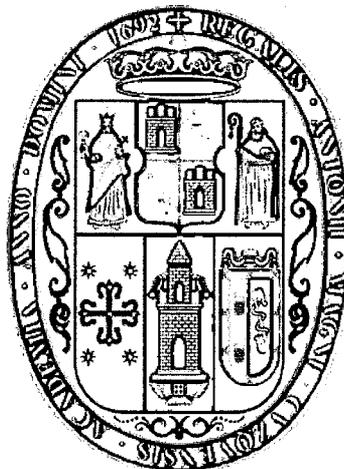


# UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS,  
MATEMÁTICAS, FARMACIA E INFORMÁTICA

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**EFEECTO ANALGÉSICO IN VIVO Y ESPASMOLÍTICO EX VIVO DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (UCHUY  
PAPA) EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

TESIS PRESENTADA POR:  
Br. GILDA LEONOR LÓPEZ ALIAGA OROSCO

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESORA:  
MCs. MAGALY VILLENA TEJADA

CO-ASESORES:  
Q.F. INGRID VERA FERCHAU  
PhD. JOSE A. VILLANUEVA SALAS

CUSCO – PERÚ  
2011

## **DEDICADO A**

*A Dios mi creador por darme  
la dicha de vivir, disfrutar de  
su creación y darme la  
ciencia como instrumento  
para poder administrarla.*

*A mis amados padres, Esther (Q.D.D.G)  
y Alfredo (Q.D.D.G) quienes pusieron  
las bases en mi vida para continuar  
aun en medio de las adversidades y  
tener la satisfacción de llegar a la meta.*

*A mi querida hermana Esther por  
brindarme su apoyo incondicional,  
su paciencia y compañía durante la  
realización del presente trabajo.*

*A mis sobrinas Daniela y Andrea  
por darme alegría en los momentos  
que lo necesitaba.*

*Con mucho cariño a un amigo muy  
especial quien me hizo ver la vida  
de otra manera y me enseñó a vivir  
con alegría, un día a la vez .....*

*A todas las personas, amigas y amigos  
que me apoyaron y confiaron en mí  
durante mi formación profesional  
y personal.*

**Gilda**

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por brindarme facilidades en el uso de los laboratorios de Farmacognosia y Farmacología.
- A la Universidad Católica Santa María de Arequipa por brindarme facilidades en el uso de su laboratorio de Farmacología.
- A la **MCs. Magaly Villena Tejada**, mi asesora, quien me supo guiar en forma integral durante el desarrollo de la presente investigación.
- A la **Q.F. Ingrid Vera Ferchau**, mi co-asesora por su apoyo y consejos durante el desarrollo de la presente investigación.
- Al PhD. José A. Villanueva Salas por su apoyo en cuanto a laboratorio, equipos y conocimientos.
- María Elena, por su amistad, su paciencia y apoyo durante la ejecución del presente trabajo.
- Sr. Justo Ayta por su colaboración con el manejo de animales experimentales.
- A todas las personas, amigos y amigas que creyeron en mí y contribuyeron durante el desarrollo de la presente investigación.

**La autora**

## **ABREVIATURAS**

ACh	: Acetilcolina
AINEs	: Analgésicos antiinflamatorios no estroideos
COX	: Ciclooxygenasa, familia de enzimas que produce prostaglandinas.
PG	: Prostaglandinas
SNC	: Sistema nervioso central
CV	: Cardiovascular
OS	: Sistema ocular
GI	: Gastrointestinal
GU	: Genitourinario
ASA	: Acido acetil salicílico
AEC	: Actividad eléctrica de control
AER	: Actividad eléctrica de respuesta
SNP	: Sistema nervioso parasimpático
SNS	: Sistema nervioso simpático
SNE	: Sistema nervioso entérico
SNA	: Sistema nervioso autónomo
SSF	: Solución salina fisiológica

# ÍNDICE

Pág.

