

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



"EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO TÓPICO DEL GEL A BASE DEL EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Mentha spicata* L. "HIERBA BUENA" EN EDEMA PLANTAR INDUCIDO EN RATAS HOLTZMAN MACHOS

Tesis presentada por las Bachilleres:

Condori Cruz, Gilma Rosana

Quispe Humpiri, Jaquelin Lizeth

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesor:

Dra. Rita Nieto Montesinos

AREQUIPA- PERÚ

2018

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

Expediente N°. 20160000047267

N° Trámite en Fac. 1685-2016

Fecha 08-11-2016

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: *CONDORI CRUZ, Gilma Rosana*
QUISPE HUMPIRI, Jaquelin Lizeth

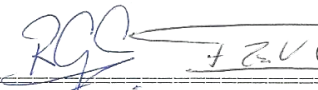

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"FORMULACION Y EVALUACION *in vivo* DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE UN GEL TOPICO A BASE DE *Mentha spicata* (HIERBA BUENA) EXTRAIDO POR FLUIDOS SUPERCRTICOS"

DICTAMINADORES: 1) *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar* 2) *Q. F. Fernando Torres Vela*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por las recurrentes, se ha procedido a la revisión del mismo, sugiriendo se cambie el título a: "EVALUACION *IN VIVO* DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE UNA CREMA A BASE DE EXTRACTO *Mentha spicata* (HIERBA BUENA) OBTENIDO POR FLUIDOS SUPERCRTICOS", y después de realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas:   (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha *28/3/17*

ASESOR: *Dra. Rita Nieto Montesinos*

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por las recurrentes, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, sugerimos se cambie el título a: "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO TOPICO DEL GEL A BASE DE EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Mentha spicata* L. "HIERBA BUENA" EN EDEMA PLANTAR INDUCIDO EN RATAS *HOLTZMAN MACHOS*", después de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firma  Fecha *23/03/2018*

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Dra. Roxana Gutiérrez Aranibar* 3) *Dra. Karin Vera López*
2) *Q. F. Fernando Torres Vela*

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

Atentamente

Firma   (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha

JURADOS: Presidente *DRA. ROXANA GUTIERREZ ARANIBAR*
Vocal *Q.F. FERNANDO TORRES VELA*
Secretario *DRA. KARIN VERA LOPEZ*

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: *30/05/18* Hora: *19.00* Local: C- 402 (SUM)


DECANO *23/05/18*

DEDICATORIA

Dedico y agradezco esta tesis a Dios por darme por darme fuerza, fe y haberme guiado a lo largo de este camino; dándome la fortaleza para afrontar los diversos retos que se me presentaron.

A mis padres Juan y Rosa por brindarme su amor, ejemplo, consejos, valores y motivándome siempre a seguir adelante en cada momento de mi vida todo esto es para ustedes porque son los seres más maravillosos.

A mi hermana Aydee, William, mi pequeña Alessia y Camilita quienes me motivaron y creyeron en mí brindándome su apoyo incondicional, dándome palabras de aliento y buenos deseos para seguir adelante con mis sueños, gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada una de mis metas.

Gilma Rosana Condori cruz

Al señor de Muruhuay y a la virgen de Cocharcas por iluminar cada uno de mis pasos en el sendero de la vida y corresponder a mis oraciones aumentando mi fe hacia ellos.

Dedico esta tesis con mucho cariño y amor a mis queridos padres Orlando Quispe Cayo y Pilar Humpiri Zapana por su apoyo, comprensión y amor infinito e incondicional que siempre me han brindado, también por elevar siempre sus oraciones al señor de Muruhuay y a la virgen de Cocharcas para que guíen mi camino.

A mi hermana Luz por siempre mi compañía y confidente en cada paso que doy y a mi hermano Stiven que con su inocencia y sus palabras han llenado mi alma de ternura.

Jaquelin Lizeth Quispe Humpiri

AGRADECIMIENTOS

Brindarles nuestra mayor gratitud a todos nuestros docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, por el tiempo brindado y todas las enseñanzas y consejos aportados a nuestra formación profesional y personal durante toda nuestra carrera universitaria.

Agradecer a nuestra asesora Rita Nieto Montesinos por el gran apoyo que nos brindó y por todos sus consejos que nos sirvieron para realizar y culminar este trabajo.

A nuestros dictaminadores quienes se merecen nuestro especial reconocimiento por el interés mostrado en nuestra investigación y las sugerencias recibidas a cada uno de ellos Dra. Roxana Gutierrez Aranibar, QF Fernando Torres Vela y Dra Karin Vera Lopez, por sus sabios consejos, su ayuda y experiencia nos dieron la clave para culminar esta meta de manera satisfactoria.

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

Gílma Rosana Condori Cruz

Jaquelin Lizeth Quispe Humpiri

INTRODUCCION

En las últimas décadas, el crecimiento de la industria farmacéutica y el incesante desarrollo de nuevos y más efectivos fármacos no han disminuido el interés de la medicina natural y por los medicamentos herbarios, en muchas sociedades. Al contrario, se han convertido en un tema de importancia mundial. Ya que las estimaciones actuales sugieren que muchos países en desarrollo dependen en gran medida de las plantas medicinales para satisfacer las necesidades de atención primaria de salud ¹.

Esta forma de atención está próxima a los hogares, es accesible y asequible. Además, es culturalmente aceptada y en ella confían las personas. La asequibilidad de la mayor parte de las medicinas tradicionales las hace más atractivas en el contexto del vertiginoso encarecimiento de la atención de salud ².

A nivel global, el mercado de las hierbas medicinales que incluye preparaciones a base de hierbas (materiales de hierbas en polvo o triturados, extractos, tinturas y aceites grasos de materiales herbales) y productos herbales terminados o fabricados que se encuentran en formas farmacéuticas (tabletas, cápsulas) se está expandiendo rápidamente, convirtiéndose en empresas multimillonarias alrededor del mundo ³.

En el Perú la riqueza de las plantas medicinales es muy amplia y está enmarcada dentro de más de 4400 especies de usos conocidos por las poblaciones locales, de los cuales un gran porcentaje se presenta en la población andina ⁴. En un estudio relevante muestra que Perú es el quinto país en el mundo con un número de plantas conocidas y usadas por la población.⁴

La *Mentha spicata* L. “Hierba buena” es una hierba aromática perenne, de crecimiento rápido, que pertenece a la familia de Lamiaceae. Se emplea en gastronomía, perfumería y productos farmacéuticos por su aroma intenso y fresco ^{5,6}. Es una planta nativa del viejo mundo ⁷, que fue traída al Perú en los primeros años de la conquista por los españoles⁸, ampliamente naturalizado en lugares soleados, requiere suelo medio profundo, húmifero^{9,7} y su distribución en el Perú se da en la costa, sierra y amazonia⁴.

Se usa principalmente las hojas las cuales están compuestas por polifenoles totales aproximadamente 19-23% dentro de este porcentaje se encuentra 59-67 % eriocitrina y ácido rosmarínico, 7-12 % luteolina 7-O-rutinósido, 6-10 % hesperidina, 0.5-1% aceite esencial, 12% flavonoides, alcaloides, cumarinas y taninos ¹⁰.

Se sabe que la planta está dotada de una variedad de propiedades biológicas debido a su alto contenido de metabolitos secundarios ¹¹. Se descubrió que era antialérgica ¹², antioxidante ¹³, antiplaquetaria¹⁴, anticitotóxico¹⁵, quimiopreventivo¹⁶ y ejerciendo actividades de eliminación de H₂O₂ ¹⁷. También posee actividad antimutagenica¹⁸. Recientemente, encontramos que la *Mentha spicata* L. “Hierba buena” posee actividad antiinflamatoria, analgésica, antiséptica, antiemética, carminativa, digestiva y espasmolítico¹⁹.

Por lo tanto, el presente proyecto busca evaluar el efecto antiinflamatorio tópico del extracto de la *Mentha spicata* L “ Hierba buena” frente a edema plantar inducido en ratas “Holtzman” machos. Además, se determinará la presencia metabolitos secundarios que se encuentran en la planta.



RESUMEN

Hoy en día se desarrollan investigaciones que involucran la evaluación de los efectos benéficos de diversas especies vegetales que son conocidas como plantas medicinales, ya que desde la antigüedad son utilizadas para el tratamiento de diversas dolencias o patologías.

Por tal motivo, el presente proyecto tuvo por objetivo evaluar el efecto antiinflamatorio tópico del gel a base del extracto de las hojas de *Mentha spicata* L. “Hierba buena” en edema plantar inducido en animales de experimentación.

Se obtuvieron extractos etanólicos al 70%, por los métodos de extractivos de soxhlet y maceración logrando rendimientos de 21.09 % y 32.60 % respectivamente. Por otro lado, se identificaron taninos y flavonoides por cromatografía en capa fina, obteniendo mayor cantidad de compuestos en el extracto obtenido por maceración.

Los extractos procedentes de la extracción por soxhlet y maceración lograron disminuir la inflamación en un estudio piloto hasta un 59.57 % y 93.91 % respectivamente, siendo el macerado el que obtuvo mayor efecto antiinflamatorio.

Después de realizar la etapa piloto se formuló y evaluó geles de 10 %, 20 % y 30 % del extracto de maceración ya que se cuantificó mayor porcentaje de rendimiento y logro disminuir la inflamación. Los geles mencionados disminuyen la inflamación hasta un

56.25 %, 58.28 % y 64.91 % respectivamente en la etapa experimental, en este estudio no se encontró diferencia significativa entre geles, por otro lado, los geles del 20 % y 30 % lograron resultados similares a los obtenidos al diclofenaco de 68.70 % encontrándose la ausencia de diferencia significativa según el test de Tukey.

Palabras claves: Inflamación, *Mentha spicata* L. Flavonoides y taninos.





ABSTRACT

Today research is carried out that involves the evaluation of the beneficial effects of various plant species that are known as medicinal plants since they have been used since ancient times to treat various ailments or pathologies.

For this reason, this project aimed to evaluate the topical anti-inflammatory effect of the gel based on the extract of the leaves of *Mentha spicata* L. "Good grass" in plantar edema induced in experimental animals.

Ethanol extracts were obtained at 70%, by the soxhlet extractive and maceration methods achieving yields of 21.09% and 32.60% respectively. On the other hand, tannins and flavonoids were identified by thin layer chromatography, obtaining more compounds in the extract obtained by maceration.

The extracts from the extraction by soxhlet and maceration managed to reduce the inflammation in a pilot study to 59.57% and 93.91% respectively, with the macerate obtaining the greatest anti-inflammatory effect.

After carrying out the pilot phase, gels of 10%, 20% and 30% of the maceration extract were formulated and evaluated, since a higher percentage of yield was quantified and inflammation was reduced. The aforementioned gels reduce inflammation up to 56.25%, 58.28% and 64.91% respectively in the experimental stage, in this study no significant difference was found between gels, on the other hand, the gels of 20% and 30% achieved similar results to the obtained at diclofenac of 68.70%, finding the absence of significant difference according to the Tukey test.

Key words: Inflammation, *Mentha spicata* L. Flavonoids and tannins.



INDICE

INTRODUCCIÓN	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
OBJETIVOS	xx
OBJETIVO GENERAL	xx
OBJETIVOS ESPECIFICOS	xx
HIPÓTESIS	xxi

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1. HIERBA BUENA	2
1.1. NOMBRE CIENTIFICO	2
1.2. NOMBRES COMUNES	2
1.3. DESCRIPCIÓN	2
1.4. DISTRIBUCIÓN:	3
1.5. TAXONOMÍA	3
1.6. PARTE UTILIZADA	4
1.7. COMPOSICIÓN	4
1.8. USO MEDICINAL	5
1.9. CULTIVO	5
2. MÉTODOS EXTRACTIVOS	6
2.1. EXTRACCIÓN DISCONTINUA	7
2.1.1 MACERACIÓN	7
2.1.2. DIGESTIÓN	8
2.1.3. DECOCCIÓN	8
2.1.4. INFUSIÓN	8
2.2. EXTRACCIÓN CONTINUA O PROGRESIVA	8
2.2.1. PERCOLACIÓN	9
2.2.2. SOXHLET	9
3. INFLAMACIÓN	9
3.1. CLASIFICACION DE LA INFLAMACIÓN	10
3.1.1. INFLAMACIÓN AGUDA	11

3.1.2. INFLAMACIÓN CRÓNICA	11
3.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN	11
3.2.1. CAMBIOS VASCULARES	11
3.2.2. CAMBIOS CELULARES	12
3.2.2.1. Marginación:	12
3.2.2.2. Rodadura:	12
3.2.2.3. Adhesión:	12
3.2.2.4. Transmigración o diapédesis:.....	13
3.2.2.5. Quimiotaxis	13
3.2.3.6. Fagocitosis	14
3.3.MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN	15
3.3.1. AMINAS VASOACTIVAS	15
3.3.2. METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO.....	15
3.3.3. SISTEMA DE COMPLEMENTO	16
3.3.4. ÓXIDO NÍTRICO	17
4. FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS	17
4.1. FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES).....	17
4.1.1. Diclofenaco.....	18
4.1.1.1. Mecanismo de acción	18
4.1.1.2. Aplicaciones terapéuticas.....	18
4.1.1.3. Efectos secundarios	18
4.2. LOS ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDEOS O GLUCOCORTICOIDES	18
5. FORMA FARMACÉUTICA TÓPICA EN LA QUE SE PRESENTA EL DICLOFENACO	19
5.1. GELES	19
5.1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS GELES	19
5.1.1.1. CLASIFICACIÓN POR SU COMPORTAMIENTO FRENTE AL AGUA	20
5.1.1.2. CLASIFICACIÓN POR EL NÚMERO DE FASES EN QUE ESTÁN CONSTITUIDOS	20
5.1.1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS GELES POR SU VISCOSIDAD	21
5.1.1.4. CLASIFICACIÓN DE LOS GELES POR SU ESTRUCTURA.....	21

5.1.2. COMPONENTES A CONSIDERAR PARA LA FORMULACIÓN DE UN GEL ANTISÉPTICO	21
---	----

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN	24
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	24
3. MATERIALES	26
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	26
3.1.1. UNIDAD BOTANICA:	26
3.1.2. UNIDAD BIOLÓGICA:	26
3.2. MATERIAL DE LABORATORIO	26
3.2.1. MATERIAL DE VIDRIO	26
3.2.2. EQUIPOS DE LABORATORIO	27
3.2.3. REACTIVOS Y FÁRMACOS	27
3.2.4. OTROS MATERIALES	28
4. MÉTODOS	29
4.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA PLANTA	29
4.1.1. RECOLECCIÓN	29
4.1.2. SELECCIÓN Y LAVADO	29
4.1.3. DESECACIÓN	29
4.1.4. TRITURACIÓN	29
4.1.5. ALMACENAMIENTO	29
4.2. METODOS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	30
4.2.1. EXTRACCIÓN POR SOXHLET	30
4.2.1.1. FUNDAMENTO	30
4.2.1.2. PROCEDIMIENTO	30
4.2.2. EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN	32
4.2.2.1. FUNDAMENTO	32
4.2.2.2. PROCEDIMIENTO	32
4.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO BLANDO	33
4.3.1. FUNDAMENTO	33
4.3.2. PROCEDIMIENTO	33

4.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR.....	35
4.4.1. METODO:.....	35
4.4.2. FUNDAMENTO	35
4.4.3. PROCEDIMIENTO.....	36
4.5. ELABORACIÓN DEL GEL A BASE DEL EXTRACTO DE <i>Mentha spicata</i>	
L. “Hierba buena”.....	37
4.5.1. COMPUESTOS PARA LA FORMULACIÓN DEL GEL TÓPICO.....	37
4.5.2. PREPARACIÓN.....	38
4.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	38
4.6.1. MÉTODO.....	38
4.6.2. FUNDAMENTO	38
4.7. MEDICIÓN DEL GRADO DE INFLAMACIÓN EN RATAS.....	39
4.7.1. MÉTODO.....	39
4.7.2. FUNDAMENTO	39
4.7.3. PROCEDIMIENTO.....	40
4.8. GRUPOS DE ESTUDIO.....	41
4.8.1. ETAPA PILOTO	41
4.8.2. ETAPA EXPERIMENTAL.....	41
4.8.3. PROCEDIMIENTO.....	42
5. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	43
5.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	43
5.1.1. MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL	43
5.1.1.1.MEDIA ARITMETICA.....	43
5.1.1.2 MEDIDAS DE DISPERSION	43
5.2. ESTADISTICA INFERENCIAL.....	45
5.2.1. ANOVA.....	45
5.2.2. PRUEBA DE HSD (DIFERENCIA VERDADERA SIGNIFICATIVA)	
DE TUKEY.....	45

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.....	47
2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR DOS METODOS SOXHLET Y	
MACERACION.....	48

2.1. METODO DE SOXHLET	48
2.1.1. ELECCIÓN DEL SOLVENTE ADECUADO PARA LA EXTRACCION POR EL METODO DE SOXHLET	49
2.2. METODO DE MACERACIÓN	51
3. EVALUACION DEL EFECTO ANTINFLAMATORIO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR EL METODO DE SOXHLET Y MACERACION A PARTIR DE <i>Mentha spicata</i> L. “Hierba buena” (ETAPA PILOTO).....	53
4. IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES Y TANINOS EN LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE <i>Mentha spicata</i> L. “Hierba buena” POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	58
4.1. IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES.....	58
4.2. IDENTIFICACION DE TANINOS.....	60
5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS GELES A BASE EXTRACTO ETANOLICO OBTENIDO POR EL MÉTODO DE MACERACIÓN (ETAPA EXPERIMENTAL)	61
SUGERENCIAS	69
CONCLUSIONES.....	70
BIBLIOGRAFIA	71

ANEXOS

ANEXO N°1: IDENTIFICACION DE LA <i>Mentha spicata</i> L.....	79
ANEXO 2: TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA PILOTO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR EL METODO DE SOXHLET	80
ANEXO 3: TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA PILOTO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR EL METODO DE MACERACIÓN	81
ANEXO 4: PORCENTAJE DE RENDIMIENTO OBTENIDO EN LA EXTRACCIÓN POR EL METODO DE SOXHLET Y MACERACION.....	82
ANEXO 5: COMPUESTOS UTILIZADOS EN LA FORMULACIÓN DEL LOS GELES.....	83
ANEXO 6: TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL DEL GEL10%	84

ANEXO 7: TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL DEL GEL 20 %	85
ANEXO 8: TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL DEL GEL 30%	86
ANEXO 9: TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL DEL GEL DE DICLOFENACO	87
ANEXO 10: TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL DEL GEL BASE	88
ANEXO 11: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN LA ETAPA EXPERIMENTAL	89
ANEXO 12: EVIDENCIA FOTOGRAFICA PARA LA ELABORACION DEL GEL AL 10%,20% Y 30%	90



INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mentha spicata</i> L. "Hierba buena"	03
Figura 2. Métodos de extracción	06
Figura 3. Diagrama del diseño experimental.....	25
Figura 4. Obtención del extracto de <i>Mentha spicata</i> L.....	31
Figura 5. Evaporación del solvente mediante el rotaevaporador	33
Figura 6. Extracto blando: A: Extracto obtenido por soxhlet y B: Extracto obtenido por maceración.....	34
Figura 7. Diferencia del porcentaje de rendimiento de los solventes por el método de soxhlet.	50
Figura 8. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos (n=4).....	55
Figura 9. Efecto antiinflamatorio de los grupos de tratamiento (n=4).....	57
Figura 10. Identificación de flavonoides en los extractos etanólicos: A: Obtenido por Soxhlet y B: Obtenido por maceración	59
Figura 11. Identificación de taninos en los extractos etanólicos: A: Obtenido por Soxhlet y B: Obtenido por maceración	60
Figura 12. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de geles (n=5)	63
Figura 13. Actividad antiinflamatoria (n=5)	64
Figura 14. Comparación de geles de 10%, 20%, 30%, diclofenaco y gel base.....	67

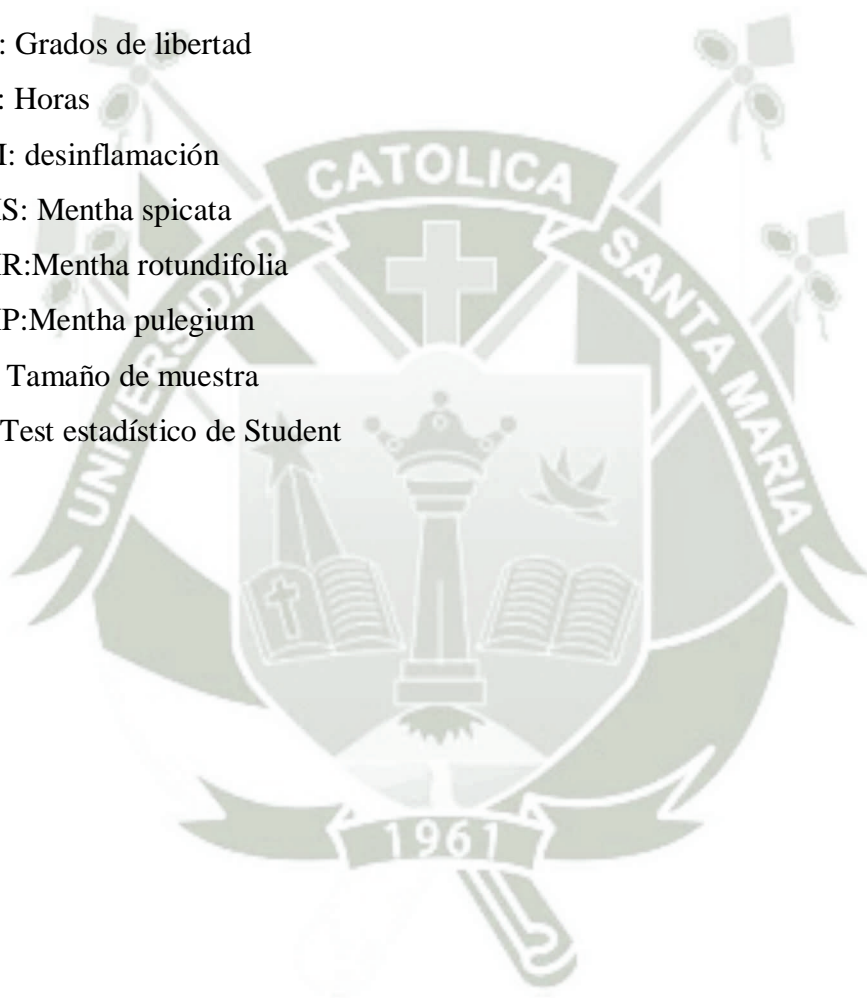
INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fases móviles y reveladores.....	37
Tabla 2. Grupos de estudio para el plan piloto	41
Tabla 3. Grupos de estudio para el estudio experimental	42
Tabla 4. Ubicación Taxonómica identificada por el Herbarium Arequipense (HUSA)	47
Tabla 5. Porcentaje de rendimiento obtenido en la extracción por soxhlet (n=3)	48
Tabla 6. Análisis de varianza de los rendimientos obtenidos por los solventes etanol 70%, cloroformo y éter de petróleo.	49
Tabla 7. Comparación de los porcentajes de rendimiento obtenido por el método de soxhlet y maceración	51
Tabla 8. Prueba F para varianza de dos muestras	52
Tabla 9. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales.....	52
Tabla 10. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos (n=4).....	54
Tabla 11. Expresión porcentual de la inflamación producida por los extractos (n=4).	56
Tabla 12. Porcentaje de disminución de la inflamación (n=4)	58
Tabla 13. Comparación de Rfs con el estudio de Brahmi <i>et al</i>	61
Tabla 14. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los geles (n=5)	62
Tabla 15. Actividad antiinflamatoria en forma porcentual (n=5).....	63
Tabla 16. Porcentaje de disminución de la inflamación (n=4)	65
Tabla 17. Actividad antiinflamatoria al final del tratamiento (n=5).....	65
Tabla 18. Análisis de varianza.....	66
Tabla 19. Test de Tukey	66

LISTA DE ABREVIATURAS

- °C: Grados centígrados
- I-CAM-1: Moléculas de adhesión intercelular
- VCAM-1 Moléculas de adhesión vascular
- PECAM: Molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias
- CD 31: Grupo de diferenciación
- C: Complemento
- IL: Interleucina
- AA: Ácido araquidónico
- COX: Ciclooxygenasa
- PG: Prostaglandina, como la PGE1, PGE2, PGF1a, PGG1, etc.
- PGI2: Prostaglandina I2 o prostaciclina
- TXA: Tromboxanos
- LT: Leucotrienos
- NO: Óxido nítrico
- NADPH: Nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido
- NOS: Óxido nítrico sintasa
- AINES: Anti-inflamatorios no esteroideos
- HPA: Hipotálamo-hipófiso-adrenal
- Na: Sodio:
- O / W: Aceite/Agua
- W / S: Agua / Silicona
- pH: Potencial de hidrogeniones
- CCF: Cromatografía en capa fina
- mL: Mililitros
- UV: Ultravioleta
- g: Gramos
- % RE: Porcentaje de rendimiento
- % EB: Porcentaje del extracto blando
- Pf: Peso final
- Pi: Peso inicial
- Rf: Factor de retención
- AlCl₃: Cloruro de aluminio

- FeCl_3 : Cloruro férrico
- c.s.p: Cantidad suficiente para
- CA: carragenina
- P/V: Peso/volumen
- Vol: volumen
- X: Media aritmética
- S^2 : Varianza
- S: Desviación estándar
- ANOVA: Análisis de varianza
- gl: Grados de libertad
- H: Horas
- DI: desinflamación
- MS: Mentha spicata
- MR: Mentha rotundifolia
- MP: Mentha pulegium
- n: Tamaño de muestra
- t: Test estadístico de Student



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antiinflamatoria de un gel a base del extracto de *Mentha spicata* L. “Hierba buena”.


OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener diferentes extractos de las hojas de *Mentha spicata* L. “Hierba buena” por los métodos de Soxhlet y/o maceración.
- Realizar un estudio piloto para evaluar la actividad antiinflamatoria de cada uno de los extractos.
- Realizar un estudio fitoquímico preliminar por cromatografía en capa fina del extracto de las hojas de *Mentha spicata* L. “Hierba buena”.
- Formular y evaluar una forma farmacéutica (gel tópico) a base del extracto de las hojas de *Mentha spicata* L. “Hierba buena” que demuestre mayor efecto antiinflamatorio en ratas “Holtzman” machos.
- Comparar el efecto antiinflamatorio de los geles elaborados al 10 %, 20 % y 30% con un control positivo (gel de diclofenaco 1 %).

HIPÓTESIS

Dado que la población andina utiliza compresas o cataplasmas de *Mentha spicata* L. “hierba buena” para aliviar la inflamación es probable que el gel elaborado a base del extracto de dicha especie vegetal presente efecto antiinflamatorio frente a edema plantar inducido en animales de experimentación.





CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1. HIERBA BUENA

1.1. NOMBRE CIENTIFICO: *Mentha spicata* L. y *Mentha viridis* L. ²⁰.

1.2. NOMBRES COMUNES: Se le conoce como hierba buena, albaina, arvino, menta dulce, yerba buena ²⁰.

1.3. DESCRIPCIÓN: Diferentes estudios describen así las partes de la planta^{5,6}:

- Planta perenne, de 30-50 cm altura, ascendente, suavemente aromática, rizomatosa.
- Tallos ramificados, finos, erectos y cuadrangulares, principalmente a partir de la zona media con pubescencia rala de coloración rojizo morado.
- Hojas subsésiles con pecíolos de forma lanceoladas u ovado-lanceoladas, con pelos simples ralos en ambas caras .
- Inflorescencia terminal, cónica, de 3-5 cm x 5-8 mm, alargada y estrecha.
- Brácteas foliáceas; bractéolas filiformes, de borde ciliado, las del ápice de la inflorescencia por lo general mayores que las flores.
- Flores lilas o violáceas.
- Cáliz de 1,5-3 mm, persistente, infundibuliforme, dientes iguales o desiguales, de los cuales los 3 inferiores son más largos, glabros o ciliados en el borde.
- Corola de 2,5- 4 mm, lóbulo dorsal más ancho, glabra o con pelos cortos y pocos pelos peltados.
- Filamentos estaminales de 4 mm, generalmente exertos y anteras elipsoides.

- Estilo de 3 mm, ramas estigmáticas desiguales ^{5.6.}

Figura 1; *Mentha spicata* L.” Hierba buena”



Fuente: Elaboración propia

1.4. DISTRIBUCIÓN:

La *Mentha spicata* L. “Hierba buena” es una planta nativa del viejo mundo ⁷; posiblemente Europeo, que fue traída al Perú en los primeros años de la conquista por los españoles⁸ ,es ampliamente naturalizado en lugares soleados, requiere suelo medio profundo, húmifero^{9.7} y su distribución en el Perú se da en la costa, sierra y amazonia⁴.Esta planta fue domesticada desde épocas muy remotas en huertos y jardines familiares

1.5 TAXONOMÍA

División: Magnoliophyta

Clases: Magnoliopsida

Sub clase: Asteridae

Orden: Lámiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Mentha* L.

Especie: *Mentha Spicata* L., *Mentha viridis* L

Constancia de clasificación taxonómica (anexo 1)

1.6. PARTE UTILIZADA

Parte aérea (las hojas)

1.7. COMPOSICIÓN

- Polifenoles totales en las hojas de *Mentha spicata* L. “Hierba buena” es de aproximadamente 19-23% dentro de este porcentaje se encuentra 59-67 % eriocitrina y ácido rosmarínico, 7-12 % luteolina 7-O-rutinósido, 6-10 % hesperidina, ácido cafeico y ácido gálico ¹⁰.
- Flavonoides 12% que está compuesta de apigenina, rutina, catequina, epicatequina, miricetina, luteolina y diosmetina ¹⁰.
- Aceite esencial 0.5-1%. Este está compuesto de L-carvona (50 – 70%), L-limoneno (13 – 20%), felandreno, α -y β -pineno (2 – 5%), δ -pineno, mentol 35-45%, mentona 15-20%, acetato de metilo 3-5%, isomentona 2-3%, cineol (2 – 4%) ¹⁰.
- Cumarinas
- Alcaloides
- Taninos ²¹.

1.8. USO MEDICINAL

Se sabe que la planta está dotada de una variedad de propiedades biológicas debido a su alto contenido de metabolitos secundarios ¹¹. Se descubrió que era antialérgica ¹², antioxidante ¹³, antiplaquetaria ¹⁴, anticitotóxico ¹⁵ y quimiopreventivo ¹⁶, además ejerciendo actividades de eliminación de H₂O₂ ¹⁷. También posee actividad antimutagénico ¹⁸. Recientemente, encontramos que *Mentha spicata* L. contiene potente actividad antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, antiséptica antiemética, calmante, carminativa, digestiva y espasmolítica ¹⁹.

Tópicamente se usa en cataplasma y compresas para tratar abscesos, reumatismo y tumores; en baños para desodorizar los pies, lavar heridas y raspones. La decocción de hojas se aplica en cataplasmas y baños para tratar cáncer, endurecimientos, tumores y úlceras ²².

Las hojas frescas se usan para condimentar ensaladas y el extracto para saborizar chicles y caramelos ²².

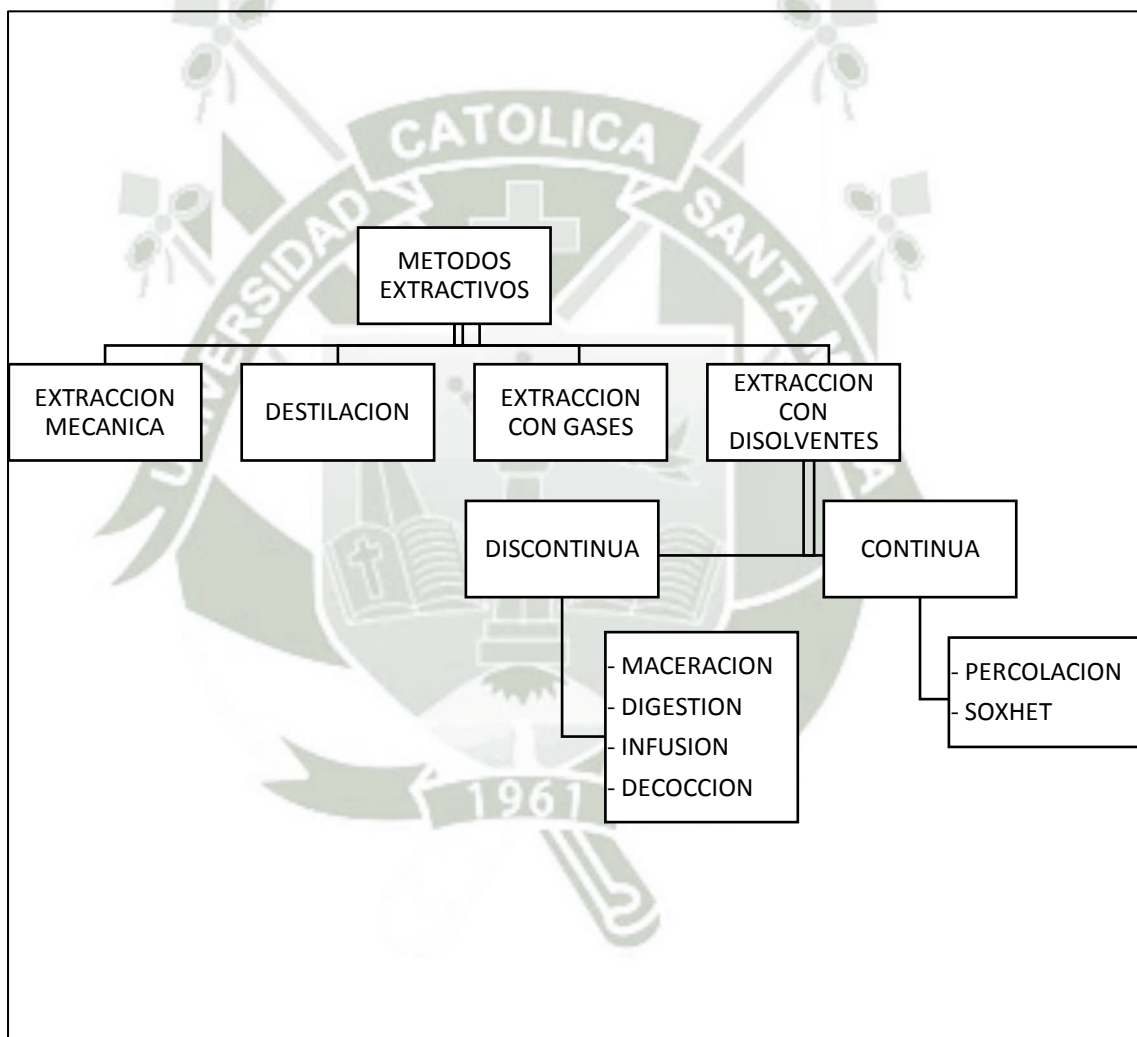
1.9. CULTIVO

Para la plantación suele hacerse habitualmente durante todo el año. De las plantas madres se extraen los rizomas (tallo horizontal y subterráneo), provistos de raíces, y se colocan en líneas separadas de unos 20 cm entre sí. La recolección se comienza aproximadamente a los dos meses de la plantación de los cultivos, poco antes de que la planta entre en plena floración. En relación a las necesidades hídricas requieren riego regular, pero con poca agua. No resiste la sequía. Prefiere climas húmedos y templados para su desarrollo normal, además, de buena iluminación. Por otro lado, es una planta bastante sensible al frío. Se adapta a una gran diversidad de suelos, es poco exigente, pero prefiere los suelos ligeros, ricos en materia orgánica y con cierta humedad ²³.

2. MÉTODOS EXTRACTIVOS

Para la elaboración de productos farmacéuticos a base de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo.

Figura 2. Métodos de extracción



Fuente: Kuklinski C.²⁴

Los métodos extractivos de interés en el estudio son:

2.1. EXTRACCIÓN DISCONTINUA

Se sumerge la droga en el solvente, por lo que la totalidad de la droga se contacta con el solvente utilizado para la extracción y la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio ²⁴.

Dentro de las técnicas de extracción discontinua tenemos:

2.1.1 MACERACIÓN

Se entiende por maceración al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga seca triturada con el disolvente constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el disolvente actúa simultáneamente sobre todas las porciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones sentidos y disolviendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio ²⁴.

Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de droga más solvente se lo protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente (tres veces por día, aproximadamente). El tiempo de maceración es diverso, las distintas Farmacopeas describen tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. A partir de este método no se consigue el agotamiento de las sustancias extraídas. “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento” ²⁴.

La maceración se utiliza cuando los principios activos son muy solubles y la estructura de la droga es muy permeable al disolvente ²⁴.

2.1.2. DIGESTIÓN

Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila entre los 50 y 60° C. Al aumentar medianamente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos ²⁴.

2.1.3. DECOCCIÓN

Llamada también cocimiento, se pone en contacto la droga con el disolvente (agua) la mezcla se lleva hasta temperatura de ebullición por 15 a 30 minutos ²⁴.

2.1.4. INFUSIÓN

Se trabaja con un disolvente (agua), el cual se lleva a una temperatura próxima a la temperatura de ebullición y se introduce la droga que se quiere extraer. Se deja enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente ²⁴.

