, Ed. Universitaria de Barcelona Eunibar, 1978.
43. Harry W. Lewis & Christopher J. Moody.: Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice, WileyBlackwell
44. A.I. Vogel; A.R. Tatchell; B.S. Furnis; A.J. Hannaford; P.W.G. Smith. Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry 5ª edición

45. García M. Eva, Fernández S. Isabel, Fuentes L. Ana, “Determinación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu”
46. Harris Daniel, “Quantitative Chemical Analysis. Fifth edition”
47. Glasstone, Samuel. Elementos de Fisicoquímica. Editorial Médico Quirúrgica, Buenos Aires; 1972.
48. Sugishita e., Amagaya s., Ogiyara Y. Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. J. Pharmacobiodyn. 1981
49. Gordana S, Ćetković, Sonja, Đilas, Jasna Čanadanović-Brunetand; thin-layer chromatography analysis and scavenging activity of marigold (*calendula officinalis* l.) Extracts; 2003.
50. Echavarría, franco, Martínez; evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano; 2009.
51. M Ratheesh, A Helen; Anti-inflammatory activity of *Ruta graveolens* Linn on carrageenan induced paw edema in wistar male rats; 2007.
52. Condori Melgar, Evaluación del efecto antiinflamatorio tópico del extracto y gel de *polypodium crassifolium* (calaguala) en edema plantar inducido en animales de experimentación, 2014.
53. Gutierrez M, Muñoz P; efecto antiinflamatorio tópico del extracto y crema de las hojas de *Ligaria Cuneifolia* (suelda con suelda) en ratas con inflamación inducida experimentalmente, 2014.
54. La Torre Villalba, Evaluación del efecto antiinflamatorio de *Zingiber Officinale Roscoe* (jengibre) en animales de experimentación, 2014
55. Bueno et all, Development of a UV/Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth, 2012.
56. Venalainen et all, Variation in the decay resistance and its relationship with other wood characteristics in old Scots pines, 2003.
57. Espinoza et all, Validación de una metodología analítica para la cuantificación de polifenoles totales, en procesos de extracción asistida por microondas sobre frutos de *Vaccinium meridionale*, 2016.

58. Sandoval; Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición; Aspectos generales sobre la validación de métodos; Instituto de Salud Pública- Chile. 2010.
59. Wayne W. Daniel: “BIOESTADISTICA” Editorial Limusa Wiley, 4ta Edicion, México 2007.
60. Hernández et all, Metodologia de la investigación, Editorial Mc Growhill, 5ta edición , México 2010.





ANEXO

Anexo 1



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



CONSTANCIA Nº 026-2016-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca del espécimen presentada por Daniel Amilcar Jacobo Cárdenas y Gleizy Fátima Zúñiga Ortiz egresado de la Escuela Profesional y Académica de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, para la realización de su tesis "Evaluación del efecto antiinflamatorio tópico de la asociación del extracto de "granada y "llantén" en animales de experimentación, Arequipa 2016". La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco de la localidad de Majes el Pedregal, para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsidae
Subclase	Asteriae
Orden	Lamiales
Familia	Plantaginaceae
Genero	Plantago
Especie	<i>Plantago lanceolata</i> L



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
 Teléfono: (054) 237755 / 984248674
 Apartado Postal: 0028
 AREQUIPA – PERU

Anexo 2

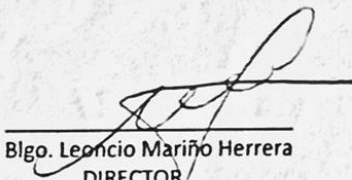


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsidae
Orden	Myrtales
Familia	Lythraceae
Subfamilia	Punicoideae
Genero	Punica
Especie	<i>Punica granatum L</i>

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



Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Arequipa 19 de setiembre del 2016

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

Anexo 3

Preparación del gel base

Fórmula

Componentes	Cantidad
Carbopol	2 g
Propilenglicol	5 mL
Metilparabeno	0.08 g
Propilparabeno	0.02 g
Trietanolamina csp.	pH = 7
Etanol 96°	15 mL.
Agua destilada csp.	100 mL.

Elaboracion: Fuente propia

Preparación del gel al 15% con extracto seco de *Plantago Lamceolata L.* (Llantén)

Fórmula

Componentes	Cantidad
Carbopol	2 g
Propilenglicol	5 mL
Metilparabeno	0.08 g
Propilparabeno	0.02 g
Trietanolamina csp.	pH = 7
Extracto seco	15 g
Etanol 96°	15 mL.
Agua destilada csp.	100 mL.

Elaboracion: Fuente propia

Preparación del gel al 30% con extracto seco de *Plantago Lanceolata L.* (Llantén)

Fórmula

Componentes	Cantidad
Carbopol	2 g
Propilenglicol	5 mL
Metilparabeno	0.08 g
Propilparabeno	0.02 g
Trietanolamina csp.	pH = 7
Extracto seco	30 g
Etanol 96°	15 mL.
Agua destilada csp.	100 mL.