INTRODUCCIÓN  
RESUMEN  
SUMMARY

## CAPÍTULO I: GENERALIDADES

1

1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Objetivos	2
1.3.1 Objetivos generales	2
1.3.2 Objetivos específicos	2
1.4 Justificación del estudio	3
1.5 Hipótesis	3

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

4

2.1 Antecedentes	4
2.1.1 Antecedentes etnobotánicas	4
2.1.2 Antecedentes sobre efecto analgésico	6
2.1.3 Antecedentes sobre efecto espasmolítico	7
2.2 Bases teórico científicas	10
2.2.1 Aspectos botánicos de la especie en estudio	10
2.2.1.1 Identificación taxonómica	10
2.2.1.2 Descripción botánica	10
2.2.1.3 Hábitat y distribución	11
2.2.1.4 Parte utilizada	12
2.2.1.5 Principales constituyentes fitoquímicos	12
2.2.2 Consideraciones generales del dolor	12
2.2.2.1 Dolor	12
2.2.2.2 Tipos de dolor	12
2.2.2.3 Vías del dolor	13
2.2.3 Fármaco patrón analgésico: Indometacina	15
2.2.3.1 Fórmula química	15
2.2.3.2 Farmacocinética	15
2.2.3.3 Farmacodinamia	16
2.2.3.3 Efectos adversos	16
2.2.3.4 Interacciones	17
2.2.3.5 Precauciones	17
2.2.3.6 Contraindicaciones	17

2.2.4 Inductor algésico: ácido acético al 3%	18
2.2.4.1 Fórmula química	18
2.2.4.2 Aplicaciones y usos	18
2.2.4.3 Seguridad	19
2.2.4.4 Riesgo	19
2.2.5 Consideraciones generales del sistema digestivo de animales de experimentación	20
2.2.5.1 Descripción	20
2.2.5.2 Intestino delgado	21
2.2.5.3 Intestino largo	21
2.2.6 Vías de administración en animales de experimentación	22
2.2.6.1 Vía oral	22
2.2.6.2 Vía intraperitoneal	22
2.2.6.3 Vía intravenosa	22
2.2.7 Fármaco patrón espasmolítico: Atropina	23
2.2.7.1 Fórmula química	23
2.2.7.2 Mecanismo de acción	23
2.2.7.3 Farmacocinética	23
2.2.7.4 Efectos adversos	23
2.2.7.5 Interacciones	24
2.2.7.6 Contraindicaciones	24
2.2.8. Inductor espasmógeno: Acetilcolina	24
2.2.8.1 Fórmula química	24
2.2.8.2 Metabolismo	24
2.2.8.3 Síntesis	25
2.2.8.4 Eliminación	25
2.2.8.5 Agonista y antagonista	25
2.2.8.6 Propiedades	25
2.2.8.7 Enfermedades relacionadas	26
2.2.9 Sistema de neurotransmisión colinérgica	27
2.2.9.1 Receptores nicotínicos	27
2.2.9.2 Receptores muscarínicos	28
2.2.10 Equipo de órgano aislado	29
2.2.10.1 Baño de órgano	29
2.2.10.2 Ventajas de la utilización del órgano aislado	32
2.2.10.3 Inconvenientes de la utilización de un órgano aislado	33
2.2.10.4 Sistema PowerLab	33
2.2.11 Definición de términos básicos	34

## **CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS**

**35**

<b>3.1 Materiales</b>	<b>35</b>
3.1.1 Materiales biológicos	35
3.1.2 Materiales de laboratorio	35
3.1.3 Reactivos	36
3.1.4 Fármacos patrón	36
3.1.5 Inductores	36
3.1.6 Equipos e instrumentos	36
3.1.7 Materiales de campo	37
3.1.8 Materiales de gabinete	37
3.1.9 Otros	37
3.1.10 Lugar de ejecución del trabajo de tesis	37
<b>3.2 Diseño metodológico</b>	<b>38</b>
3.2.1 Tipo de estudio	38
3.2.2 Variables	40
3.2.2.1 Variables implicadas	40
3.2.2.1.1 Variable independiente	40
3.2.2.1.2 Variable dependiente	40
3.2.2.2 Variables no implicadas	42
3.2.2.2.1 Variables intervinientes	42
A. De la muestra vegetal	42
B. De la extracción	42
C. De los animales de experimentación	43
D. Del ambiente	43
3.2.2.2.2 Variables subjetivas	43
<b>3.3 Criterios de selección</b>	<b>43</b>
3.3.1 De la muestra vegetal	43
3.3.2 De los animales de experimentación	43
<b>3.4 Procedimiento de la investigación</b>	<b>44</b>
3.4.1 Obtención del extracto hidroalcohólico	45
3.4.2 Porcentaje de humedad	46
3.4.3 Porcentaje de rendimiento	46
3.4.4 Pruebas de solubilidad	47
3.4.5 Análisis fitoquímico cualitativo	48
3.4.6 Características organolépticas	49
3.4.7 Efecto analgésico	49
3.4.7.1 Protocolo experimental	49
3.4.7.2 Procedimiento	50
a. Preparación de soluciones	50
b. Preparación de los animales	52
3.4.8 Efecto espasmolítico	53