2.2. EXTRACCIÓN CONTINUA O PROGRESIVA

En este tipo de extracción el disolvente utilizado se va renovando y actúa en una sola dirección. La extracción continua consiste en poner en contacto la droga con el disolvente adecuado y mantener en todo momento el desequilibrio entre la concentración de principio activo en la droga y en el disolvente para que se produzca la difusión celular ²⁴.

Dentro de los métodos de extracción continua tenemos los siguientes:

2.2.1. PERCOLACIÓN

La droga se coloca en una columna y está en contacto permanente con el disolvente que está goteando por la parte superior de la columna, atraviesa toda la zona donde se encuentra la droga con sus principios activos, extrae y por la parte inferior se recogen los líquidos extractivos que contiene los principios activos. La percolación puede llegar a conseguir extracciones prácticamente completas de la droga, pero con un elevado consumo de disolvente, este tipo de extracción se realiza a temperatura ambiente ²⁴.

2.2.2. SOXHLET

Es un sistema de extracción sólido -líquido en el que la extracción se realiza en un equipo de vidrio que consta de tres partes, un matraz de fondo plano, un cuerpo extractor y un refrigerante. En el cuerpo extractor se coloca la droga, generalmente envuelta en material poroso que permita el contacto con el disolvente. En el matraz de fondo plano se coloca el disolvente que lleva a ebullición y los vapores del disolvente ascienden por el tubo lateral y llevan al refrigerante donde condensan y caen sobre la droga situada en el cuerpo extractor. Cuando el cuerpo extractor se llena de líquido extractivo este se vacía por el sifón lateral interno y desemboca al matraz inferior. El disolvente se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en el matraz inferior ²⁴.

3. INFLAMACIÓN

Es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados. Presentando signos como el dolor, calor, rubor y edema, además de pérdida de funcionalidad²⁵.

La inflamación puede ocasionarse por agentes lesivos como:

- Biológicos. Bacterias, virus, hongos, parásitos.

- Químicos. Se deben considerar, los productos industriales ácidos y álcalis, sustancias que, por ser de uso común o cotidiano, pasan desapercibidas como generadoras de procesos inflamatorios, por lo que en este rubro se incluyen:
 - Artículos de uso personal: desodorantes, lociones, tintes, cosméticos, etcétera.
 - Artículos de uso doméstico: detergentes, pegamentos, desinfectantes, insecticidas, aromatizantes.
 - Productos alimenticios: Elementos utilizados en la conservación, el procesamiento, la industrialización de bebidas y alimentos (sustitutos artificiales, saborizantes, colorantes, ácidos, conservadores).
 - Medicamentos: La automedicación, así como la polifarmacia y la falta de cuidado por parte del médico que, en ocasiones, se olvida de indicar al paciente medidas que contrarresten los efectos nocivos de algunos fármacos.
 - Alcohol, tabaco y contaminantes ambientales.

- Físicos. Principalmente los relacionados con traumatismos, cirugías, quemaduras y radiaciones ²⁶.

3.1. CLASIFICACIÓN DE LA INFLAMACIÓN

La clasificación de la inflamación se realiza tomando en cuenta el tiempo de duración:

3.1.1. INFLAMACIÓN AGUDA

Este tipo de inflamación es una respuesta inmediata al agente agresor cuya finalidad es liberar mediadores de defensa del organismo en el área de la lesión cuyo comienzo es rápido y cursa una duración corta. Presenta como signos diferenciales la vasodilatación local y aumento de la permeabilidad capilar ²⁷.

3.1.2. INFLAMACIÓN CRÓNICA

Es un proceso prolongado, existiendo en ese tiempo destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación. En la cual existen signos de degeneración y fibrosis en los tejidos afectados ²⁷.

3.2. FISIOPATOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN

Para el estudio, cualquier agresión local a un organismo desencadena respuestas en diversas fases, todas estas tienen como fin aumentar el flujo sanguíneo hacia la zona donde se produjo el daño, facilitar la migración de células inflamatorias, propiciar y activar a las propias células inflamatorias con el fin de combatir así el proceso lesivo. Estas fases son:

3.2.1. CAMBIOS VASCULARES

Este primer proceso inflamatorio tiene como propósito maximizar el traslado de los leucocitos al sitio de la lesión. Inicia con la dilatación arteriolar y capilar que va precedida por un espasmo transitorio de hasta 3 a 5 segundos, dicha dilatación explica el eritema y el calor en el sitio lesionado, esta dilatación vascular es regulada por mediadores químicos, la histamina y el ácido nítrico son los principales. Esto produce un aumento de la presión hidrostática intravascular que favorece la salida de líquidos y moléculas de bajo peso molecular

desde el interior del vaso hacia el intersticio (transudado); está perdida de líquido en los vasos lleva a la concentración de eritrocitos (estasis), a medida que evoluciona la estasis se va desplazando a los leucocitos a la periferia (marginación), donde las células del endotelio, principalmente las vénulas, se contraen con la subsiguiente separación de las uniones intercelulares, llevando a la adhesión y salida posterior de leucocitos al intersticio ²⁸.

3.2.2. CAMBIOS CELULARES

Se refieren al paso que hay desde la marginación de los leucocitos, en los vasos sanguíneos, hasta su llegada al tejido. Los siguientes pasos principales:

3.2.2.1. Marginación: Como ya se describió, dentro de los cambios vasculares los eritrocitos disminuyen su velocidad y se agrupan al centro de los vasos (estasis) y dejan a los leucocitos en la periferia o la pared vascular, fenómeno que se conoce como marginación ²⁸.

3.2.2.2. Rodadura: Se refiere a una adhesión transitoria de los leucocitos al endotelio vascular, facilitando aún más la agregación de células nucleadas. Esto principalmente se debe a moléculas de adhesión conocidas como selectinas que se encuentran en las células del endotelio, las cuales se unen a su ligando en el leucocito ²⁸.

3.2.2.3. Adhesión: Una vez que los leucocitos pasen a la fase de rodadura se unen con fuerza al endotelio vascular a través de moléculas de adhesión vascular (en el endotelio) de la familia de las inmunoglobulinas denominadas I-CAM-1 (moléculas de adhesión intercelular) y VCAM-1 (moléculas de adhesión vascular) por medio de glucoproteínas transmembrana conocidas como integrinas (en el

leucocito). Es de suma importancia mencionar que la expresión, afinidad entre moléculas y receptores, son mediadas por otras moléculas conocidas como citosinas ²⁸.

3.2.2.4. Transmigración o diapédesis: Se describe con este término a la migración de los leucocitos a través de las células endoteliales asistidas por moléculas de adhesión modificadas, la principal es la PECAM o CD 31 ²⁸.

3.2.2.5. Quimiotaxis: Una vez que las células nucleadas salen de la luz de los vasos, deben dirigirse al tejido lesionado o agredido a través de sustancias y mediadores químicos o quimio atrayentes que sirven de “guía” a dichas células. Las sustancias quimio atrayentes pueden ser propias del organismo, como las citocinas, productos del metabolismo del ácido araquidónico, factores del complemento o de patógenos externos como ciertas sustancias conformacionales de las bacterias ²⁸.

Una vez que los linfocitos llegan al sitio de la lesión por medio de la quimiotaxis, estos reconocen mediante sus receptores de membrana las estructuras de microbios, complejos inmunes y citosinas específicas para que, por medio de interacciones moleculares adecuadas, los linfocitos se activen. Este proceso implica una serie de eventos en cadena que se inician en la membrana celular, prosiguen en el citoplasma y terminan en el núcleo ²⁸.

La activación de los leucocitos se inicia cuando los distintos tipos de receptores reconocen tanto componentes de los microorganismos como moléculas y complejos inmunes. Una vez activados los leucocitos, estos producen citosinados (reguladores y amplificadores de la respuesta inmune) o factores citotóxicos (productos del metabolismo del ácido araquidónico y vaciamiento de enzimas lisosomales) ²⁸

3.2.2.6. Fagocitosis: Una vez que los leucocitos llegan al sitio de mayor concentración de factores quimiotácticos, como ya se mencionó, el proceso siguiente es la activación, la cual comienza con la identificación de la partícula extraña o germen con el fin de ser eliminado o fagocitado. El reconocimiento y adhesión del microorganismo o célula dañada es por medio de receptores específicos. Este proceso puede darse en ausencia o en presencia de opsoninas ²⁸.

El reconocimiento no opsonico consiste en que ciertos receptores reconocen moléculas específicas presentes en la célula o partícula blanco, es decir, el leucocito se une a su célula blanco sin necesidad de mediadores ²⁸.

El reconocimiento mediado por opsoninas se realiza cuando los receptores reconocen el antígeno que esta “marcado” (opsonizado) con moléculas llamadas opsoninas, como son los factores del complemento (C3b) e inmunoglobulinas ²⁸.

Aunque la inflamación es un fenómeno biológico adquirido durante la evolución, cuyo propósito es eliminar o limitar el daño y repararlo.

El proceso de reparación se puede iniciar dentro de las primeras 24 h de ocurrido el estímulo, cuando los macrófagos empiezan a cumplir con su labor de “limpieza” al digerir los restos celulares, bacterias, tejido necrótico, etc. Al mismo tiempo, se inicia la proliferación de células endoteliales y fibroblastos que van a formar vasos nuevos mediante estímulos de angiogénesis para tratar de restaurar la circulación y depositar colágeno y proteoglicanos para reparar el intersticio. A la neo vascularización que acompaña a los fibroblastos y al infiltrado inflamatorio se le denomina tejido de granulación. El proceso de reparación se sobrepone al de inflamación, y la primera culmina con la cicatrización o restauración del tejido lesionado ²⁸.

3.3. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN

3.3.1. AMINAS VASOACTIVAS

Histamina: es el mediador de la fase aguda y se encuentra almacenada en gránulos de células cebadas, basófilos y plaquetas. Es secretada en respuesta a lesiones de tipo físico, como los traumatismos, el frío o el calor; o ante la presencia de agentes inflamatorios como son moléculas del complemento (C3a, C5a), proteínas lisosomales e interleucinas (IL).²

Serotonina: es una amina vasoactiva presente en las plaquetas, se activa cuando las plaquetas entran en contacto con el colágeno y la trombina.

3.3.2. METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Debido a que el nivel intracelular de ácido araquidónico libre es muy bajo, la célula debe implementar un mecanismo enzimático que le permita disponer de él, como sustrato para la producción de eicosanoides.

El AA es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos, derivado del ácido linoleico, se encuentra en la dieta o incorporado a la fosfatidilcolina o fosfatidilinositol, fosfolípidos estructurales de las membranas plasmáticas de todas las células²⁸.

El AA se libera por acción de las fosfolipasas (pueden ser estimuladas por diversos factores como mecánicos, químicos y físicos). Una vez liberado, el AA puede metabolizarse por dos vías²⁸:

Las ciclooxigenasas (la forma constitutiva COX-1 y la inducible COX-2) generan intermediarios que, después de ser procesados por enzimas específicas, producen las prostaglandinas (PGD₂) producido por mastocitos, (PGE₂) por macrófagos, células endoteliales y los tromboxanos (TXA₂, el principal metabolito del AA generado por las plaquetas); el endotelio vascular carece de tromboxano sintetasa, pero posee una prostaciclina sintetasa, y, por tanto, genera prostaciclina (PGI₂).

El segundo camino que puede seguir el ácido araquidónico es el de las lipooxigenasas; aquél es convertido en una serie de ácidos peroxidados que corresponden a los leucotrienos y las lipoxinas²⁸.

Los eicosanoides (derivados del ácido araquidónico) sirven como señales intracelulares o extracelulares en una gran variedad de procesos biológicos, entre ellos la inflamación y la hemostasis. Sus efectos principales son²⁸:

- Prostaglandinas (PGD₂, PGE₂): Vasodilatación, dolor y fiebre.
- Prostaciclina (PGI₂): Vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria.
- Tromboxanos (TXA₂): Vasoconstricción y activación de la agregación plaquetaria.
- Leucotrienos: LTB₄ es quimiotáctico y activador de los neutrófilos; los otros leucotrienos son vasoconstrictores, inducen el broncoespasmo y aumentan la permeabilidad vascular (más potentes que la histamina).
- Lipoxinas: Vasodilatación, inhibición de la adhesión de los neutrófilos; estos metabolitos del AA producen una disminución de la inflamación, por lo que intervienen en la detención de la misma; a diferencia del resto de los derivados del AA, necesitan dos tipos celulares para ser sintetizados: los neutrófilos que producen intermediarios de la síntesis, que son convertidos en lipoxinas por las plaquetas al interactuar con los neutrófilos²⁸.

3.3.3. SISTEMA DE COMPLEMENTO

- Son proteasas plasmáticas constituido por 20 proteínas, las cuales se encuentran en mayor concentración en el plasma.
- Actúa en la inmunidad innata y adquirida.
- Los factores derivados afectan en: Fenómenos vasculares, adhesión, quimiotaxis, activación de leucocitos y fagocitosis²⁸.

3.3.4. ÓXIDO NÍTRICO

Otro de los mediadores que puede producirse en el sitio lesionado es el óxido nítrico (NO), liberado en este caso por células endoteliales en respuesta al estímulo lesivo. Su acción principal es la vasodilatación a través de la relajación del músculo liso de la pared vascular. Se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular, nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y otros cofactores, por acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La NOS endotelial es activada rápidamente por el aumento del calcio citosólico ²⁹.

4. FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS

En farmacología existen dos grandes grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

4.1. FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINE)

Los antiinflamatorios no esteroideos (abreviados AINE) son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos. Todos inhiben la enzima ciclooxigenasa. como consecuencia se inhibe la formación de prostaglandinas (particularmente PGE y PGL) a partir del ácido araquidónico³⁰.

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

4.1.1. Diclofenaco

Es un fármaco derivado del ácido fenilacético, es uno de los AINES que más se utiliza en el mercado.

4.1.1.1. Mecanismo de acción

Inhibe la enzima ciclooxigenasa ³⁰.

4.1.1.2. Aplicaciones terapéuticas

Alivio local del dolor y la inflamación leves, pequeñas contusiones, golpes, distensiones, tortícolis u otras contracturas, lumbalgias y esguinces leves (torcedura)³⁰.

4.1.1.3. Efectos secundarios

Irritación local ligera o moderada, enrojecimiento, erupción cutánea, picor y sensación de quemazón.³⁰

4.2. LOS ANTIINFLAMATORIOS ESTEROIDES O GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides o corticosteroides son un grupo de fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores que, derivados del cortisol o hidrocortisona, esta hormona producida por la corteza adrenal. Son poderosos antiinflamatorios, pero presentan reacciones adversas que afectan casi todo el organismo especialmente tras la terapia sistémica ³¹.

Las reacciones adversas más frecuentes son:

- En la terapia aguda produce estimulación del SNC que conduce a cuadros psicóticos e insuficiencia adrenal aguda por supresión brusca de la terapia corticoide crónica, situación que puede ser mortal pues provoca desbalance autonómico ⁴⁰.

- En la terapia crónica se refleja por supresión del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA), el aspecto Cushing con obesidad central, hiperglobulia, hiperglucemia e hipercolesterolemia, tendencia a infecciones oportunistas y virales, osteoporosis u osteonecrosis, pérdida de masa muscular, depresión, disforia, insomnio, trastornos digestivos variados, edemas por retención de Na⁺ y agua (con riesgo de hipertensión y/o insuficiencia cardíaca en pacientes predispuestos) y alteraciones cutáneas (acné, estrías, hirsutismo, equimosis). Estas sustancias pueden producir además hipokalemia, trastornos reproductivos (amenorrea, infertilidad), cataratas, aumento de presión intraocular e hipertensión endocraneana benigna.

Algunos pacientes con enfermedades crónicas (asma, reumatismo) se hacen dependientes de los corticoides, dificultando su sustitución por otros fármacos. El consumo pediátrico prolongado puede producir retardo en la estatura ³¹.

5. FORMA FARMACÉUTICA TÓPICA EN LA QUE SE PRESENTA EL DICLOFENACO

5.1. GELES

Los geles son formas farmacéuticas de consistencia semisólidos habitualmente transparentes, uniformes y fácilmente deformables. Los geles son ricos en líquido, generalmente no tienen aceites grasos y presentan dos fases. La fase dispersante que es un líquido y la fase dispersa que es un gelificante, que habitualmente es un polímero generador de estructura. Esta fase dispersa suele formar con el dispersante al inicio una solución coloidal. Los geles se aplican sobre las membranas mucosas, no tienen poder de penetración, por eso se utilizan para ejercer acción tópica (de superficie) ³².

5.1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS GELES

Podemos clasificar los geles dependiendo de diversos aspectos:

5.1.1.1. CLASIFICACIÓN POR SU COMPORTAMIENTO FRENTE AL AGUA

a. Geles hidrófilos o hidrogeles:

Se elaboran con excipientes hidrófilos como el agua, glicerina, propilenglicol u otros líquidos hidrofílicos. Gelificados por sustancias de tipo poliméricas como goma tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros carboxivinílicos o silicatos de aluminio y magnesio³³.

b. Geles hidrófobos o lipogeles:

Llamados también oleogeles. Son geles que están constituidos por excipientes como la parafina líquida adicionada de polietileno o por aceites grasos gelificados por anhídrido silícico coloidal o por jabones de aluminio y zinc.³³

5.1.1.2. CLASIFICACIÓN POR EL NÚMERO DE FASES EN QUE ESTÁN CONSTITUIDOS

a. Geles monofásicos

En estos casos están constituidos por una sola fase que es un medio líquido o líquidos miscibles: agua-alcohol y solución hidroalcohólica, aceite y etc.

b. Geles bifásicos

Están compuestas por dos fases líquidas inmiscibles, formándose una estructura transparente con propiedades de semisólido³⁴.

5.1.1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS GELES POR SU VISCOSIDAD

- Geles fluidos
- Geles semisólidos
- Geles sólidos (formulación de los sticks desodorantes y colonias sólidas)³⁴

5.1.1.4. CLASIFICACIÓN DE LOS GELES POR SU ESTRUCTURA

a. Geles elásticos

Un gel típico elástico es el de gelatina debido a que las soluciones de gelatina en agua y /o glicerina forman geles al enfriarse y se derriten al calentarse. Estos geles se usan en farmacia como geles de glicerogelatinas y bases para supositorios. Otras sustancias que dan geles elásticos siempre que no sean demasiado diluidas son: agar, almidón, pectina ³⁴.

b. Geles no elásticos:

El gel no elástico más conocido es el del ácido silícico o gel de sílice. Se obtiene mezclando soluciones de silicato de sodio con ácido clorhídrico en concentraciones apropiadas. Los geles no elásticos no tienen imbibición o hinchamiento, pueden absorber líquidos sin cambio de volumen ³⁴.