Elaboracion: Fuente propia

Preparación del gel al 15% con extracto seco de *Punica Granatum L.* (Granada)

Fórmula

Componentes	Cantidad
Carbopol	2 gr.
Propilenglicol	5 mL
Metilparabeno	0.08 g
Propilparabeno	0.02 g
Trietanolamina csp.	pH = 7
Extracto seco	15 g
Etanol 96°	15 mL.
Agua destilada csp.	100 mL.

Elaboracion: Fuente propia

Preparación del gel al 30% con extracto seco de *Punica Granatum L.* (Granada)

Formula

Componentes	Cantidad
Carbopol	2 gr.
Propilenglicol	5 mL
Metilparabeno	0.08 g
Propilparabeno	0.02 g
Trietanolamina csp.	pH = 7
Extracto seco	30 g
Etanol 96°	15 mL.
Agua destilada csp.	100 mL.

Elaboracion: Fuente propia

Preparación del gel mixto al 15% con extracto seco de *Plantago Lanceolata L.* (Llantén) y *Punica Granatum L.* (granada)

Fórmula

Componentes	Cantidad
Carbopol	2 g
Propilenglicol	5 mL
Metilparabeno	0.08 g
Propilparabeno	0.02 g
Trietanolamina csp.	pH = 7
Extracto seco llantén	7.5 g
Extracto seco granada	7.5 g
Etanol 96°	15 mL.
Agua destilada csp.	100 mL.

Elaboracion: Fuente propia

Preparación del gel mixto al 30% con extracto seco de *Plantago Lanceolata* L. (Llantén) y *Punica Granatum* L. (granada)

Fórmula

Componentes	Cantidad
Carbopol	2 g
Propilenglicol	5 mL
Metilparabeno	0.08 g
Propilparabeno	0.02 g
Trietanolamina csp.	pH = 7
Extracto seco llantén	15 g
Extracto seco granada	15 g
Etanol 96°	15 mL.
Agua destilada csp.	100 mL.

Elaboracion: Fuente propia

Anexo 4

Grupo control									
	Hora	7.45	8.05	9.05	10.30	12.45	14.00	15.30	17.00
RATA	PESO	VOLUMEN INICIAL DE LA PATA (mL) 1ra Lectura	2da Lectura (mL)	3da Lectura (mL)	4ra Lectura (mL)	5ta Lectura (mL)	6ta Lectura (mL)	7ma Lectura (mL)	8va Lectura (mL)
Cabeza	243 g	0.85	0.86	0.86	0.86	0.85	0.84	0.85	0.85
Cola	236 g	0.87	0.87	0.87	0.88	0.87	0.86	0.87	0.87
Lomo	229 g	0.75	0.73	0.75	0.75	0.76	0.75	0.75	0.76
Pata Delantera	251 g	0.79	0.78	0.79	0.79	0.78	0.78	0.79	0.80
Pata Trasera	233 g	0.81	0.83	0.81	0.80	0.80	0.81	0.81	0.82

Anexo 5

Grupo blanco

	Hora	7.45	8.00	8.05	9.05	10.30	11.00	12.45	14.00	15.30	17.00
RATA	PESO	VOLUMEN INICIAL DE LA PATA (mL) 1ra Lectura	APLICACIÓN DE CARRAGENINA 1%	2da Lectura (mL)	3ra Lectura (mL)	4ta Lectura (mL)	Aplicación del Extracto (g)	5ta Lectura (mL)	6ta Lectura (mL)	7ma Lectura (mL)	8va Lectura (mL)
Cabeza	243 g	0.85	0.1 mL	0.86	0.98	1.42	2.50	1.57	1.60	1.61	1.60
Cola	236 g	0.87	0.1 mL	0.89	0.96	1.47	2.50	1.62	1.63	1.65	1.64
Lomo	229 g	0.75	0.1 mL	0.77	0.91	1.39	2.50	1.53	1.59	1.62	1.63
Pata Delantera	250 g	0.79	0.1 mL	0.82	0.97	1.42	2.50	1.56	1.62	1.64	1.65
Pata Trasera	232 g	0.81	0.1 mL	0.83	0.94	1.51	2.50	1.64	1.69	1.72	1.71