3.4.8.1	Protocolo experimental	53
3.4.8.2	Procedimiento	55
	a. Preparación de soluciones	55
	b. Preparación de los animales	57
3.4.9	De la escala de valoración de los efectos farmacológicos analgésico y espasmolítico	58
3.4.10	Técnicas de análisis y procesamiento de datos	58
<b>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>		<b>59</b>
4.1	De las pruebas preliminares	59
4.1.1	Del porcentaje de humedad	59
4.1.2	Del porcentaje de rendimiento	60
4.1.3	De las características organolépticas	61
4.1.4	De las pruebas de solubilidad	62
4.1.5	Del análisis fitoquímico cualitativo	63
4.2	Del efecto analgésico	65
4.3	Del efecto espasmolítico	70
4.4	Escala de valoración de los efectos farmacológicos analgésico y espasmolítico	75
CONCLUSIONES		76
SUGERENCIAS		77
BIBLIOGRAFIA		78
<b>ANEXOS</b>		<b>83</b>
Anexo N°01:	Identificación botánica de la especie en estudio	83
Anexo N°02:	Certificado sanitario de ratones	84
Anexo N°03:	Constancia de adquisición de ratas	85
Anexo N°04:	Constancia de uso del Equipo de órganos aislados	86
Anexo N° 05:	Preparación de los reactivos para el screening fitoquímico	87
Anexo N°06:	Ficha de datos de la recolección de la especie	89
Anexo N°07:	Ficha de recolección de las características organolépticas del extracto	90
Anexo N°08:	Ficha de recolección de datos de las pruebas de solubilidad	91
Anexo N°09:	Ficha de recolección del análisis fitoquímica cualitativa	92
Anexo N°10:	Ficha de recolección de los datos del efecto analgésico	93
Anexo N°11:	Ficha de recolección de los datos del efecto espasmolítico	94
Anexo N° 12:	Calculo de dosis de extracto para los animales de experimentación	95
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>		
Cuadro N° 01:	Resumen de variables	42
Cuadro N° 02:	Solventes para las pruebas de solubilidad	47

Cuadro N° 03: Prueba del Análisis Fitoquímicos Cualitativo	48
Cuadro N° 04: Criterios de valoración del efecto farmacológico del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> dahlstedt ex a.w. hill. (uchuy papa)	58
Cuadro N° 05: Características organolépticas del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)	61
Cuadro N° 06: Pruebas de solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01: Estructura química de Indometacina	15
Figura N° 02: Estructura química del ácido acético	18
Figura N° 03: Organización del tracto gastrointestinal de la rata	20
Figura N° 04: Representación esquemática de las características generales de la organización del tracto gastrointestinal	21
Figura N° 05: Fórmula Química de atropina	23
Figura N° 06: Estructura química de acetilcolina	24
Figura N° 07: Mecanismo de acción de acetilcolina, atropina, diltiazem y fisostigmina	26
Figura N° 08: Inervación de la musculatura lisa del íleon	28
Figura N° 09: Esquema de los elementos necesarios para la realización de un experimento en órgano aislado	30
Figura N° 10: Ruta seguida por la señal en el equipo de órgano aislado	32
Figura N° 11: Flujograma de la investigación	44
Figura N° 12: Media del efecto analgésico <i>in vivo</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)	68
Figura N° 12: % de inhibición de contorsión abdominal de los grupos de estudio frente al patrón.	69
Figura N° 13: Media del efecto espasmolítico <i>ex vivo</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.	73
Figura N° 14: % de efecto sobre las contracciones de los grupos de estudio frente al patrón.	74

## ÍNDICE DE FOTOS

Foto N° 01: <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill.	11
Foto N° 02: Baño de órgano de 25 mL de volumen, se observa el conducto de oxígeno.	31
Foto N° 03: Baño de órgano en funcionamiento con órgano montado y suministro de oxígeno.	31
Foto N° 04: Termostato que regula temperatura del Baño de órgano a 37°C.	31