5.1.2. COMPONENTES A CONSIDERAR PARA LA FORMULACIÓN DE UN GEL

a. Polímero de alto peso molecular

Es un importante agente espesante y gelificante; es una sustancia muy hidrofílica, soluble en agua, alcohol y disolventes polares. Sus

propiedades como espesante son eficaces en un rango de pH que va desde 5-10; estos pueden ser: Carbopol, carboximetilcelulosa, metilcelulosa, etc ³⁵.

b. Principio activo antiséptico

Es el agente que impide la proliferación de microorganismos en los tejidos corporales previniendo las infecciones causadas por microorganismos un ejemplo de ello es el etanol ³⁵

c. Humectantes

Su función es hidratar el producto y evitar que pierda agua el preparado, además de coadyuvar al carbómero debido a que le da más extensibilidad a la película formada y la hace menos quebradiza los humectantes usados son glicerina, propilenglicol, etc ³⁵.

d. Reguladores de pH

Se utiliza como ingrediente para balancear el pH en preparaciones cosméticas, de higiene y en productos de limpieza, ej. Trietanolamina ³⁵.

e. Disolvente

Es el componente que se encuentra en mayor concentración ya que es el medio que nos permite la formación del mucílago ³⁵.



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

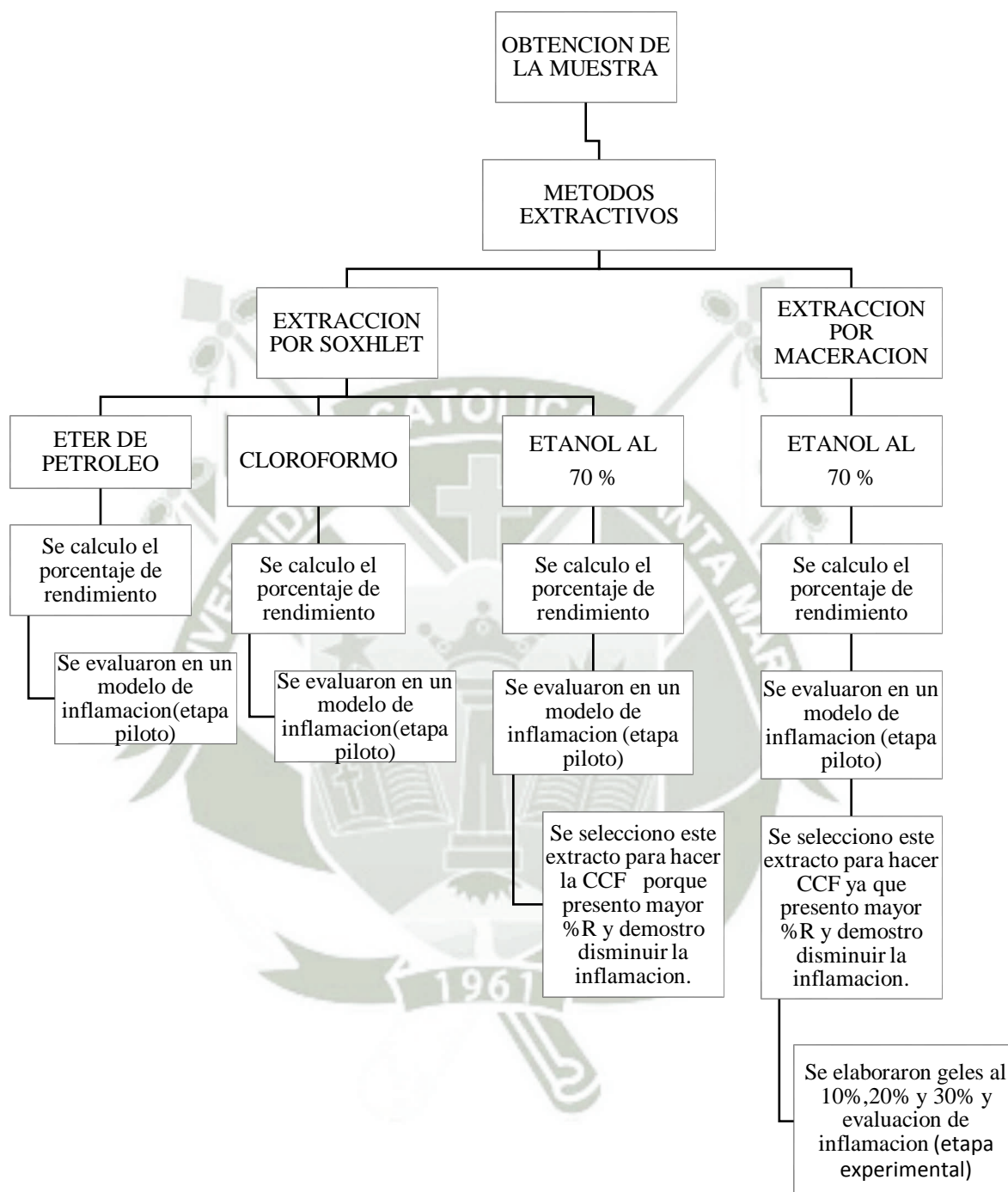
El presente proyecto de investigación, incluyendo la obtención de extractos, investigación cromatográfica se realizó en los laboratorios H-103, H-104 y el estudio en animales de experimentación se realizó en el bioterio de la Universidad Católica Santa María.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo es un estudio prospectivo, experimental donde se realizaron diferentes extractos por los métodos de soxhlet y maceración. Estos se evaluaron inicialmente en un modelo de inflamación (etapa piloto). Para este estudio, los animales de experimentación fueron 16 ratas de la especie *Rattus Rattus* de la raza “Holtzman” machos, con un peso entre 180-270 g, con una edad alrededor de 6 meses. Dichas unidades biológicas fueron sub-divididos en 4 grupos de 4 animales cada uno.

Luego se procedió a formular geles conteniendo 10 %, 20 % y 30 % del extracto de *Mentha spicata* L. “Hierba buena “que obtuvo el mayor efecto antiinflamatorio en la etapa piloto. Posteriormente se evaluaron los diferentes geles en una etapa experimental con unidades biológicas que cuentan con las mismas características mencionadas anteriormente. En esta etapa, se utilizó 25 ratas, subdivididas en 5 grupos de 5 animales cada uno, un grupo por cada formulación más un control positivo y un control negativo.

FIGURA 3. Diagrama del diseño experimental



Fuente: Elaboración propia

3. MATERIALES

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. UNIDAD BOTANICA: Para el presente trabajo de investigación se utilizó las hojas secas de *Mentha spicata* L. “Hierba buena”.

3.1.2. UNIDAD BIOLÓGICA: Se utilizaron un total de 41 ratas machos, sanos con un tiempo de vida de 6 meses de edad, con un peso entre 180-270 g, de la especie *Rattus Rattus* de la raza “Holtzman”, tanto para etapa piloto y la etapa experimental. Los animales de experimentación fueron sometidos a una adaptación estandarizada en cuanto a las condiciones ambientales (factores externos ambientales adecuados para realizar una óptima investigación); su alimentación en base a maíz blanco y agua en proporciones iguales y suficientes para que puedan alimentarse a voluntad propia, todo esto fue suministrado por el bioterio de la Universidad Católica de Santa María.

3.2. MATERIAL DE LABORATORIO

3.2.1. MATERIAL DE VIDRIO

- Probetas 10 mL, 50 mL y 100 mL
- Pipetas 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL
- Baguetas
- Embudo de vidrio
- Vasos precipitados 50 mL, 100 mL, 200 mL y 500 mL
- Varillas
- Capilares
- Termómetro
- Cuba cromatografica

- Balón de 250 mL.

3.2.2. EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza analítica (Ohaus pionner Tm)
- Equipo de extracción Soxhlet
- Cocina eléctrica
- Lámpara de luz ultravioleta (Camag)
- Rotaevaporador (Buchz Switzerland R-114)
- Pletismometro digital LE7500
- Espectrofotometro (Shimadzu UV 160)
- Estufa esterilizadora 854 (Shwabach –Germany)

3.2.3. REACTIVOS Y FÁRMACOS

- Etanol al 70% (Diproquin)
- Cloroformo (ACS J.T. Baker)
- Éter de petróleo (ACS J.T. Baker)
- Acetato de etilo (J.T Baker)
- Acido fórmico (Merck)
- Metanol (Merck)
- Agua destilada
- Cloruro férrico (Merck)
- Cloruro de aluminio (Riedel-D-Haen)
- Carragenina
- Carbopol 940
- Metilparabeno (Nequinsa)

- Propilenglicol (Merck)
- Trietanolamina (Merck)
- Solución de Tritón
- Diclofenaco 1% (Genfar)

3.2.4. OTROS MATERIALES

- 
- Mortero de porcelana
 - Espátula
 - Propipetas
 - Papel filtro
 - Placas cromatograficas
 - Pabilo
 - Guantes
 - Barbijos
 - Mandil
 - Jeringas de 1mLy 10 mL
 - Picetas
 - Frascos de color ámbar

4. MÉTODOS

4.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA PLANTA

4.1.1. RECOLECCIÓN

El material vegetal fueron las hojas de *Mentha spicata*. L “Hierba buena” procedente del distrito de Tiabaya de la ciudad Arequipa, las cuales fueron recolectadas en el mes de marzo.

4.1.2. SELECCIÓN Y LAVADO

La selección fue minuciosa para poder separar las hojas que se encontraban en buen estado. Después, se procedió a lavar mediante flujo continuo de agua potable hoja por hoja y luego se les dejó escurrir.

4.1.3. DESECACIÓN

Una vez realizada la selección y el lavado de las hojas, la desecación se realizó a temperatura ambiente por 3 días, protegido de la luz.

4.1.4. TRITURACIÓN

Después de secar las hojas de la *Mentha spicata* L. “Hierba buena”, se les trituro con ayuda de un mortero de porcelana retirando cualquier impureza (ramas). El proceso se realizó hasta la obtención de un polvo con un grado de trituración moderada (tamiz N° 8) con el fin de aumentar la superficie de contacto entre el solvente utilizado y la muestra.

4.1.5. ALMACENAMIENTO

Las hojas pulverizadas se almacenaron en frascos de vidrios ámbar y se rotularon.

4.2. METODOS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

4.2.1. EXTRACCIÓN POR SOXHLET

4.2.1.1. FUNDAMENTO

Es un método de extracción continua en caliente que se utiliza para materiales sólidos. Generalmente se emplea solventes con puntos de ebullición bajos para evitar la degradación de la muestra. Consiste en colocar el material vegetal a extraer, previamente triturado y pesado en un cartucho de celulosa, 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, asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material. Cuando alcanza el nivel adecuado sifona por el tubo regresando al balón. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento del deseado material ³⁶.

4.2.1.2. PROCEDIMIENTO

- 1) El equipo y materiales a utilizar se lavaron, posteriormente se hacen secar al medio ambiente.
- 2) Se procedió a pesar 10 g de muestra triturada de hojas de *Mentha spicata* L. “Hierba buena”, seguidamente se empaquetó en una hoja de papel filtro, llamado también cartucho poroso. Este fue colocado en el extractor del equipo soxhlet.
- 3) En el balón del equipo extractor se colocó 150 mL de los solventes indicados para cada extracción (éter de petróleo, cloroformo y etanol al 70%).

- 4) Luego se procedió a armar el equipo a baño María, la temperatura siempre controlada para que no exceda la temperatura de ebullición del solvente.
- 5) Posteriormente se inició la extracción con éter de petróleo una temperatura de 35- 60°C por un tiempo de 6 horas, con cloroformo a una temperatura de 61.2°C por un tiempo de 4 horas y con etanol al 70% a una temperatura de 78°C por un tiempo de 6 horas, tiempo considerado⁶³ para la extracción de los principios activos.
- 6) Terminado todo el proceso extractivo se procedió a retirar el cartucho del cuerpo extractor y desarmar el equipo.
- 7) Luego se evaporo el solvente del extracto en un rotaevaporador.
- 8) Finalmente se realizó el cálculo de porcentaje de rendimiento.

Figura 4. Obtención del extracto de *Mentha spicata* L.



Fuente: Elaboración propia

4.2.2. EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN

4.2.2.1. FUNDAMENTO

Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente hasta que éste penetre y disuelva los compuestos solubles. El solvente puede ser agua o etanol, aunque se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado por el solvente. En el recipiente se colocan el material vegetal con el solvente, se tapa y se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto ³⁷.

4.2.2.2. PROCEDIMIENTO

- 1) El equipo y materiales a utilizar se lavaron, posteriormente se hacen secar al medio ambiente
- 2) Se procedió a pesar 6 g de muestra triturada de las hojas de *Mentha spicata* L. “Hierba buena” y se depositó en los recipientes dispuestos para tal fin, se adicionó 150 mL del solvente, etanol al 70%, hasta cubrir completamente el material vegetal, se agitó y tapó.
- 3) Se dejó reposar por un período de 7 días, agitando cada 8 horas el contenido.
- 4) Se obtuvo el extracto y se filtró el producto.
- 5) Luego se evaporó el solvente del extracto en un rotaevaporador.
- 6) Finalmente se realizó el cálculo de porcentaje de rendimiento.

Figura 5. Evaporación del solvente mediante el rotaevaporador



Fuente: Elaboración propia

4.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO BLANDO

4.3.1. FUNDAMENTO

El porcentaje de rendimiento de extracción (%RE) se fundamenta en la obtención del extracto concentrado después de la evaporación del solvente a una temperatura adecuada en baño maría.

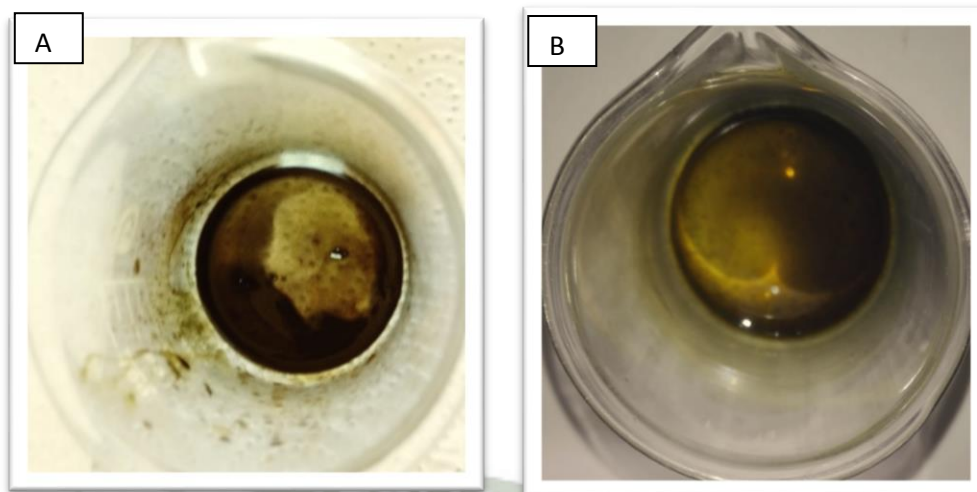
4.3.2. PROCEDIMIENTO

Los extractos de éter de petróleo, cloroformo y etanol al 70 % obtenidos por soxhlet y el extracto etanólico al 70% obtenido por maceración, fueron filtrados, evaporados en un rotaevaporador y seguidamente se procedió a su evaporación a baño María en un vaso precipitado previamente pesado.

Se procedió enfriar y secar los vasos precipitados con los distintos extractos blandos, para posteriormente pesarlos hasta que presenten peso constante y proceder a registrar sus masas.

Posteriormente se calculó el porcentaje de rendimiento.

Figura 6. Extracto blando: A: Extracto obtenido por soxhlet y B: Extracto obtenido por maceración



Fuente: Elaboración propia

Cálculo

$$\% EB = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Donde:

- % EB: porcentaje del extracto blando
- Pf: peso final
- Pi: peso inicial

4.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

4.4.1. METODO:

Cromatografía en capa fina (CCF)

4.4.2. FUNDAMENTO

En la cromatografía en capa fina (CCF), se utiliza una placa recubierta con el adsorbente (fase estacionaria) en forma de una capa delgada, de espesor constante, adherida sobre un soporte rígido, que puede ser una placa de vidrio, aluminio o poliéster. Hay adsorbentes que contienen un indicador de fluorescencia para facilitar la identificación de muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloridos, se requerirán otras técnicas de revelado. El eluyente (fase móvil) ascenderá por capilaridad por la placa y arrastrará los componentes en forma diferenciada a lo largo de ésta, produciendo “manchas” de los diferentes componentes. El grado de elución de las sustancias dependerá tanto de su propia polaridad como de la polaridad del eluyente utilizado ³⁸.

FACTOR DE RETRASO O RETENCIÓN

El constante R_f (factor de retención) es la manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa y mide la retención de un componente. Se define como la distancia recorrida por el compuesto, que se mide generalmente desde el centro de la mancha original hasta donde se ha desplazado, sobre la distancia del frente del disolvente o fase móvil. Para que los R_f sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones como el tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación, etc³⁸.

Para calcular el R_f se aplica la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{distancia recorrida por el eluyente (Y)}}$$

4.4.3. PROCEDIMIENTO

- Se procedió a preparar las placas de sílica gel (fase estacionaria) con dimensiones de 2 x 10 cm.
- Una vez cortadas las placas se trazó suavemente una línea con un lápiz en cada borde dejando 1 cm en la parte inferior.
- Luego se procedió a realizar el sembrado respectivo con los capilares ya cargados del extracto a sembrar.
- Por otro lado, se preparó la fase móvil en una cuba cromatográfica con los solventes necesarios para determinar los metabolitos secundarios.
- Terminada la siembra y saturada ya la cuba cromatográfica se procedió a introducir la placa cromatográfica en la cuba para que el solvente ascienda por capilaridad y lleve consigo las moléculas que según su afinidad se moverán en la fase estacionaria en un tiempo determinado.
- Al terminar la corrida cromatográfica se observó bandas de distintos colores según el tipo de grupo de metabolitos secundarios que se esté aislando.
- Se retiró la placa cromatográfica de la cuba y cuidadosamente se marcó hasta donde corrió la fase móvil luego se dejó secar a temperatura ambiente.
- Finalmente se procedió a la identificación de metabolitos secundario usando reveladores y una fuente de luz UV.

A continuación, en la tabla 1 se muestran las fases móviles y reveladores, así como las interpretaciones de los colores a observar en el transcurso del desarrollo del presente proyecto.

Tabla 1. Fases móviles y reveladores

Metabolito secundario	Fase móvil	Revelador	Colores característicos
Flavonoides	Acetato de etilo: ácido fórmico: agua (8.8:0.6:0.6)	AlCl ₃ 1%	Verde, amarillo, rojo, azul, colores presuntivos que indican la aparición de flavonoides.
Taninos	Acetato de etilo: metanol (8:2)	FeCl ₃ 5%	azules, verdes y rojizas, que indican la aparición de taninos

Fuente: Bramhi *et al*²¹ y Chavez J,Sucari F.⁵⁸

4.5. ELABORACIÓN DEL GEL A BASE DEL EXTRACTO BLANDO DE *Mentha spicata* L. “Hierba buena”

4.5.1. COMPUESTOS PARA LA FORMULACIÓN DEL GEL TÓPICO

- Extracto blando de *Mentha spicata* L “Hierba buena”
- Carbopol 940
- Propilenglicol
- Metilparabeno
- Trietanolamina
- Agua destilada c.s.p.