Anexo 6

GEL DEL EXTRACTO DE LLANTEN AL 15%

	Hora	7.45	8.00	8.05	9.05	10.30	11.00	12.45	14.00	15.30	17.00
RATA	PESO	VOLUMEN INICIAL DE LA PATA (mL) 1ra Lectura	APLICACIÓN DE CARRAGENINA 1%	2da Lectura (mL)	3ra Lectura (mL)	4ta Lectura (mL)	Aplicación del Extracto (g)	5ta Lectura (mL)	6ta Lectura (mL)	7ma Lectura (mL)	8va Lectura (mL)
Cabeza	240 g	0.87	0.1 mL	0.89	0.93	1.24	2.5	1.19	1.15	1.11	0.99
Cola	238 g	0.73	0.1 mL	0.76	0.84	1.18	2.5	1.14	1.13	1.10	0.97
Lomo	237 g	0.79	0.1 mL	0.84	0.90	1.17	2.5	1.14	1.11	1.00	0.98
Pata Delantera	235 g	0.81	0.1 mL	0.83	0.87	1.17	2.5	1.15	1.13	1.09	1.00
Pata Trasera	242 g	0.85	0.1 mL	0.87	0.88	1.2	2.5	1.17	1.12	1.07	0.98

Anexo 7

GEL DEL EXTRACTO DE LLANTEN AL 30%

	Hora	7.45	8.00	8.05	9.05	10.30	11.00	12.45	14.00	15.30	17.00
RATA	PESO	VOLUMEN INICIAL DE LA PATA (mL) 1ra Lectura	APLICACIÓN DE CARRAGENINA 1%	2da Lectura (mL)	3ra Lectura (mL)	4ta Lectura (mL)	Aplicación del Extracto (g)	5ta Lectura (mL)	6ta Lectura (mL)	7ma Lectura (mL)	8va Lectura (mL)
Cabeza	232 g	0.84	0.1 mL	0.88	0.97	1.33	2.5	1.25	1.19	0.98	0.88
Cola	241 g	0.85	0.1 mL	0.89	0.98	1.32	2.5	1.30	1.23	1.10	0.97
Lomo	250 g	0.78	0.1 mL	0.84	0.82	1.37	2.5	1.29	1.21	1.11	0.89
Pata Delantera	235 g	0.81	0.1 mL	0.85	0.94	1.3	2.5	1.26	1.2	1.09	0.98
Pata Trasera	237 g	0.79	0.1 mL	0.82	0.9	1.31	2.5	1.28	1.21	1.1	0.99

Anexo 8

GEL DEL EXTRACTO DE GRANADA AL 15%

	Hora	7.45	8.00	8.05	9.05	10.30	11.00	12.45	14.00	15.30	17.00
RATA	PESO	VOLUMEN INICIAL DE LA PATA (mL) 1ra Lectura	APLICACIÓN DE CARRAGENINA 1%	2da Lectura (mL)	3ra Lectura (mL)	4ta Lectura (mL)	Aplicación del Extracto (g)	5ta Lectura (mL)	6ta Lectura (mL)	7ma Lectura (mL)	8va Lectura (mL)
Cabeza	243 g	0.83	0.1 mL	0.85	0.97	1.42	2.5	1.41	1.40	1.37	1.35
Cola	239 g	0.79	0.1 mL	0.82	0.94	1.39	2.5	1.39	1.37	1.32	1.29
Lomo	240 g	0.81	0.1 mL	0.84	0.90	1.31	2.5	1.30	1.31	1.27	1.21
Pata Delantera	235 g	0.77	0.1 mL	0.81	0.92	1.37	2.5	1.37	1.36	1.33	1.29
Pata Trasera	237 g	0.80	0.1 mL	0.84	0.92	1.35	2.5	1.34	1.32	1.30	1.27

Anexo 9

GEL DEL EXTRACTO DE GRANADA AL 30%

	Hora	7.45	8.00	8.05	9.05	10.30	11.00	12.45	14.00	15.30	17.00
RATA	PESO	VOLUMEN INICIAL DE LA PATA (mL) 1ra Lectura	APLICACIÓN DE CARRAGENINA 1%	2da Lectura (mL)	3ra Lectura (mL)	4ta Lectura (mL)	Aplicación del Extracto (g)	5ta Lectura (mL)	6ta Lectura (mL)	7ma Lectura (mL)	8va Lectura (mL)
Cabeza	258 g	0.83	0.1 mL	0.85	0.90	1.32	2.50	1.31	1.31	1.27	1.18
Cola	231 g	0.81	0.1 mL	0.84	0.93	1.35	2.50	1.33	1.27	1.23	1.11
Lomo	237 g	0.79	0.1 mL	0.81	0.89	1.58	2.50	1.47	1.34	1.31	1.25
Pata Delantera	242 g	0.85	0.1 mL	0.86	0.91	1.4	2.50	1.37	1.33	1.3	1.22
Pata Trasera	246 g	0.82	0.1 mL	0.84	0.94	1.38	2.50	1.36	1.32	1.27	1.2