Foto N° 05: Zona de recolección a 3800 m.s.n.m.	45
Foto N° 06: Proceso de recolección y limpieza del corno subgloboso.	45
Foto N° 07: Proceso de secado del corno subgloboso, picado a 40°C.	46
Foto N° 08: Muestra seca del corno subgloboso de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahl Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), por triplicado.	46
Foto N° 09: Filtrado del extracto hidroalcohólico al 70%	47
Foto N° 10: Separación del extracto hasta agotamiento.	47
Foto N° 11: Marcha fitoquímica cualitativa de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahl Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)	48
Foto N° 12: Observamos las características organolépticas del extracto de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahl Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)	49
Foto N° 13: Administración intraperitoneal de ácido acético al 3%, 0.25 mg/Kg de peso.	50
Foto N° 14: Administración por vía oral del extracto, Indometacina y solución fisiológica 0.5 mg/mL	50
Foto N° 15: Contorsión provocada por la inyección intraperitoneal de 0.25 mL/kg de una solución de ácido acético al 0.3%.	50
Foto N° 16: Acido acético glacial al 3%, aforado a fiola de 10mL.	51
Foto N° 17: Diluciones del extracto de 50, 25 y 12.5 mg/Kg de peso.	51
Foto N° 18: Cálculo y preparación de la solución de Indometacina 10/Kg de peso.	52
Foto N° 19: Registro del peso de ratones por cada grupo experimental.	52
Foto N° 20: Marcado del ratón por cada grupo experimental.	52
Foto N° 21: Formación de cada grupo, con animales de experimentación.	52
Foto N° 22: Limpieza y eliminación del tejido superfluo del íleon, en solución de Tyrode, a 37°C y suministro de aire.	53
Foto N° 23: Montaje del íleon en un baño de órgano de 25 mL, oxigenado.	53
Foto N° 24: Selección de lectura en el Chard	54
Foto N° 25 Estabilización de 20 min antes de añadir el extracto o fármaco.	54
Foto N° 26: Transductor isotérmico, ubicado en la parte superior del baño de órgano.	55
Foto N° 27: Aplicación directa del extracto o patrón sobre el íleon sumergido en el baño de órgano.	55
Foto N° 28: Pesado de los reactivos para la preparación de la solución de Tyrode.	56
Foto N° 29: Preparación de 500 mL solución de Tyrode con agua destilada	56
Foto N° 30: Diluciones de acetilcolina de $2 \times 10^{-2}$ a $2 \times 10^{-7}$	56
Foto N° 31: Diluciones de extracto hidroalcohólico de 50, 100 y 200 µg/mL	57
Foto N° 32: Registro de peso de las ratas	57
Foto N° 33: Equipo de disección para remoción del paquete intestinal y extirpación del íleon.	57
Foto N° 34: Disección de la piel y la musculatura de la pared anterior del abdomen.	58
Foto N° 35: Identificación del íleon y extirpación, para luego introducirlo a la solución Tyrode oxigenada para su limpieza.	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Porcentaje de humedad del corno subgloboso de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)	59
Tabla n° 02: Porcentaje de rendimiento del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)	60
Tabla N° 03: Efecto analgésico <i>in vivo</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contorsión abdominal inducida por ácido acético al 3% en ratones albinos.	65
Tabla N° 04: Análisis de varianza (ANOVA) del efecto analgésico <i>in vivo</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contorsión abdominal inducida por ácido acético al 3% en ratones albinos.	66
Tabla N° 05: Prueba de DUNCAN del efecto analgésico <i>in vivo</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contorsión abdominal inducida por ácido acético al 3% en ratones albinos.	67
Tabla N° 06: Media del número de contorsiones abdominales y porcentaje de inhibición respecto al grupo control	69
Tabla N° 07: Efecto espasmolítico <i>ex vivo</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.	70
Tabla N° 08: Análisis de varianza (ANOVA), del efecto espasmolítico <i>ex vivo</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.	71
Tabla N° 09: Prueba de DUNCAN del efecto espasmolítico <i>ex vivo</i> del extracto hidroalcohólico al 70% de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.	72

## PRESENTACIÓN

El presente trabajo de investigación intitulado "EFECTO ANALGÉSICO IN VIVO Y ESPASMOLÍTICO EX VIVO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (UCHUY PAPA) EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN", se ha desarrollado sobre la base del conocimiento tradicional de la comunidad de Janac Chuquibamba, Distrito de Lamay, Provincia de Cusco a más de 3800 m.s.n.m. Debido a que en la comunidad usan unas gotas del zumo machacado del corno subgloboso para aliviar problemas gastrointestinales, cólicos, etc.