4.5.2. PREPARACIÓN

- 1) Para la apropiada elaboración del gel, primero se limpió los materiales necesarios para la preparación.
- 2) Luego se identificó, peso y rotulo los componentes involucrados para la preparación del gel.
- 3) Teniendo todos los materiales y reactivos listos se procedió a preparar carbopol 940, propilenglicol y metilparabeno que fueron dispersados en agua destilada agitando hasta obtener una homogenización y dejar en reposo durante 24 horas para lograr una buena estabilización.
- 4) A esta mezcla se le adicione el extracto blando de *Mentha spicata* L. “Hierba buena”.
- 5) Finalmente se neutraliza con trietanolamina hasta que pH 6.5, adquiriendo la característica de un gel.
- 6) El gel obtenido de *Mentha spicata* L. “Hierba buena” se envasó en un recipiente adecuado para evitar su exposición a la luz y degradación.

4.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

4.6.1. MÉTODO

Edema sub plantar inducido por carragenina.

4.6.2. FUNDAMENTO

El método de edema sub plantar por carragenina fue descrito por primera vez por Winter and Porter(1957) y posteriormente modificado por Sughisita et al., 1981. Ha sido uno de los métodos de mayor utilidad en la discriminación de fármacos antiinflamatorios por su sencillez y reproducibilidad. Consiste en la

administración subcutánea de una pseudo solución de carragenina (un muco polisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondrus crispus* y *Gigartina stellata*) a nivel de la aponeurosis plantar de la rata o del ratón. El producto a ensayar se puede administrar por diferentes vías sea intraperitoneal, oral, etc. La respuesta promovida por la carragenina (CA) es de tipo bifásica. La primera fase es mediada a través de la liberación de histamina, serotonina y quininas, mientras la segunda fase está asociada a la liberación de prostaglandinas, bradiquinina, proteasa y lisosoma, con un efecto máximo que se presenta alrededor de 3 h de la inyección de carragenina ³⁹.

Preparación de carragenina Al 1%

- Se pesó 0.05 g de carragenina y se diluyó en 5 mL de suero fisiológico.
- Preparada ya la solución se inyectó 0.1 mL del agente inflamatorio en la región SP de la rata.

4.7. MEDICIÓN DEL GRADO DE INFLAMACIÓN EN RATAS

4.7.1. MÉTODO

En esta prueba se utilizará el equipo pletismómetro

4.7.2. FUNDAMENTO

El Pletismómetro Digital LE 7500 es un instrumento utilizado para determinar la variación de volumen de las extremidades de roedores. Este equipo mide la variación de nivel de líquido (solución de tritón) que se encuentra en la vasija volumétrica del equipo) al introducir la extremidad en un depósito. La prueba del Pletismómetro permite el seguimiento de la evolución del proceso inflamatorio inducido experimentalmente en la pata de roedores y así detectar las propiedades antiinflamatorias o anti edema de sustancias farmacológicas.

Básicamente, el transductor de volumen se compone de 2 depósitos de metacrilato interconectados (vasija volumétrica y sensora) y llenados con una solución conductora. La introducción de la pata del animal en la vasija volumétrica cambia el nivel de líquido y la conductividad entre dos electrodos de platino previamente introducidos en la vasija sensora. Este cambio de conductividad entre los dos electrodos genera una señal de salida indicando el valor del volumen desplazado y por consecuencia el volumen de la pata ⁴⁰.

Preparación de la solución tritón

La solución tuvo una concentración de 0.1% p/v de cloruro de sodio, es decir 1g de cloruro de sodio por litro de agua destilada. Se añadió 15 gotas de tritón por cada litro de solución

4.7.3. PROCEDIMIENTO

- 1) Se encendió la unidad control Led hold y se esperó que “display” quedara 0.01 mL.
- 2) Se giró la válvula para que entre la solución en la vasija volumétrica hasta que alcanzo la marca de dicha vasija.
- 3) Se pulso el botón cero para indicar punto de partida (0.00 mL vol.).
- 4) Se calibro el instrumento presionando el botón “calibration”.
- 5) Se retiró el calibre de la vasija volumétrica y se pulso a Zero.
- 6) Se introdujo el calibre de 3.00 ml y se pulso “calibration”, el display marco 3.00 ml.
- 7) Se retiró, el calibre de la vasija volumétrica, el display indico 0.00 ml.
- 8) Estando el display en 0.00 ml se introdujo la extremidad cuyo volumen se desea determinar en la vasija volumétrica.

4.8. GRUPOS DE ESTUDIO

4.8.1. ETAPA PILOTO

En la etapa piloto se evaluó el efecto antiinflamatorio de los extractos obtenidos por el método de soxhlet y maceración. Para ello se utilizó 16 animales de experimentación que fueron sub-divididos en 4 grupos de 4 ratas cada uno como se describe en la (tabla 2).

Tabla 2. Grupos de estudio para el plan piloto

Métodos	Solvente	Número de animales
Soxhlet	Éter de petróleo	4 ratas
	Cloroformo	4 ratas
	Etanol al 70%	4 ratas
Maceración	Etanol al 70%	4 ratas

Fuente: Elaboración propia

4.8.2. ETAPA EXPERIMENTAL

En la etapa experimental se evaluó el efecto antiinflamatorio de 3 geles conteniendo diferentes concentraciones (10 %, 20 % y 30 %) del extracto etanólico de *Mentha spicata* L. “Hierba buena” obtenido por el método de maceración. Para ello se utilizaron 25 animales de experimentación que se sub-dividieron en 5 grupos de 5 ratas cada uno como se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Grupos de estudio para el estudio experimental

Grupo	Formulación	Número de animales
Control negativo	Gel base	5 ratas
Control positivo	Gel de Diclofenaco 1%	5 ratas
Grupo experimental 1	Gel 10 %	5 ratas
Grupo experimental 2	Gel 20 %	5 ratas
Grupo experimental 3	Gel 30 %	5 ratas

Fuente: Elaboración propia

4.8.3. PROCEDIMIENTO

- 1) Se distribuyó y se aclimato de forma aleatoria las ratas” Holtzman” machos.
- 2) Se procedió a marcar la pata de la rata a nivel de la aponeurosis para ver hasta donde se introducirá la pata en recipiente del equipo pletismometro digital.
- 3) Se midió el volumen inicial de la pata.
- 4) Luego se administró 0.1 mL de carragenina a través de una aguja hipodérmica de 21x 1 ½ pulgada.
- 5) Para la inflamación producida por la carragenina se esperó un tiempo de 3 horas previo al ensayo en el cual se logró la inflamación máxima constante.
- 6) Se midió el volumen de la pata en el tiempo antes mencionado

- 7) Seguidamente se aplicó cada una de las muestras, extractos o geles, de *Mentha spicata* “Hierba buena” tomando en cuenta la distribución de los grupos a trabajar.
- 8) Se procedió a medir el volumen de la pata a cada hora en el equipo pletismometro.

5. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

5.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

5.1.1. MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL

Son indicadores estadísticos que muestran información respecto al valor promedio de un conjunto de valores. Esta primera parte la dedicaremos a analizar tres medidas de tendencia central:

5.1.1.1. MEDIA ARITMÉTICA:

La media aritmética es la medida de tendencia central más utilizada y es igual a lo que conocemos como promedio. Entonces la media es la suma de los valores de todas las observaciones, dividida entre el número de observaciones realizadas.

$$\text{media } (\bar{x}) = \frac{\sum_{i=1}^N X_i}{N}$$

5.1.1.2. MEDIDAS DE DISPERSIÓN:

Parámetros estadísticos que indican como se alejan los datos respecto de la media aritmética. Sirven como indicador de la variabilidad de los

datos. Las medidas de dispersión más utilizadas son el rango, la desviación estándar y la varianza.

a. VARIANZA: Se define como la media de las diferencias cuadráticas de n puntuaciones con respecto a su media aritmética, es decir:

Esta medida es siempre una cantidad positiva, con propiedades interesante para la realización de inferencia estadística. Como sus unidades son las del cuadrado de la variable, es más sencillo usar su raíz cuadrada, que es la que vemos en la siguiente sección.

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

b. DESVIACIÓN ESTÁNDAR: La desviación estándar es la medida de dispersión más común, que indica qué tan dispersos están los datos con respecto a la media. Mientras mayor sea la desviación estándar, mayor será la dispersión de los datos.

El símbolo σ (sigma) se utiliza frecuentemente para representar la desviación estándar de una población, mientras que s se utiliza para representar la desviación estándar de una muestra.

$$S = \sqrt{s^2}$$

5.2. ESTADISTICA INFERENCIAL

5.2.1. ANOVA

El análisis de varianza en un método utilizado para estimar y probar hipótesis respecto a las medias de las poblaciones, sin embargo, es necesario precisar que las poblaciones respecto a las medias dependen de la magnitud de las varianzas observadas.

5.2.2. PRUEBA DE HSD (DIFERENCIA VERDADERA SIGNIFICATIVA) DE TUKEY

Es un test de comparaciones múltiples desarrollado por tukey. Permite comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la Hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Es, por lo tanto, un test que trata de perfilar, trata de especificar, una Hipótesis alternativa como la de cualquiera de los Test ANOVA.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el presente proyecto de investigación se buscó evaluar el efecto antiinflamatorio tópico a partir de geles a base del extracto de las hojas de *Mentha spicata* L. en edema plantar inducido por inyección SC de carragenina al 1 % en ratas “Holtzman” machos.

Los resultados se muestran a continuación:

1. OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se recolectaron ejemplares de *Mentha spicata* L “Hierba buena” procedente del distrito de Tiabaya – Arequipa, las cuales fueron llevadas al Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín donde fueron identificadas, siendo los resultados los que se muestran a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Ubicación Taxonómica identificada por el Herbarium Arequipense (HUSA)

Ubicación Taxonómica	
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Genero	Mentha L.
Especie	<i>Mentha spicata</i> L.

Fuente: Elaboración propia

El presente estudio se realizó con *Mentha spicata* L” Hierba buena” de la ciudad de Arequipa debido a que aún no se han reportado estudios sobre la “Hierba buena” procedente de esta ciudad. Además, un estudio anterior mostró que las variaciones en la composición química de los extractos de *Mentha spicata* L. producidos a partir de plantas cultivadas en diferentes países podrían ser atribuidos a la variación de condiciones agroclimáticas (geográficas, climáticas, estacional) de las regiones, la

etapa de madurez y el metabolismo de adaptación de las plantas ⁴⁰. Esto podría explicar las variaciones en la cuantificación de metabolitos secundarios presentes en la *Mentha spicata* L. de diversos orígenes ⁴¹.

2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS POR DOS METODOS (SOXHLET Y MACERACION)

2.1. METODO DE SOXHLET

Para la obtención de extractos por soxhlet se procedió a pesar 10 g de muestra la cual fue empacutada en un cartucho poroso para luego ser sometido a extracción con tres solventes diferentes, éter de petróleo y etanol al 70% por un tiempo de 6 horas y cloroformo por 4 horas.

Culminado el tiempo, se evaporó la muestra en un rotaevaporador recuperando los solventes y posteriormente se evaporó el resto de solvente hasta peso constante en baño María para luego calcular los porcentajes de rendimientos que se muestran en la Tabla 5. En esta tabla se puede observar que hay diferencia en los rendimientos según el tipo de solvente usado.

Tabla 5. Porcentaje de rendimiento obtenido en la extracción por soxhlet (n=3)

Ensayo	Porcentaje de rendimiento (%)		
	Éter de petróleo	Cloroformo	Etanol al 70%
1	2.80	7.80	20.66
2	1.80	9.40	19.40
3	2.30	10.20	23.20
Promedio ± S	2.30 ± 0.50	9.13 ± 1.22	21.09 ± 1.94

Fuente: Elaboración propia

2.1.1. ELECCIÓN DEL SOLVENTE ADECUADO PARA LA EXTRACCIÓN POR EL METODO DE SOXHLET

Posteriormente se procedió a realizar un análisis de varianza para determinar estadísticamente la diferencia que existe en los rendimientos obtenidos por los extractos.

Tabla 6. Análisis de varianza de los rendimientos obtenidos por el solvente etanol al 70%, cloroformo y éter de petróleo.

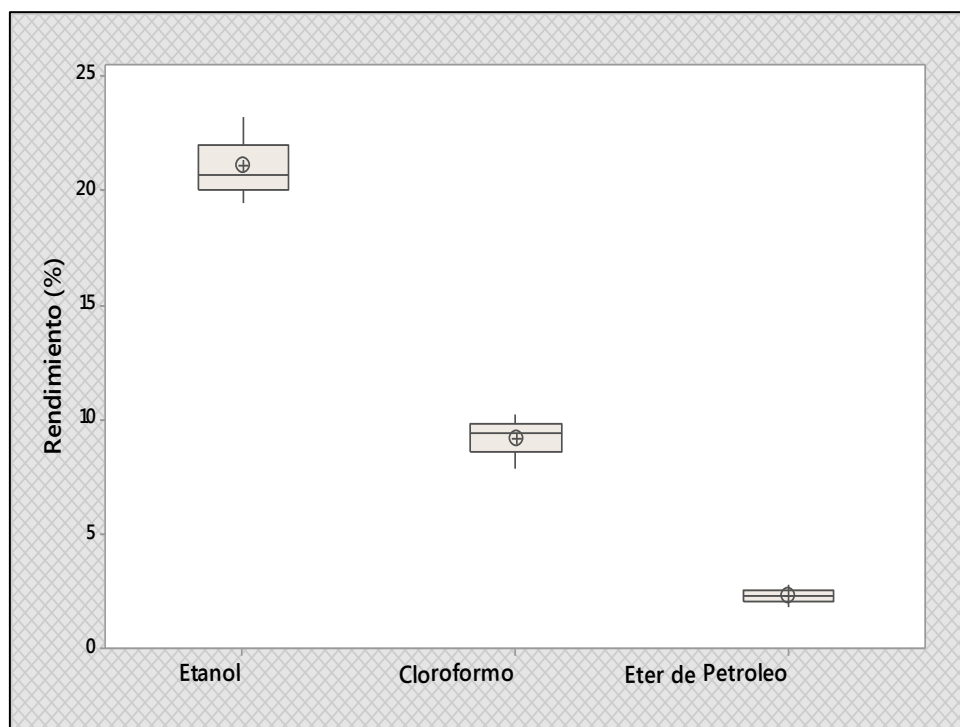
Análisis de varianza						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	P	Valor crítico para f
Entre grupos	542.52	2	271.26	148.23	7.81×10^{-6}	5.14
Dentro de los grupos	10.98	6	1.83			
Total	553.50	8				

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 6 se muestra que el valor crítico de F experimental (148.23) es mayor al valor crítico (5.14) por lo cual se concluye que al menos un grupo es diferente al 95% de confianza de los rendimientos obtenidos entre los solventes, lo cual se puede corroborar con el valor de la probabilidad p que es menor a 0.05 ($P < 0.05$).

El solvente que obtuvo mayor porcentaje de rendimiento fue el etanol al 70% ya que presentó aproximadamente 10 veces mayor porcentaje de rendimiento que el éter de petróleo y aproximadamente 2 veces mayor que con cloroformo como se muestra en la Figura 7.

Figura 7. Diferencia del porcentaje de rendimiento de los solventes por el método de soxhlet.



Fuente: Elaboración propia

En una investigación previa se comparó diferentes métodos de extracción de flavonoides a partir de las hojas de hierba buena (*Mentha spicata* L.)⁴². En esa investigación se utilizaron diferentes solventes con distintas polaridades: metanol, etanol puro, etanol al 70 % y éter de petróleo.

El mayor rendimiento de extracción se obtuvo con el extracto metanólico con un 26.73 %, seguido de etanol al 70% con un 25.76 %. El rendimiento de extracción más bajo se obtuvo mediante el uso de éter de petróleo con un porcentaje de rendimiento de 3.04%⁴¹. Así, esta investigación confirma nuestros resultados y ambos sugieren que el etanol al 70% tiene un rendimiento de extracción de compuestos polares superior al 20%.

Esto se fundamentaría en la polaridad que le confiere el agua al etanol y que hace que el etanol al 70% sea un solvente adecuado para la extracción de compuestos polares como los flavonoides polares a partir de la matriz de hierbas⁴²

Por lo expuesto a lo largo del presente proyecto se utilizó como solvente el etanol al 70%. No se utilizó el metanol debido a su toxicidad, ya que el solvente ideal para la extracción debe ser no tóxico, respetuoso del medio ambiente, poseer un alto rendimiento de extracción y tener la capacidad para extraer los componentes más activos sin pérdida. Además, después del metanol, el etanol al 70% es el solvente orgánico con el que se obtienen mejores rendimientos de extracto en peso, superando a la acetona²¹.

2.2. METODO DE MACERACIÓN

Para la obtención de los extractos por maceración se pesó 6 gramos de muestra y se puso en contacto con 150 mL de etanol al 70%. Posteriormente se calculó el rendimiento, obteniendo como resultado promedio 32.60 % siendo este superior al obtenido en la extracción por Soxhlet. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación de los porcentajes de rendimiento obtenido por el método de soxhlet y maceración

Ensayo	Rendimiento (%) Maceración	Rendimiento (%) Soxhlet
1	31.50	20.66
2	34.00	19.40
3	32.30	23.20
Promedio ± S	32.60 ± 1.28	21.09 ± 1.94

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8. Prueba F para varianza de dos muestras

	Rendimiento (%) Maceración	Rendimiento (%) Soxhlet
Media	32.6	21.09
Varianza	1.63	3.75
Grados de libertad	2	2
F	0.435	
Valor crítico para f (una cola)	0.053	

Fuente: Elaboración propia.

Práctico > f teórico.: las varianzas son heterogéneas (desiguales)

Tabla 9. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales

	Rendimiento (%) Maceración	Rendimiento (%) Soxhlet
Media	32.6	21.09
Varianza	1.63	3.75
Grados de libertad	3	
Estadístico t	8.600	
P(t<=t) una cola	0.002	
Valor crítico de t (una cola)	2.353	
P(t<=t) dos colas	0.003	
Valor crítico de t (dos Colas)	3.182	

Fuente: Elaboración propia.

Para determinar la diferencia entre rendimientos de los extractos se desarrolló un análisis F para comparación de varianzas encontrando que $F_{\text{práctico}} (0.435) > F_{\text{teórico}} (0.053)$ concluyendo que las varianzas son heterogéneas (desiguales). Por lo cual seguidamente se utilizó un test t para varianzas desiguales (Tabla 9) dando como resultado $p < 0.05$, concluyéndose que ambos rendimientos son diferentes al 95 % de confianza, lo que indica que el método de maceración presenta mayor porcentaje de rendimiento siendo este 32.60% en comparación con la extracción soxhlet que fue de 21.09%.