Anexo 10

GEL DEL EXTRACTO A BASE DE LA ASOCIACION DE LLANTEN Y GRANADA AL 30%											
	Hora	7.45	8.00	8.05	9.05	10.30	11.00	12.45	14.00	15.30	17.00
RATA	PESO	VOLUMEN INICIAL DE LA PATA (mL) 1ra Lectura	APLICACIÓN DE CARRAGENINA 1%	2da Lectura (mL)	3ra Lectura (mL)	4ta Lectura (mL)	Aplicación del Extracto (g)	5ta Lectura (mL)	6ta Lectura (mL)	7ma Lectura (mL)	8va Lectura (mL)
Cabeza	234 g	0.78	0.1 mL	0.81	0.97	1.83	2.5	1.77	1.74	1.67	1.32
Cola	237 g	0.76	0.1 mL	0.79	0.91	1.54	2.5	1.43	1.39	1.29	1.19
Lomo	242 g	0.76	0.1 mL	0.80	0.99	1.37	2.5	1.31	1.29	1.17	0.99
Pata Delantera	230 g	0.74	0.1 mL	0.77	0.93	1.42	2.5	1.38	1.35	1.29	1.15
Pata Trasera	243 g	0.81	0.1 mL	0.84	0.97	1.44	2.5	1.39	1.36	1.29	1.12

Anexo 11

GEL DEL EXTRACTO A BASE DE LA ASOCIACION DE LLANTEN Y GRANADA AL 30%

	Hora	7.45	8.00	8.05	9.05	10.30	11.00	12.45	14.00	15.30	17.00
RATA	PESO	VOLUMEN INICIAL DE LA PATA (mL) 1ra Lectura	APLICACIÓN DE CARRAGENINA 1%	2da Lectura (mL)	3ra Lectura (mL)	4ta Lectura (mL)	Aplicación del Extracto (g)	5ta Lectura (mL)	6ta Lectura (mL)	7ma Lectura (mL)	8va Lectura (mL)
Cabeza	234 g	0.78	0.1 mL	0.81	0.97	1.83	2.5	1.77	1.74	1.67	1.32
Cola	237 g	0.76	0.1 mL	0.79	0.91	1.54	2.5	1.43	1.39	1.29	1.19
Lomo	242 g	0.76	0.1 mL	0.80	0.99	1.37	2.5	1.31	1.29	1.17	0.99
Pata Delantera	230 g	0.74	0.1 mL	0.77	0.93	1.42	2.5	1.38	1.35	1.29	1.15
Pata Trasera	243 g	0.81	0.1 mL	0.84	0.97	1.44	2.5	1.39	1.36	1.29	1.12

Anexo 12

Cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales en *Punica Granatum L.* “Granada”

Para la muestra 1: Absorbancia 0.628 = y ---- entonces

$$0.628 = 0.0016 x - 0.01$$

$$x = 398.8 \text{ mg/L}$$

Para la muestra 1: Absorbancia 0.633 = y ---- entonces

$$0.633 = 0.0016 x - 0.01$$

$$x = 401.9 \text{ mg/L}$$

Para la muestra 1: Absorbancia 0.633 = y ---- entonces

$$0.604 = 0.0016 x - 0.01$$

$$x = 383.8 \text{ mg/L}$$

El promedio es de 394.83 mg/L

$$394.83 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \rightarrow 1.5 \text{ g}$$

$$\frac{394.83 \text{ mg}}{1.5 \text{ g}} = 263.22 \text{ mg/g}$$

$$263.22 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times 100$$

$$x = 26.32\%$$

Luego de haber realizado la prueba de Folin Ciocalteu podemos decir que encontramos un 26% de Compuestos fenólicos totales en *Punica Granatum L.* “Granada”.

Anexo 13

Cálculo de la concentración de compuestos fenólicos totales en *Plantago Lanceolata L.* “Granada”

Para la muestra 1: Absorbancia 0.174 = y ---- entonces

$$0.174 = 0.0016 x - 0.01$$

$$x = 153.0 \text{ mg/L}$$

Para la muestra 1: Absorbancia 0.185 = y ---- entonces

$$0.185 = 0.0016 x - 0.01$$

$$x = 121.9 \text{ mg/L}$$

Para la muestra 1: Absorbancia 0.165 = y ---- entonces

$$0.165 = 0.0016 x - 0.01$$

$$x = 109.04 \text{ mg/L}$$

El promedio es de 115.4 mg/L

$$115.4 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \rightarrow 1.5 \text{ g}$$

$$\frac{115.4 \text{ mg}}{1.5 \text{ g}} = 76.93 \text{ mg/g}$$

$$76.93 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times 100$$

$$x = 7.96\%$$

Luego de haber realizado la prueba de Folin Ciocalteu podemos decir que encontramos un 7.96% de Compuestos fenólicos totales en *Plantago Lanceolata L.* “Llantén”.