Con este trabajo buscamos demostrar el efecto analgésico y espasmolítico con el fin de aportar a la ciencia, revalorando el conocimiento tradicional y dando base científica al uso que le dan, debido a que *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill., no reporta antecedentes de estudios realizados.

Para ejecutar el presente trabajo de investigación se ha tenido especial cuidado en buscar protocolos de fuente primaria, validada y estudios similares realizados a nivel nacional e internacional. También se realizó una búsqueda de estudios previos a nivel local, no hallando ninguno. La determinación del efecto analgésico *in vivo* y marcha fitoquímica, se realizó en los laboratorio de farmacología y farmacognosia de la Universidad de San Antonio Abad del Cusco, y para la determinación del efecto espasmolítico *ex vivo* acudimos a la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, quien nos brindó el equipo de órgano aislado en su laboratorio de farmacología.

El deseo de los que hemos ejecutado el presente trabajo, es que sirva como base para realizar posteriores estudios, identificar y aislar las sustancias activas que le dan la propiedad farmacológica, realizar estudios toxicológicos y llevar a una forma farmacéutica.

**La autora**

## RESUMEN

El corno subgloboso de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), es utilizada en la medicina tradicional en desordenes gastrointestinales como cólico, diarreas e indigestión.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos analgésico *in vivo* y espasmolítico *ex vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa).

Para evaluar el efecto analgésico mediante las contorsiones inducidas con ácido acético al 3%, se usaron ratones macho, y el extracto fue administrado a una dosis de 12.5, 25 y 50 mg/Kg de peso por vía oral, usando como patrón indometacina 10mg/Kg. La intensidad del dolor fue determinado a través del número de contorsiones observadas durante 20 minutos.

El efecto espasmolítico se evaluó mediante las contracciones inducidas con acetilcolina a dosis acumulativa (adicionada cada tres minutos) en íleon aislado. Se diseccionó 2 cm. de la parte distal del íleon de ratas machos y se montó en el baño de órganos que contenía solución de Tyrode y las contracciones fueron registradas por el transductor isotónico. Se usó como patrón atropina  $10^{-4}$ M y concentraciones de 50, 100 y 200 µg/mL del extracto hidroalcohólico.

Como resultado, el extracto hidroalcohólico, a la dosis de 25 y 50 mg/Kg de peso, disminuye el dolor en 80.55% y 83.33% respectivamente, siendo mayor a la indometacina que alcanza el 50%. Así mismo la dosis de 100 µg/mL disminuyen las contracciones en 71%, siendo ésta la dosis que se aproxima al efecto del patrón que lo hace en el 80%.

En conclusión el extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill., presenta efecto analgésico a la dosis de 50 mg/Kg de peso y 100 µg/mL inhibe significativamente las contracciones inducidas por acetilcolina.

### **PALABRAS CLAVE:**

Extracto hidroalcohólico, *Peperomia verruculosa*, analgésico, espasmolítico, íleon aislado y contorsión.

## SUMMARY

The *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex AW Hill. (Uchuy papa) corm bulb-shaped is used in traditional medicine to treat gastrointestinal disorders such as colic, diarrhea and dyspepsia.

The aim of this study was to evaluate the analgesic effect *in vivo* and spasmolytic effect *ex vivo* of 70% of hydroalcoholic extract of *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex AW Hill. (Uchuy papa).

Analgesic effect was evaluated using 3% of acetic acid induced writhing test in male mice, and the extract was administered at doses of 12.5, 25 and 50 mg/kg of 70% of hydroalcoholic extract of *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex AW Hill (Uchuy papa) by oral route, using indomethacin 10 mg/kg as a positive control. Pain intensity was determinate throughout observed of number of writhing in 20 minutes.

Spasmolytic effect was evaluated in the contractions induced by acetylcholine in cumulative doses (doses was increased each 3 minutes) in ileum isolated. A 2 cm piece of distal ileum from male adult Wistar rats were dissected and mounted in an organ bath containing Tyrode solution, and ileum contractions recorded by an isotonic transducer. Using atropine  $10^{-4}$ M as a positive control and concentrations of 50, 100 y 200  $\mu$ g/mL of 70% hydroalcoholic extract.