Esto probablemente se debe al contacto prolongado durante cierto tiempo de la droga con el solvente. Así, se constituye un conjunto homogéneamente mezclado en el cual el solvente actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones, sentidos y disolviendo los principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular³⁷.

A partir de este método se consigue el agotamiento de las sustancias extraídas. “Cuanto mayor sea la relación entre el líquido extractivo y la droga, tanto más favorable será el rendimiento”⁴³, razón por la cual el método por maceración fue utilizado a lo largo del presente proyecto.

Además, en un estudio reciente donde también se obtuvo un extracto etanólico de *Mentha spicata*” demuestra que la maceración es método adecuado para extraer compuestos fenólicos y flavonoides⁴⁴.

3. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINFLAMATORIO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR EL METODO DE SOXHLET Y MACERACIÓN A PARTIR DE *Mentha spicata* L. “Hierba buena” (ETAPA PILOTO)

Para identificar el extracto que posee mayor efecto antiinflamatorio se procedió a evaluar dicho efecto en animales de experimentación. En la Tabla 10 se puede observar los resultados obtenidos, donde se muestra que, en todos los grupos, los extractos se aplicaron 3 horas después de haber inducido la inflamación con carragenina al 1 %. Cabe resaltar que 3 horas luego de aplicar la carragenina al 1%, se produce la mayor inflamación.

Los resultados se obtuvieron luego de las lecturas al pletismómetro en donde se reportan en mL desplazados por el volumen de pata.

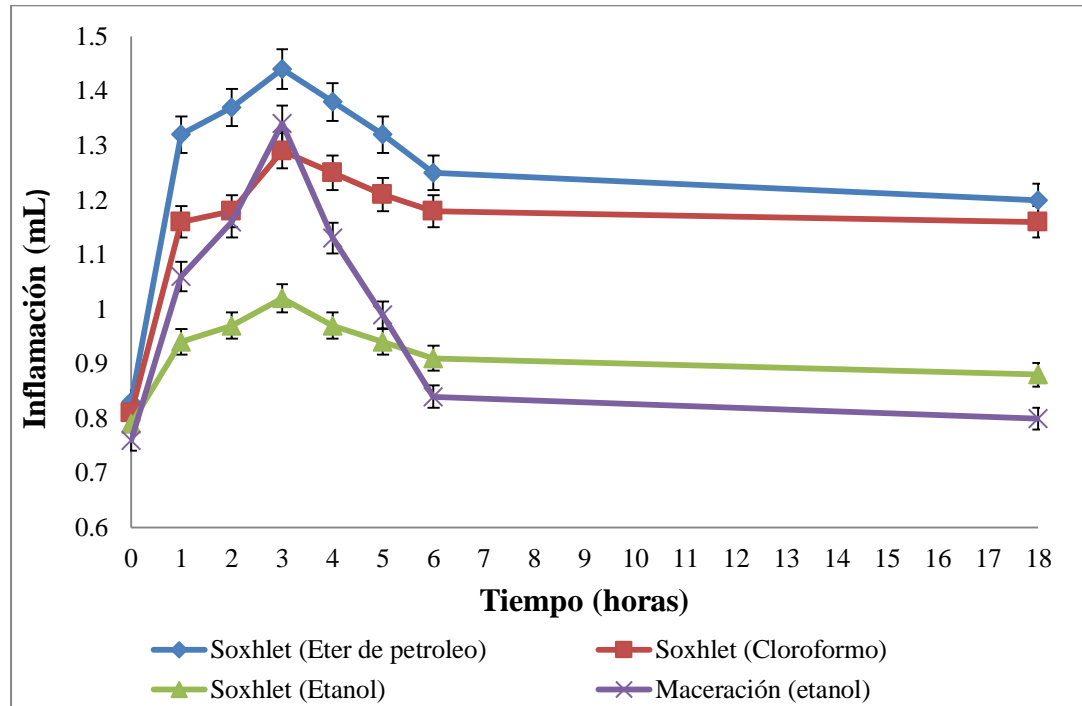
Tabla 10. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos (n=4).

Descripción	Tiempo (H)	Soxhlet			Maceración
		Éter de petróleo	Cloroformo	Etanol al 70%	Etanol al 70%
		Promedio (mL) ± S	Promedio (mL) ± S	Promedio (mL) ± S	Promedio (mL) ± S
Basal	0:00	0.83 ± 0.018	0.81 ± 0.039	0.79 ± 0.031	0.76 ± 0.013
Producción de la inflamación	1:00	1.32 ± 0.095	1.16 ± 0.055	0.94 ± 0.037	1.06 ± 0.029
	2:00	1.37 ± 0.116	1.18 ± 0.110	0.97 ± 0.033	1.16 ± 0.087
Aplicación de extracto	3:00	1.44 ± 0.097	1.29 ± 0.119	1.02 ± 0.041	1.34 ± 0.133
Post-aplicación de extracto	4:00	1.38 ± 0.110	1.25 ± 0.094	0.97 ± 0.050	1.13 ± 0.124
	5:00	1.32 ± 0.086	1.21 ± 0.090	0.94 ± 0.039	0.99 ± 0.079
	6:00	1.25 ± 0.136	1.18 ± 0.098	0.91 ± 0.045	0.84 ± 0.013
	18:00	1.20 ± 0.082	1.16 ± 0.103	0.88 ± 0.041	0.80 ± 0.013

Fuente. Elaboración propia

En la Figura 8 se observan los resultados de la inflamación producida, antes y después de cada tratamiento con los diferentes extractos.

Figura 8. Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos (n=4).



Fuente. Elaboración propia

Para poder comparar el extracto con mayor efecto antiinflamatorio fue necesario expresar la disminución de la inflamación en forma porcentual tomando como 100 % la inflamación máxima producida por la carragenina 1% que se dio a las 3 horas tras su aplicación. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Expresión porcentual de la inflamación producida por los extractos (n=4).

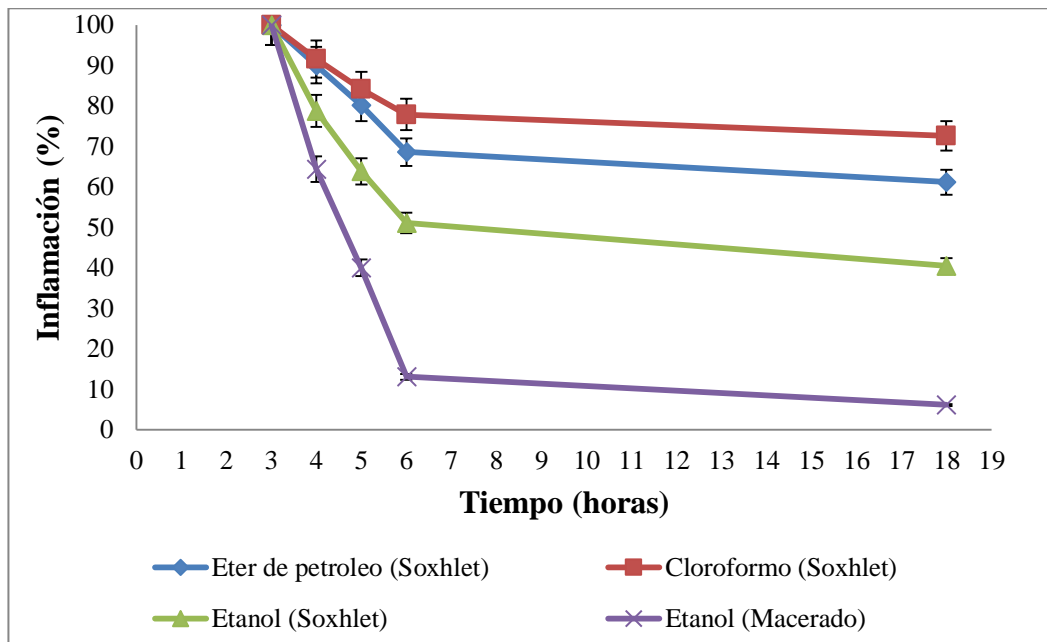
	Hora inducción de inflamación	Éter de petróleo Soxhlet	Cloroformo Soxhlet	Etanol al 70 % Soxhlet	Etanol al 70% Macerado
Inflamación máxima (%)	03:00	100.00	100.00	100.00	100.00
Inflamación después de la aplicación del extracto (%)	04:00	90.08	91.58	78.72	64.35
	05:00	80.17	84.21	63.83	40.00
	06:00	68.60	77.89	51.06	13.04
	18:00	61.16	72.63	40.43	6.09

Fuente. Elaboración propia

En la Figura 9 se puede observar los resultados que describe la Tabla 11 donde se reporta que el extracto obtenido por el método de maceración logra disminuir la inflamación hasta un 6.09 % del 100 % de inflamación producida por carragenina al 1 %.

Por otro lado, por el método soxhlet el extracto etanólico demostró disminuir la inflamación hasta un 40.43% en comparación con el extracto de éter de petróleo hasta un 61.16% y el extracto de cloroformo hasta un 72.63 % del 100% de inflamación.

Figura 9. Efecto antiinflamatorio de los grupos de tratamiento (n=4)



Fuente. Elaboración propia

Por otro lado, en la Tabla 12 se muestra la expresión del porcentaje de disminución de la inflamación, donde se aprecia que el extracto etanólico obtenido por maceración logró disminuir en mayor proporción la inflamación, hasta 93.91 %. En contraparte, los extractos obtenidos por Soxhlet solo lograron disminuir la inflamación hasta un 60 %, razón por la cual, en el presente proyecto se elaboraron geles a partir del extracto obtenido por el método de maceración.

El porcentaje de desinflamación se calculó de la siguiente manera:

$$DI = 100 - \%INFLAMACION$$

Tabla 12. Porcentaje de disminución de la inflamación (n=4)

Disminución de la inflamación (%) (100- % inflamación)				
	Éter de petróleo (Soxhlet)	Cloroformo (Soxhlet)	Etanol al 70 % (Soxhlet)	Etanol al 70 % (Maceración)
Final de tratamiento	38.84	27.37	59.57	93.91

Fuente. Elaboración propia

Para la evaluación del efecto antiinflamatorio es necesario además identificar metabolitos secundarios.

4. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y TANINOS EN LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE *Mentha spicata* L. “Hierba buena” POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Se realizó un análisis por cromatografía en capa fina para los extractos etanólico al 70 % de los métodos de soxhlet y maceración ya que demostraron mayor porcentaje de rendimiento y efecto antiinflamatorio.

4.1. IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

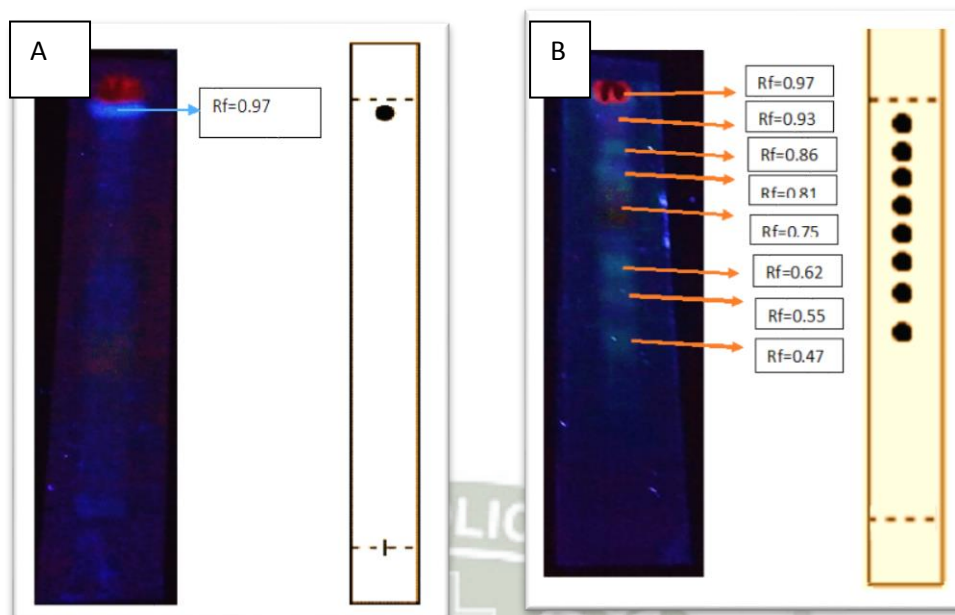
Una vez obtenidos los extractos se identificó flavonoides por cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos obtenidos por el método de soxhlet y maceración utilizando las siguientes fases ^{21,45}

FASE MÓVIL: Acetato de etilo: ácido fórmico: agua (8.8:0.6:0.6)

REVELADOR: Cloruro de aluminio 1% en etanol.

Figura 10. Identificación de flavonoides en los extractos etanólicos:

A: Obtenido por Soxhlet y B: Obtenido por maceración



Fuente. Elaboración propia

En la Figura 10 (A), se puede identificar la presencia de flavonoides correspondiente al extracto etanólico obtenido por soxhlet presentando un Rf de 0.97. Por otro lado, en la figura 10 (B) se puede observar la presencia de flavonoides del extracto etanólico obtenido por el método de maceración en el cual se distinguen Rfs de 0.47; 0.55; 0.62; 0.75; 0.81; 0.86; 0.93 y 0.97.

Estos resultados coinciden con los resultados de un trabajo previo donde se estudiaron 3 extractos de *Menthas* los cuales fueron: *Mentha spicata* (MS), *Mentha rotundifolia* (MR) y *Mentha pulegium* (MP). En este estudio la *Mentha spicata* mostró la presencia de ácidos fenólicos como ácido cafeico (Rf 0.80) y altas concentraciones de ácido rosmarínico (Rf 0.77)²¹, así como flavonoides, entre ellos, diosmina (Rf 0.43) y naringenina (Rf 0.83), siendo el más abundante²¹. Estos datos son muy similares a los encontrados en nuestro estudio, tabla 13.

Estos resultados en conjunto y un estudio anterior de Brahmí *et al*⁴⁵ nos permite confirmar que la maceración usando como solvente etanol al 70% permite la extracción eficiente de flavonoides partir de la *Mentha spicata* L “Hierba buena”.

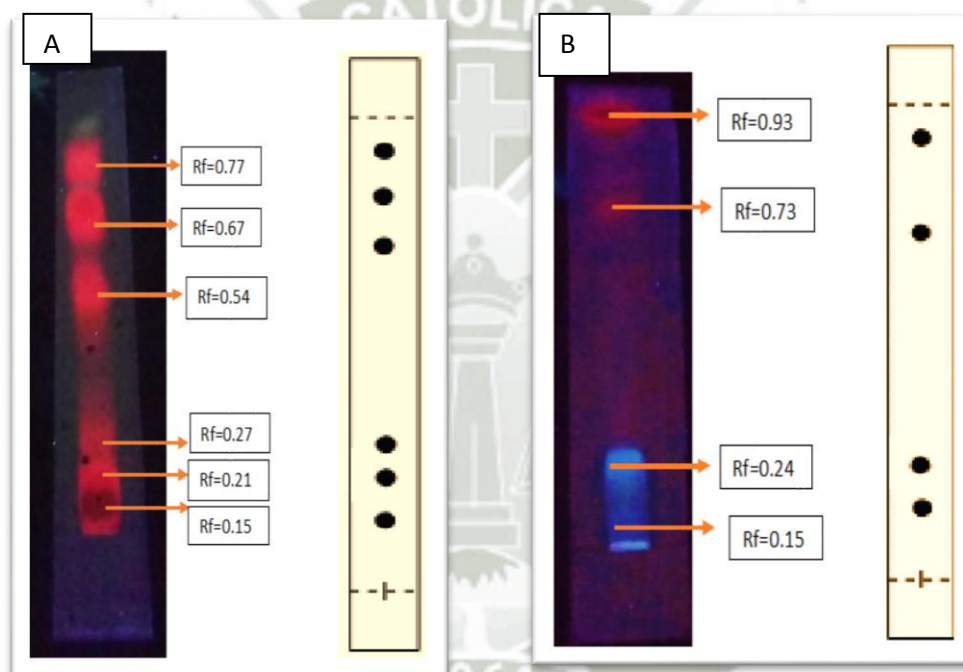
4.2. IDENTIFICACION DE TANINOS

Una vez obtenidos los extractos etanólicos por soxhlet y maceración, se identificó taninos por cromatografía en capa fina, utilizando las siguientes fases:

FASE MOVIL: Acetato de etilo: metanol (8:2)

REVELADOR: Cloruro férrico 5%

Figura 11. Identificación de taninos en los extractos etanólicos: A: Obtenido por Soxhlet y B: Obtenido por maceración



Fuente. Elaboración propia

En la Figura 11 (A) se puede observar la presencia de taninos correspondiente al extracto etanólico obtenido por Soxhlet presentando Rfs de 0.15; 0.21; 0.27; 0.54; 0.67 y 0.77 y en la figura 11 (B) los taninos del extracto etanólico obtenido por maceración, Rfs de 0.15; 0.24; 0.73 y 0.90.

Al observar la presencia de bandas de coloración azul y roja en la placa cromatográfica del extracto por maceración podemos ver que probablemente tengamos la presencia de taninos.

Estos resultados obtenidos serian confirmados, con una referencia anterior donde se evaluó la presencia de taninos a partir de los extractos de *Minthostachys molis* (muña) y *Senecio nutans* (chachacoma)⁴⁶ utilizando la misma fase móvil y el mismo revelador. Se tomó como referencia la fase móvil de este estudio debido a que la muña pertenece a la misma familia de la *Mentha spicata* L⁴⁶.

Tabla 13. Comparación de Rfs con el estudio de Brahmi *et al*

Compuesto	Rfs Según Bramhi <i>et al.</i>	Rfs <i>Mentha spicata l.</i> (método de maceración)
Diosmina	0.43	0.42
Naringenina	0.83	0.86

Brahmi *et al*²¹

5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS GELES A BASE DEL EXTRACTO CON ETANOL AL 70 % OBTENIDO POR EL MÉTODO DE MACERACIÓN (ETAPA EXPERIMENTAL)

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se procedió a preparar los geles como se indica en el apartado 4.5 del capítulo anterior preparándose así tres geles de concentraciones del 10 %, 20 % y 30 %. El efecto antiinflamatorio de estos, se comparó con un grupo control positivo tratado con Diclofenaco y un grupo control negativo tratado con gel base.

En la Tabla 14 se puede observar los resultados obtenidos, donde se muestra que, en todos los grupos, los diferentes tratamientos se aplicaron 3 horas después de haber

inducido la inflamación con carragenina al 1%. Cabe resaltar que 3 horas luego de aplicar la carragenina al 1%, se produce la mayor inflamación.