As a result, doses of 25 y 50 mg/Kg of 70% hydroalcoholic extract decrease pain in 80.55% and 83.33% respectively, which is high than indomethacin in 50%. Furthermore, dose of 100  $\mu$ g/mL decrease contractions in 71%, effect of this dose is about equal to positive control in 80%.

In conclusión, 70% of hydroalcoholic extract of *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex AW Hill. (Uchuy papa), showed analgesic effect at dose of 50 mg/kg and dose of 100  $\mu$ g/mL significantly inhibited contractions induced by acetylcholine

**KEY WORDS:** Hydroalcoholic extract, *Peperomia verruculosa*, analgesic, spasmolytic, ileum isolated and writhing.

## INTRODUCCIÓN

Hace tiempo que la humanidad viene aprovechando el uso de las diferentes plantas para protegerse de las enfermedades y curarlas. Cada civilización tiene sus propias plantas curativas o medicinales. Durante la evolución de la humanidad se desarrolló, un conocimiento profundo del efecto curativo de las plantas dentro de cada civilización (Mantilla J., 2002).

El conocimiento sobre salud, enfermedad, prevención y tratamiento; ha sido transmitida de una generación a otra; a través del tiempo; saber basado exclusivamente en la experiencia y las observaciones (Guillermo N, 2002).

Si se tratan las plantas medicinales como recursos genéticos, se puede afirmar que existe una riqueza botánica enorme, especialmente en los países andinos (Mantilla J., 2002).

El dolor funciona principalmente como señal de protección, ya que puede ser la advertencia de un peligro inminente o de la presencia de una enfermedad interna; así mismo puede ser parte del proceso de curación normal. El alivio del dolor es deseable cuando la duración e intensidad de éste altera la capacidad de la persona de funcionar eficientemente (Hitner H., 2007). La asociación internacional para el estudio del dolor lo definió como: "una sensación sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular existente o potencial, descrito en términos de daño" (IASP).

La importancia del efecto analgésico y espasmolítico radica en que establecen la propiedad farmacológica de la especie nativa, que aún no ha sido estudiada, con el propósito de promover, revalorar y conservar la transmisión de conocimientos antes que se pierdan; a partir de esto a futuro realizar pruebas experimentales para determinar la forma farmacéutica y la concentración efectiva terapéutica.

# **CAPÍTULO I: GENERALIDADES**

## **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad la búsqueda por encontrar nuevas sustancias con actividades terapéuticas ha llevado a los investigadores a profundizar los estudios sobre la composición y uso de principios activos de diversas plantas medicinales que son muy poco conocidas, y que sin embargo poseen actividades farmacológicas interesantes. El descubrimiento de nuevas plantas medicinales es inútil, si solo se basa en un estudio fitoquímico pues muchas de sus actividades se pasan por alto y son ignoradas (Cotillo et al., 1990).

De las plantas naturales se extraen las sustancias y componentes terapéuticos que más tarde los laboratorios de investigación nos brindan en forma de cápsulas y comprimidos, que invaden el mercado farmacéutico en combinación con la "Medicina Moderna" (Saldierna F., 2000).

Es indudable que en los últimos años ha surgido un renovado interés por las plantas medicinales en todo el mundo. La herbolaria medicinal actualmente recobra una posición que parecía perdida después del surgimiento y auge de la industria químico-farmacéutica que revolucionó con numerosos medicamentos la terapéutica tradicional (Ruiz S. et al., 2004).

El cólico intestinal es un síntoma inespecífico que carece de marcadores biológicos que puedan determinar su valor y significado en las enfermedades

gastrointestinales de carácter orgánico y funcional. Dada la dificultad de su aproximación clínica y fisiopatológica, las posibilidades terapéuticas incluyen una amplia gama de alternativas, entre las que se encuentran los antiespasmódicos y la terapia herbal, que se convierte en una de las más utilizadas hoy en día (Gracia M., 2001). Es por eso que el presente trabajo de investigación pretende comprobar e informar sobre el efecto analgésico y/o espasmolítico que se le atribuye, y dilucidar mediante pruebas fitoquímicas cualitativas la presencia de sustancias activas de la especie *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) para el tratamiento de cólicos, diarreas e indigestión, dando una base científica para su utilización adecuada, contribuyendo de esta manera a la investigación y revaloración del conocimiento tradicional.

## **1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Presentará efecto analgésico *in vivo* y espasmolítico *ex vivo* el extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en animales de experimentación?

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto analgésico *in vivo* y espasmolítico *ex vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill (Uchuy papa) en animales de experimentación.

### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el porcentaje de humedad, porcentaje de rendimiento, características organolépticas, solubilidad y estudio fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70 % de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa).
2. Evaluar el efecto analgésico *in vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contorsión abdominal inducida por ácido acético al 3% en ratones albinos.
3. Evaluar el efecto espasmolítico *ex vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.

4. Determinar la dosis con mayor efecto analgésico del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) y comparar con el fármaco patrón Indometacina.
5. Determinar la dosis con mayor efecto espasmolítico del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) y comparar con el fármaco patrón Atropina.

#### 1.4 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

- La importancia de investigar las Plantas Medicinales, radica en el hecho de que durante los últimos años la humanidad, muestra interés por las especies vegetales con propiedades medicinales, debido a las reacciones adversas de los medicamentos que consumen o al costo elevado de estos.
- Las plantas medicinales han sido usadas y transmitidas de generación en generación, de forma empírica desde épocas remotas, este creciente interés ha motivado que este tema sea tratado, desde el punto de vista científico, con la finalidad de verificar la acción terapéutica, y composición fitoquímica a pesar de la existencia de los medicamentos de síntesis (Palacios V., 1993).
- Las plantas del género *peperomia*, son usadas con mucha frecuencia en la sierra, en casi toda la costa del Perú y en algunas zonas de la selva; pero la especie *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), no cuenta con un estudio científico; por lo cual se plantea un estudio cuasi-experimental para determinar su posible efecto analgésico y espasmolítico que permitirá brindar bases científicas para validar los efectos atribuidos a esta especie.

#### 1.5 HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) presenta efecto analgésico *in vivo* y espasmolítico *ex vivo* en animales de experimentación.

# CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

## 2.1.- ANTECEDENTES

### 2.1.1 ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS

- **Guillermo N. et al. Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaifolia* R. et P., Aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. UNMSM. 2002.**

En la presente investigación fue evaluado el efecto cicatrizante de la especie *Peperomia scutellaifolia* R. et P.; en forma de geles, mediante el método tensiométrico y corroborado con cortes histológicos, para evaluar la evolución histológica en cada caso. Se utilizaron ratones albinos cepa Balb C 53 de  $\pm$  25g. de peso; y con tratamiento de Carbopol 940 de 5%, 10%, 20% y 30% P/P de extracto vegetal, comparando los resultados con el grupo control (sin tratamiento) y con el grupo tratado con un medicamento comercial. Se obtuvo mayor porcentaje de cicatrización con el gel 5%. Se determinó la presencia de flavonoides derivados del núcleo de los dihidroflavonoles e isoflavonas; identificados por espectrofotometría ultravioleta-visible, espectrofotometría infrarroja; y por reacciones de coloración. Se realizaron encuestas etnofarmacológicas, para documentar los usos, indicaciones y aplicaciones terapéuticas de la especie en la medicina tradicional de Cajamarca, la especie *Peperomia scutellaifolia* R. et P. es empleada fresca y algunas veces seca,

para aliviar enfermedades cardiacas, inflamaciones internas y como cicatrizante externo.

- **Brack A. “Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú” PNUD-CBC. Cusco – Perú. Junio 1999. Pág. 7, 394.**

Ha logrado determinar que cerca de 5000 plantas son utilizadas para 49 fines distintos, destacando los usos alimenticios (782 especies), medicinales (1400 especies), ornamentales (1608 especies), madera y construcción (618 especies), forraje (483 especies), tintes y colorantes (134 especies), tóxico y venenoso (179 especies), leña y carbón (132 especies), agroforestería (132 especies), entre otros. En el que destacan la Piperácea familia de las dicotiledóneas con 3 géneros y 811 especies en el Perú, de las cuales 528 son endémicas, con propiedades medicinales como analgésico, antiinflamatorio, digestivo, anticarminativo, estimulante, emoliente, tónico, y otros en estudio.