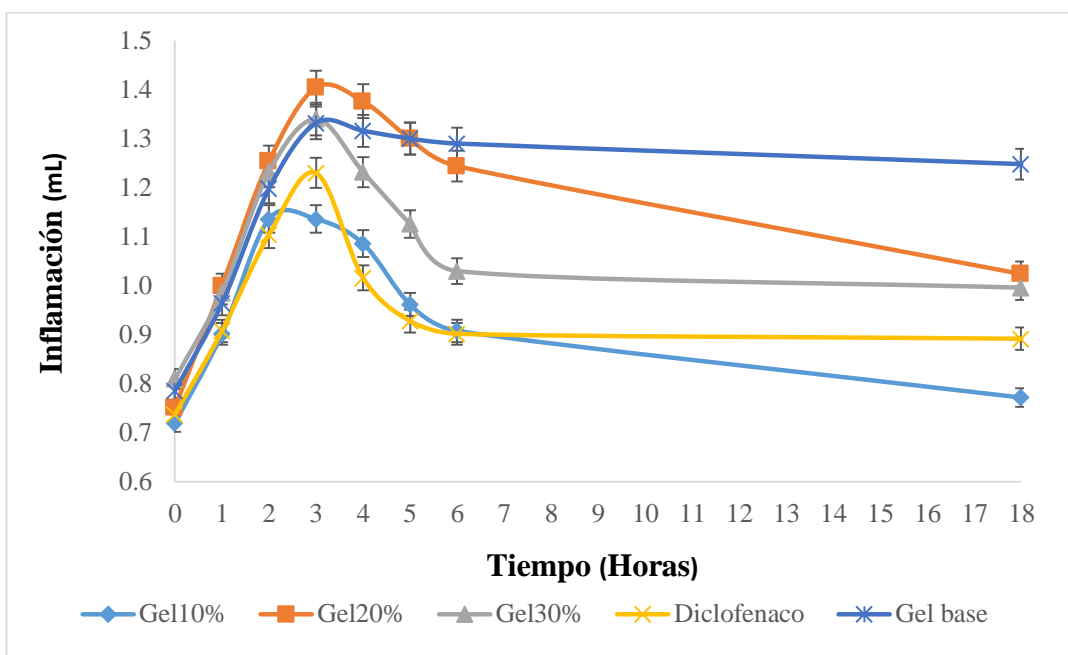
Tabla 14. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los geles (n=5)

Descripción	Tiempo (H)	Gel 10 %	Gel 20 %	Gel 30 %	Diclofenaco	Gel base
		Promedio (mL) ± S	Promedio (mL) ± S	Promedio (mL) ± S	Promedio (mL) ± S	Promedio (mL) ± S
Basal	0:00	0.720 ± 0.055	0.752 ± 0.018	0.810 ± 0.058	0.738 ± 0.019	0.786 ± 0.021
Producción de la inflamación	1:00	0.902 ± 0.129	1.000 ± 0.123	0.986 ± 0.123	0.908 ± 0.043	0.964 ± 0.057
	2:00	1.032 ± 0.108	1.254 ± 0.154	1.232 ± 0.250	1.104 ± 0.067	1.198 ± 0.158
Aplicación del gel	3:00	1.136 ± 0.101	1.404 ± 0.160	1.340 ± 0.184	1.230 ± 0.059	1.332 ± 0.186
Post Aplicación del gel	4:00	1.086 ± 0.111	1.376 ± 0.161	1.232 ± 0.223	1.016 ± 0.172	1.316 ± 0.179
	5:00	0.962 ± 0.110	1.300 ± 0.178	1.126 ± 0.216	0.928 ± 0.158	1.300 ± 0.179
	6:00	0.908 ± 0.115	1.244 ± 0.151	1.030 ± 0.190	0.902 ± 0.041	1.290 ± 0.177
	18:00	0.772 ± 0.083	1.024 ± 0.131	0.996 ± 0.104	0.892 ± 0.143	1.248 ± 0.162

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 12 se observa la actividad antiinflamatoria del gel al 10%,20%, 30% y diclofenaco donde se observa que disminuyen la inflamación producida por carragenina y un grupo que no recibió tratamiento alguno ya que solo se le aplico gel base.

Figura 12. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de geles (n=5)



Fuente: Elaboración propia

Para poder evaluar el efecto antiinflamatorio se procedió a expresar en porcentaje la inflamación tomando como un 100 % la inflamación máxima producida a las 3 horas de la aplicación de la carragenina al 1 %.

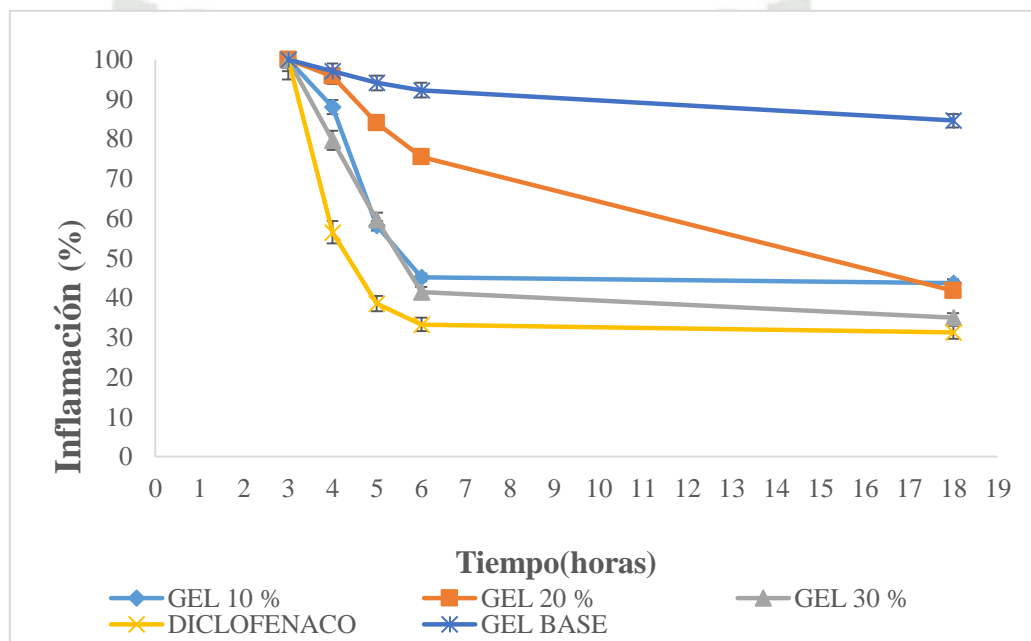
Tabla 15. Actividad antiinflamatoria en forma porcentual (n=5)

	Tiempo (H)	Gel 10 %	Gel 20 %	Gel 30 %	Diclofenaco	Gel base
Inflamación máxima	03:00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
Inflamación después de la aplicación del gel	04:00	87.98	95.71	79.62	56.50	97.07
	05:00	58.17	84.05	59.62	38.62	94.14
	06:00	45.19	75.46	41.51	33.33	92.31
	18:00	43.75	41.72	35.09	31.30	84.62

Fuente: Elaboración propia

En la figura13 se puede observar los resultados obtenidos en la tabla 15 donde se reporta la actividad antiinflamatoria de los geles de 10 %, 20 % y 30% logrando disminuir la inflamación hasta un 43.75 %, 41.72 % y 35.09 % respectivamente del 100 % de inflamación máxima producida por la carragenina al 1%. Siendo el gel al 30 % el que logro mayor actividad antiinflamatoria y el que se asemeja a los resultados obtenidos por el diclofenaco al 1 %.

Figura 13. Actividad antiinflamatoria (n=5)



Fuente: Elaboración propia

Por otro lado, en la Tabla 16 se muestra la expresión del porcentaje de disminución de la inflamación, donde se aprecia que el gel del 10 %, 20 % y 30% logran resultados 56.25 %, 58.28 % y 64.91 % respectivamente y el gel de diclofenaco da como resultado 68.70 % esto indica que no hay diferencia significativa entre geles en el efecto antiinflamatorio.

El porcentaje de desinflamación se calculó de la siguiente manera:

$$DI = 100 - \% \text{INFLAMACION}$$

Tabla 16. Porcentaje de disminución de la inflamación (n=4)

Disminución de la inflamación (%)					
(100- % inflamación)					
	Gel 10%	Gel 20%	Gel 30%	Gel de diclofenaco	Gel base
Final de tratamiento	56.25	58.28	64.91	68.70	15.38

Fuente. Elaboración propia

Para poder comparar los resultados obtenidos se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, para desarrollar este análisis estadístico se utilizaron los datos evaluados obtenidos al final del tratamiento de cada grupo, por lo cual se tiene cinco datos por grupo, debido a que se trataron cinco animales de experimentación en cada uno de ellos estos datos se pueden observar en la Tabla 17.

Tabla 17. Actividad antiinflamatoria al final del tratamiento (n=5)

Ratas	Gel 10 %	Gel 20 %	Gel 30 %	Diclofenaco	Gel base
1	42.44	26.95	38.00	21.00	82.76
2	48.80	50.00	27.00	30.00	86.90
3	44.10	42.62	34.18	36.10	86.59
4	41.30	48.00	40.40	34.70	82.76
5	42.10	41.18	35.85	34.69	84.09
Promedio	43.75	41.75	35.09	31.30	84.62

Fuente: Elaboración propia

Los resultados del análisis de varianza se muestran en la Tabla 18 donde se observa que el valor de F experimental fue de 72.26 el cual es mayor a valor de tablas de 2.87 por lo cual se concluye que al menos un grupo es diferente al 95 % de confianza.

Tabla 18. Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	P	Valor crítico para f
Entre grupos	9206.73	4	2301.68	72.26	1.3×10^{-11}	2.87
Dentro de los grupos	637.01	20	31.85			
Total	9843.75	24				

Fuente: Elaboración propia

Para demostrar que grupos son iguales o diferentes se procedió a desarrollar un test de Tukey cuyos resultados se muestran en la Tabla 19 donde se puede observar que el grupo del gel base difiere de todos los demás grupos, sin embargo, no hay diferencia significativa entre los geles ya que según Tukey todos presentan resultados similares o aproximados.

Por otro lado, no hay diferencia significativa entre los geles al 20 % y 30 % y los resultados obtenidos con el diclofenaco 1%.

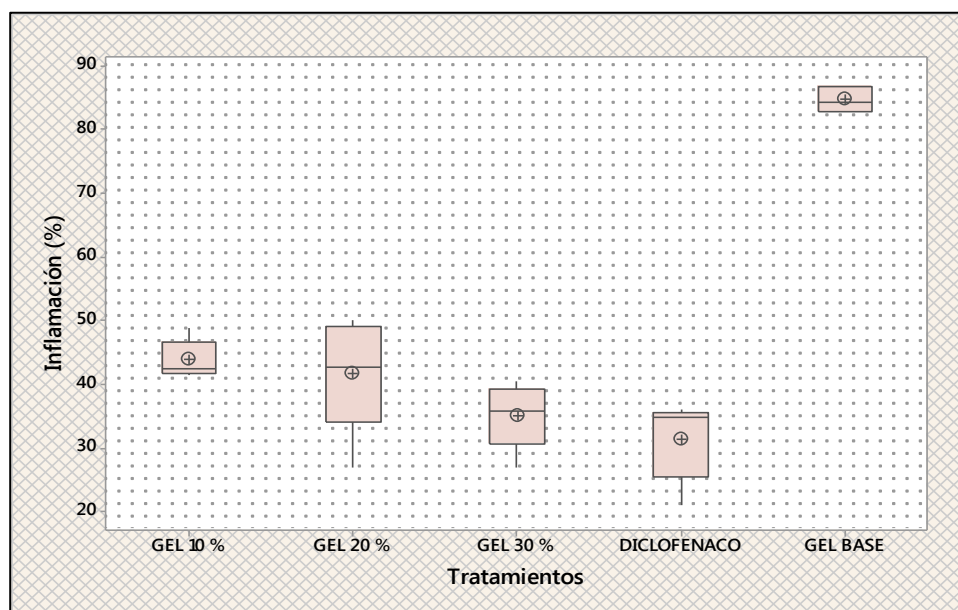
Tabla 19. Test de Tukey

Factor	N	Promedio	Agrupación
Gel base	5	84.62	A
Gel 10 %	5	43.75	B
Gel 20 %	5	41.75	B C
Gel 30 %	5	35.09	B C
Diclofenaco	5	31.30	C

Fuente: Elaboración propia

En la Figura 14 se puede observar el diagrama de caja de bigotes del grupo de tratamiento donde se puede observar que entre los geles de 20 %, 30% y diclofenaco no hay diferencia significativa.

Figura 14. Comparación de geles de 10%, 20%, 30%, diclofenaco y gel base



Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a los resultados obtenidos los geles no difieren entre sí. Por otro lado, los geles conteniendo 20 % y 30 % de extracto con etanol al 70 % de *Mentha spicata* L. “Hierba buena” demostraron que pueden brindar un efecto antiinflamatorio similar al obtenido por el diclofenaco al 1 % lo que demuestra su alta eficacia disminuyendo la inflamación.

Esto puede deberse a la cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos presentes en las distintas formulaciones de geles. Estudios anteriores informaron que varias especies de *Menthas*, poseían ácido rosmarínico, ácido oleanólico y ácido ursólico conocidos también como compuestos fenólicos con propiedades de inhibir los radicales libres, inhibidor de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad y propiedades antiinflamatorias^{47,48,49}.

Así también otros estudios anteriores relacionaron estos compuestos con la actividad antiinflamatoria ^{50,51,52}.

El extracto alcohólico de *Mentha aquatica* mostró actividad antiinflamatoria tópica en la reducción del edema de oído inducido por aceite de crotón en ratones. Otro método por el cual también se puede medir la inflamación en ratas ⁵³.

No obstante, otro estudio demostró que el orégano contiene ácido rosmarínico, ácido oleanólico y ácido ursólico, los cuales serían los responsables de la actividad antioxidante y acción antiinflamatoria atribuida a esta especie perteneciente a la familia de las mentas (Lamiaceae) ¹⁰. Toda esta información confirma que los flavonoides y taninos, que son ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son reconocidos como importantes compuestos para la salud humana ⁵⁴ y además agentes antioxidantes. Estos metabolitos secundarios actuarían eliminando radicales libres mediante la donación de hidrógeno y agentes que evitan oxidación de lipoproteínas de baja densidad. Numerosos beneficios de salud han sido reportados para flavonoides, incluida la prevención de enfermedades del corazón, antiartrítica, anticancerosa, actividades antihipertensivas, antiinflamatorias y antivirales ^{55, 56, 57, 58, 59,60}.

SUGERENCIAS

Después de realizar el presente trabajo y habiendo surgido una variedad de temas de investigación, nos permitimos hacer las siguientes sugerencias:

1. Sugerimos la cuantificación de compuestos fenólicos para estudios posteriores de la *Mentha spicata* L. “Hierba buena”.
2. En base ya a los estudios realizados sobre la *Mentha spicata* L. “Hierba buena” es necesario realizar una investigación profunda acerca de su toxicidad tóxica.
3. Sugerimos continuar con la investigación de la planta *Mentha spicata* L. “Hierba buena” ya que puede presentar aún más propiedades farmacológicas beneficiosas para el tratamiento de las enfermedades.
4. Sugerimos realizar estudios reológicos del gel de *Mentha spicata* L. “Hierba buena”
5. Sugerimos realizar el análisis fisicoquímico y la estabilidad de la forma farmacéutica (gel)



CONCLUSIONES

1. Se logró preparar extractos con etanol al 70 % de *Menta spicata L.*” Hierba buena” por el método de Soxhlet y maceración obteniendo rendimientos de 21.09 % y 32.60 % respectivamente.
2. Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos por Soxhlet y macerado en la etapa piloto lográndose disminuir la inflamación hasta un 59.57 % y 93.91 % respectivamente, siendo el macerado el que obtiene mayor efecto antiinflamatorio.
3. Se lograron identificar taninos y flavonoides en ambos extractos obteniéndose mayor cantidad de bandas en el extracto obtenido por maceración.
4. Se logró evaluar la actividad antiinflamatoria de los geles a base del extracto con etanol al 70 % por el método de maceración obteniéndose como resultado la disminución de la inflamación hasta un 56.25 %, 58.28 % y 64.91 % para los geles de 10 %, 20 % y 30 % respectivamente. No se encontró diferencia significativa entre geles.
5. Los geles del 20 % y 30 % lograron resultados similares a los obtenido con el diclofenaco de 68.70 % no encontrándose diferencia significativa según el test de Tukey.

BIBLIOGRAFIA

1. Ajazuddin S. Legal regulations of complementary and alternative medicines in different countries. *Pharmacogn Rev.* 2012 p.154–160.
2. Organización Mundial de la salud. Estrategia de la oms sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra:OMS:2008. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/19789243506098_spa.pdf
3. Skalli S, Jordan S. Herbal and Traditional Medicines, Now and Future. In: Edwards IR, Lindquist M. editors. *Pharmacovigilance* 2016 p. 145–159.
4. Brack Egg A. diccionario enciclopedico de plantas utiles del Peru – programa de naciones unidas para el desarrollo , centro Bartolome de las casas, cusco. 1999 p. 550
5. Fundación Española De Nutrición (FEN). Mercado de los alimentos: *Mentha spicata*. Consultado 1 nov. 2015. Disponible en: <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/menta.pdf>
6. Resquín G, Degen R, Delmás G, Macchi G. Las especies de *Mentha L.* Cultivadas en Paraguay. *Rojasiana* 2011;10 (1): 77-91.
7. Villar M, Villavicencio O. Manual de Fitoterapia. Lima: EsSalud. OPS-OMS. 2001. Pág 192-194, 372.
8. Roersch. Plantas Medicinales en el Sur Andino del Perú. Publicaciones del Centro de medicina Andina. 1994. Perú. Pág 557-561
9. Caceres A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 1995. Editorial Universitaria. Guatemala. pp. 211-212.
10. Diandian S. Development of anti-inflammatory agents from the aromatic plants, *origanum spp.* And *mentha spp.*, and analytical methods on the quality control of bioactive phenolic compounds [For Graduate Program in Medicinal Chemistry] New Brunswick, New Jersey: The State University of New Jersey.2008

11. Choudhury RP, Kumar A and Garg AN. Analysis of Indian mint (*Mentha spicata*) of essential, trace and toxic elements and its antioxidant behaviour. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2006; 41:825-832
12. Yamamura S, Ozawa K, Ohatani K, Kasai R and Yamasaki K. Antihistaminic flavones and aliphatic glycosides from *Mentha spicata*. *Phytochemistry* 1998; 48:131-136.
13. Kanatt SR, Chander R and Sharma A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. *Food Chem* 2007; 100:451-458.
14. Tognolini M, *et al.* Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety Protective effects of *M. spicata* on 4-NQO induced chromosome damage 851 as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci* 2006; 78:1419- 1432
15. Manosroi J, Dhumtanom P and Manosroi A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett* 2006; 235:14- 120
16. Saleem M, Alam A and Sultana S. Attenuation of benzoyl peroxide-mediated cutaneous oxidative stress and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of mice with spearmint (*Mentha spicata*). *Food Chem Toxicol* 2000; 38:939-948
17. Kumar A and Chattopadhyay S. DNA damage protecting activity and antioxidant potential of pudina extract. *Food Chem* 2007; 100:1377-1384.
18. Yu T, Xu M and Dashwood RH. Antimutagenic activity of Spearmint. *Environ Mol Mutagen* 2004; 44:387-393.
19. Arumugam P, Ramamurthy P, Santhiya ST and Ramesh A. Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn. Ananalysis by ABTS. + decolorization assay. *Asia Pacif J Clin Nutr* 2006; 15:20-24.
20. Mostacero J, Castillo F, Mejía F, Gamarra O, Charcape J, Ramírez R. *Plantas Medicinales del Perú: Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica*. Trujillo-Perú; 2011.

21. Brahmi F, Hauchard D, Guendouze N, Madani K, Kiendrebeogo M, Kamagaju, et al. Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian Mentha species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products* 2015; 74 (1): 722-730.
22. Cerón C. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Rev. Bot. Ec. Andes Centrales*. 2006;30: 285 – 293
23. Pérez G, Velázquez C. “Huerto Urbano Sostenible”. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. Jesus Flórez, 2010. Tratamiento farmacológico del dolor
24. Kuklinski C. “Farmacognosia Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural” Edición omega S.A. 2000.
25. Garcia P. “inflamación”. real academia de ciencias exactas, físicas y naturales. Departamento de cirugía, Facultad de medicina, Universidad Complutense. Hospital general universidad Gregorio Marañón. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)* Vol. 102, Nº. 1, pp 91-159, 2008
26. Vega G. Inmunología para el médico general “Inflamación” Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. *Rev Fac Med UNAM* Vol. 51 No. 5 septiembre-octubre, 2008. <http://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un085k.pdf>
27. Tucker C. “Inflamación aguda y crónica”cap.3 pag 53-67. <file:///F:/TESIS%20DE%20FARMACIA/inflamacion%20paper%20tucker%20collins.pdf>.
28. Valencia P. Serrano C. “Inflamación Y Reparación Tisular” cap.5 pag.48-58. file:///C:/Users/alum_bvcs/Downloads/Valencia_Patologia_1a_cap_muestra_05_INFLAMACION_Y_REPARACION_TISULAR.pdf
29. León M. *et al.* “Respuesta inflamatoria aguda, consideraciones bioquímicas y celulares” Universidad de Ciencias Médicas, Cienfuegos, Cienfuegos, Cuba, CP: 55100. *Rev. Fac Med UCMC* Vol. 5 marzo 2015. <http://scielo.sld.cu/pdf/rf/v5n1/rf06105.pdf>

30. Gutiérrez R. Farmacoterapeutica 1ra edición. Arequipa; 2012.
31. Serra H, Roganovich J, Rizzo L. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional. de lo molecular al uso clínico. Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Católica Argentina. artículo especial de Medicina vol.72 no.2 Ciudad Autónoma de Buenos Aires mar./abr. 2012. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002576802012000200015&lng=es&t
32. Aragadvay S. Elaboración y Control de calidad de tintura y gel cicatrizante y antiinflamatorio abasae de chilca (*bacharis latifolia*) y hierbamora (*solanum nigrum*). [para optar el título de bioquímico farmacéutico]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2009.
33. Vila J. “TECNOLOGIA FARMACEUTICA” 1^{ra} Edición 2000, Editorial Síntesis S.A.
34. Cruz A. Elaboración y Control de calidad de gel antimicótico de Manzanilla, Matico y Marco para Neo-Fármaco. [para optar el título de bioquímico farmacéutico]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2009.
35. Castro L, Moran M. Farmacia propuesta de una formulación de alcohol gel y su respectivo procedimiento de registro [Tesis para optar el Grado de Licenciatura en Química y Farmacia]. San Salvador: Universidad de El Salvador 2011.
36. Lamarque A, *et al.* Fundamento teórico práctico de química orgánica. 1^{ra} edición, editorial Encuentro. Cordova- Argentina, 2008. Pag 51
37. Flores S, Farmacia galénica. Madrid, Selsa, 1992
38. Abbott D., Andrews R. Introducción a la Cromatografía. 3^a edición, Madrid, 1970.
39. Gómez H, González K, Medina J. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 10, núm. 3, mayo, 2011, pp. 182-217 Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile.
40. Vega R, Lagarto A. Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto de *Piper auritum* H.B.K. y toxicidad aguda oral. Rev Cubana Plant Med 1999.

41. Anwa f, Hussain A, Shahid M, Ashraf M, Przybylski R. Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of Spearmint (*Mentha spicata L.*) From Pakistan; 2010.
42. Mandana B. *et al.* Comparación de diferentes métodos de extracción para la extracción de principales compuestos flavonoides bioactivos de hierba buena (*mentha spicata l.*) Hojas.[<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.002>]. food and bioproducts processing; January 2011; volume 89, issue 1, , pages 67-72.Disponible en : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308510000325>
43. Voigt R, Tratado de tecnología Farmacéutica. España: Acriba, 1982.
44. Mamani E.” Estabilidad oxidativa y microbiológica de un embutido cocido de vísceras rojas de *cavia porcellus* con extracto etanólico de *mentha spicata* “[Tesis para optar el Título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina ;2016
45. Brahmi F, Madani K, dahmoune F, Rahmani T. Bousbaa K. Oukmanou S, Chibane M. Optimisation Of Solvent Extraction of Antioxidants (Phenolic Compounds) From Algerian Mint (*Mentha spicata L.*). Pharmacognosy Communications 2012;2 (1): 73-75.
46. Chávez J, Sucari F. “Estudio del efecto antiespasmolítico del extracto de *minthostachys molis* (muña) y *senecio nutans* (chachacoma) en íleon aislado de *rattus norvegicus* “[Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica Santa María; 2008.
47. Peterson M, Simmonds M. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003, 62, 121-12
48. Karasawa D, Shimizu S. Triterpene acids in callus tissues form *Mentha arvensis* var. *piperasecens* Mal. *Agric. Biol. Chem.* 1980, 44, 1203-1205.
49. Perva A, Stangler S, Hadolin M, Knez Z. Isolation of active components of Lamiaceae. 1. Zbornik Referatov s Posvetovanja Slovenski Kemijski Dnevi, Maribor, Slovenia 2001, 856c/1-856c/7

50. Nakamura Y, Ohto Y, Murakami A, Ohigashi H. Superoxide scavenging activity of rosmarinic acid from *Perilla frutescens* Britton Var. *Acuta* F. *viridis*. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4545–4550
51. Fuhrman B, Volkova N, Rosenblat M, Aviram M. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnolic acid, or garlic acid. *Antioxid. Redox Signal.* 2000, 2, 491–506
52. Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2002, 449, 261-267
53. Conforti F. *et al.* In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J. Ethnopharmacol.* 2008, 116, 144-151.
54. Merken H, Beecher G. Analysis of flavonoids in botanical: a review. In *Quality management of nutraceuticals*; Ho, C. T. Zheng, Q. Y., eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 2002; 21-41.
55. Arpentine G, Fernandez Y, Bourzeix M, Mitjavila S. Relation between the structure of a series of procyanidins and their radical superoxide scavenger capacity. *Process Group Polyphenols* 1992, 16, 237-240.
56. Frankel E, Waterhouse A, Kinsella J. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 1993, 341, 1103-1104
57. Khokhar S, Venema D, Hollman P, Dekker M, Jongen W. A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Lett.* 1997, 114, 171-172
58. Terencio M, Sanz M, Paya M. Antihypertensive action of a procyanidin glycoside from *Rhamnus lycioides*. *J. Ethnopharmacol.* 1991, 31, 109-114.
59. Meunier M, Villie F, Jonadet M, Bastide J, Bastide P. Inhibition of angiotensin I converting enzyme by flavanolic compounds: in-vitro and in-vivo studies. *Planta Med.* 1987, 53, 12-15

60. Kuo S. M. Dietary flavonoid and cancer prevention: evidence and potential mechanism. *Oncogenesis* 1997, 8, 47-69.





ANEXO N°1

IDENTIFICACION DE LA *Mentha spicata* L.



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



CONSTANCIA Nro.27-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas traídas al laboratorio por Quispe Humpiri Lizeth, con DNI 72 535563, Condori Cruz Gilma Rosana con DNI 46251313 identificada con para la ejecución de su trabajo de investigación: “Determinación del efecto antiinflamatorio de un gel tópico a base de las hojas de “hierbabuena” en ratas con inflamación inducida experimentalmente”, de la Facultad de farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica Santa María. La muestra traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, procedente de la campaña de Arequipa y corresponde a la especie, *Mentha x spicata* L. (*Sinonimo de Mentha viridis* L.)

Ubicación Taxonómica

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales


Familia: Lamiaceae

Genero: *Mentha* L.

Especie: *Mentha spicata* L.

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

Arequipa 27 de Marzo del 2017


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR

Herbarium Arequipense (HUSA)

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



ANEXO 2

TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA PILOTO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR EL METODO DE SOXHLET

MÉTODO	SOLVENTE	RATAS	TIEMPO (H)							
			Basal (mL)	1	2	3 Aplicación del extracto	4	5	6	18
SOXHLET	Éter de petróleo	1	0.82	1.42	1.49	1.55	1.48	1.42	1.35	1.3
		2	0.84	1.20	1.22	1.32	1.27	1.21	1.14	1.1
		3	0.81	1.29	1.35	1.43	1.46	1.31	1.38	1.20
		4	0.85	1.36	1.43	1.48	1.29	1.32	1.12	1.21
	cloroformo	1	0.85	1.22	1.24	1.43	1.36	1.32	1.3	1.28
		2	0.77	1.1	1.02	1.14	1.13	1.1	1.06	1.03
		3	0.79	1.19	1.21	1.28	1.25	1.2	1.19	1.16
		4	0.84	1.13	1.26	1.31	1.26	1.21	1.18	1.18
	Etanol al 70 %	1	0.82	0.92	0.95	0.99	0.91	0.89	0.85	0.83
		2	0.81	0.98	1.01	1.06	1.03	0.98	0.96	0.93
		3	0.79	0.96	0.99	1.05	0.98	0.95	0.91	0.89
		4	0.75	0.90	0.94	0.98	0.96	0.92	0.90	0.88

ANEXO 3

TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA PILOTO DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS POR EL METODO DE MACERACIÓN

MÉTODO	SOLVENTE	RATAS	TIEMPO (H)							
			basal (mL)	1	2	3 Aplicación del extracto	4	5	6	18
MACERACIÓN	Etanol al 70%	1	0.77	1.02	1.06	1.18	0.98	0.9	0.83	0.79
		2	0.75	1.09	1.26	1.49	1.28	1.08	0.84	0.8
		3	0.76	1.06	1.12	1.29	1.11	0.96	0.85	0.81
		4	0.78	1.05	1.19	1.39	1.16	1.03	0.82	0.78

ANEXO 4

PORCENTAJE DE RENDIMIENTO OBTENIDO EN LA EXTRACCIÓN POR EL METODO DE SOXHLET Y MACERACION

MÉTODO DE EXTRACCIÓN	SOLVENTE	PESO DE LA MUESTRA (g.)	CANTIDAD DE SOLVENTE (mL)	PESO DEL EXTRACTO BLANDO (g.)			PORCENTAJE DE RENDIMIENTO (%)		
				1	2	3	1	2	3
SOXHLET	Etanol al 70 %	10	150	2.06	1.94	2.32	20.66	19.40	23.20
	Cloroformo	10	150	0.78	0.94	1.02	7.80	9.40	10.20
	Éter de petróleo	10	150	0.28	0.18	0.23	2.80	1.80	2.30
MACERACION	Etanol al 70 %	6	150	1.89	2.04	1.94	31.50	34.00	32.30

ANEXO 5

COMPUESTOS UTILIZADOS EN LA FORMULACIÓN DEL LOS GELES

COMPONENTES	GEL BASE	GEL 10%	GEL 20%	GEL30%
EXTRACTO	0	10	20	30
CARBOPOL940	1 g	1 g	1 g	1 g
PROPILENGLICOL	10 g	10 g	10 g	10 g
METILPARABENO	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
TRJETANOLAMINA c.s.p. pH 6.5	1-2 gotas	1-2 gotas	1-2 gotas	1-2 gotas
AGUA DESTILADA c.s.p	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

ANEXO 6

**TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL
DEL GEL 10%**

GEL	RATAS	BASAL	TIEMPO (H)								
			1	2	3	4	5	6	18		
10 %	1	0.63	Aplicación de la carragenina	0.73	0.87	1.04	Aplicación del gel	0.96	0.8	0.72	0.7
	2	0.73		0.83	1	1.07		0.99	0.95	0.91	0.68
	3	0.74		1.05	1.09	1.13		1.2	1.11	1.02	0.87
	4	0.78		1	1.16	1.3		1.19	0.99	0.98	0.84
	5	0.72		0.9	1.04	1.14		1.09	0.96	0.91	0.77

ANEXO 7

TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL DEL GEL 20 %

GEL	RATAS	BASAL		TIEMPO (H)						
				1	2	3	4	5	6	18
20%	1	0.77	Aplicación de la carragenina	0.85	1.01	1.15	1.12	1.04	1.01	0.81
	2	0.74		1.19	1.42	1.58	1.55	1.5	1.4	1.16
	3	0.77		0.99	1.24	1.38	1.36	1.23	1.22	1.03
	4	0.73		0.96	1.34	1.48	1.46	1.42	1.35	1.09
	5	0.75		1.01	1.26	1.43	1.39	1.31	1.24	1.03

ANEXO 8

**TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL
DEL GEL 30%**

GEL	RATAS	BASAL		TIEMPO (H)							
				1	2	3	4	5	6	18	
30%	1	0.73	Aplicación de la carragenina	Aplicación del gel	0.89	0.99	1.17	0.96	0.86	0.86	0.99
	2	0.87			0.97	1.26	1.28	1.18	1.01	0.87	0.84
	3	0.86			1.19	1.63	1.65	1.58	1.44	1.33	1.13
	4	0.78			0.89	1.05	1.26	1.21	1.19	1.05	1.02
	5	0.81			0.99	1.23	1.34	1.23	1.13	1.04	1

ANEXO 9

TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL DEL GEL DE DICLOFENACO

GEL	RATAS	BASAL	TIEMPO (H)								
			1	2	3	4	5	6	18		
DICLOFENACO	1	0.71	Aplicación de la carragenina	0.96	1.07	1.25	Aplicación del gel	0.88	0.76	0.87	0.76
	2	0.73		0.94	1.01	1.13		0.81	0.78	0.85	0.74
	3	0.76		0.87	1.18	1.28		1.19	1.09	0.95	1.02
	4	0.75		0.86	1.15	1.26		1.18	1.08	0.93	1.05
	5	0.74		0.91	1.11	1.23		1.02	0.93	0.91	0.89

ANEXO 10

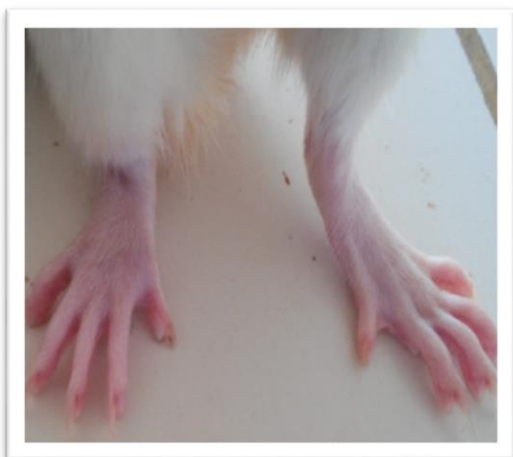
**TABLA DE RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS VOLÚMENES DEL EDEMA PLANTAR DE LA ETAPA EXPERIMENTAL
DEL GEL BASE**

GEL	RATAS	BASAL		TIEMPO (H)							
				1	2	3		4	5	6	18
GEL BASE	1	0.79	Aplicación de carragenina	0.89	1	1.08	Aplicación del gel	1.07	1.05	1.04	1.03
	2	0.77		1.02	1.25	1.37		1.35	1.33	1.32	1.28
	3	0.76		0.98	1.41	1.58		1.55	1.53	1.52	1.47
	4	0.81		1.01	1.24	1.39		1.38	1.37	1.35	1.29
	5	0.8		0.92	1.09	1.24		1.23	1.22	1.22	1.17

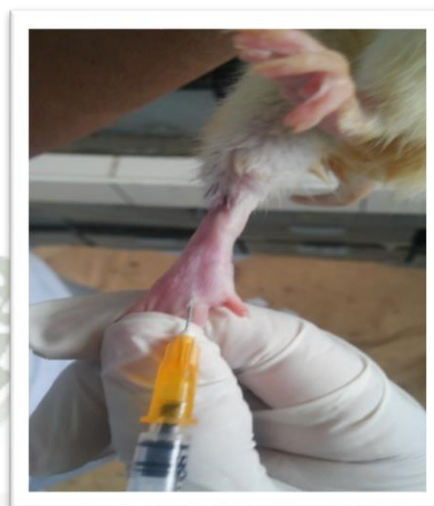
ANEXO 11

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA EN LA ETAPA EXPERIMENTAL

Resultados al aplicar los geles a las ratas Holtzman machos (evidencia fotográfica)



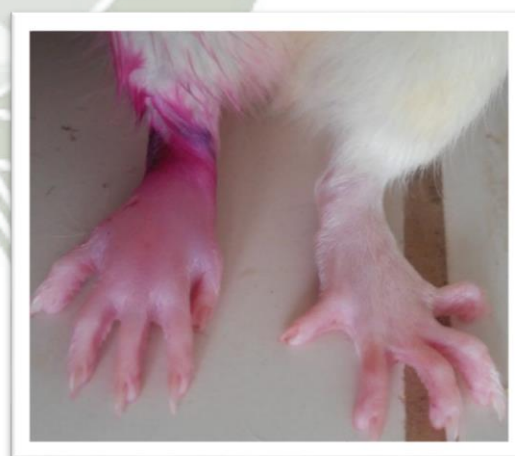
1.-Medición basal



2.-Aplicación de la carragenina al
1%



3.- Luego de producirse la
inflamación máxima (3horas
después de la carragenina)



4.- Desinflamación progresiva de la
pata de rata

ANEXO 12

EVIDENCIA FOTOGRAFICA PARA LA ELABORACION DEL GEL AL 10%,20% Y 30%