- **Hammond et al. “A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, department of Ancash, Perú” (Estudio de las plantas medicinales tradicionales del Callejón de Huaylas, departamento de Ancash, Perú). Journal of Ethnopharmacology 61 (1998).**

En éste estudio, reportan el uso medicinal de la flora local del callejón de Huaylas, área geográfica que tiene una tradición en hierbas curativas. Un total de 33 especies fueron documentadas a través de interacciones con los pobladores ancianos, curanderos y hierberos. De las 33 especies encontradas, 6 no fueron reportadas anteriormente, 7 recibieron un pequeño reporte fitoquímico en la literatura, y el uso medicinal de otras 7 plantas aún no corroboradas con el reporte medicinal del mundo. El uso medicinal tradicional de 6 plantas medicinales corroboradas con publicaciones reportadas pero sus actividades biológicas aún no confirmadas en el laboratorio. El uso medicinal de otras 4 plantas fueron corroboradas con publicaciones y sus actividades biológicas confirmados en el laboratorio. El uso medicinal propuesto de 3 plantas no fueron confirmadas en el laboratorio.

El jugo de las hojas machacadas de *Peperomia galioides* HBK var. *galioides* es usada en el Callejón de Huaylas como un agente curativo de heridas para heridas externas e internas. También es usada como cicatrizante en el departamento de Piura, en el norte de los andes peruanos, para mitigar las

hemorroides y el escozor, para prevenir la caída del cabello. Además, el extracto de éter de petróleo de *Peperomia galioides* de Bolivia muestra significativa actividad in vitro frente a tres especies de *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*.

### 2.1.2. ANTECEDENTES SOBRE EFECTO ANALGÉSICO

- **Fernández D. et al. Efectos del extracto de alcoholes purificados de la cera de abejas (*Apis mellifera*) en dos modelos de analgesia. Revista Cubana de Farmacia. 2010; 44(2)205-212.**

El D-002 es una mezcla de 6 alcoholes alifáticos de alto peso molecular purificada de la cera de abejas (*Apis mellifera*). Este estudio tuvo como objetivo investigar los efectos del tratamiento por vía oral con D-002 sobre las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y en el modelo del plato caliente en ratones. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos (10-20 animales/grupo): uno control que recibió el vehículo goma acacia/H<sub>2</sub>O, tres tratados con D-002 (25, 125 y 250 mg/kg) y uno con aspirina (modelo de contorsiones abdominales) o morfina (plato caliente). El D-002 (25-250 mg/kg) inhibió significativamente las contorsiones inducidas por ácido acético en un 44,5; 44,8 y 47,1 % respectivamente; sin embargo, no modificó la latencia de la respuesta en el modelo del plato caliente. Estos resultados muestran que el tratamiento por vía oral con D-002 (25-250 mg/kg) es capaz de inhibir de forma moderada las contorsiones abdominales por ácido acético sin afectar la respuesta al plato caliente. Esto sugiere que el D-002 ejerce una acción analgésica periférica pero no a nivel central.

- **Muñoz C.E., et al. Antinociceptivo de *Critoniella acuminata*, *Physalis peruviana* y *Salvia rubescens*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (1), 31-41, 2009.**

Se evaluó el efecto antinociceptivo de extractos, fracciones y compuestos de *Critoniella acuminata*, *Physalis peruviana* y *Salvia ribescens* mediante los métodos de placa caliente, contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y ensayo de la formalina.

La fracción de *Critoniella acuminata* en dosis de 100 mg/Kg p.o. presentó actividad antinociceptiva al aumentar el tiempo de reacción del animal ante la aplicación de un estímulo térmico (método de la placa caliente), mientras que la

fracción de *Physalis peruviana*, en una dosis de 100 mg/Kg p.o., ejerce un efecto antinociceptivo frente al dolor generado por estímulos químicos (dolor visceral agudo) al inhibir en un 40% las contorsiones abdominales inducidas por ácido acético y el número de lamidos durante la fase II (dolor inflamatorio agudo) en el ensayo de formalina. Estos resultados sugieren que la ayapina y la fracción de *Physalis peruviana* estudiadas tienen actividad antinociceptiva, con posibles mecanismos de tipo opioide y AINE, respectivamente.

- **Barzaga F. et al. Efecto analgésico del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Rev Cubana Plant Med v.10 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2005.**

Teniendo en cuenta la actividad antiinflamatoria demostrada del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L., fue objetivo de este trabajo evaluar sus propiedades analgésicas en modelos animales. Dosis de *O. tenuiflorum* de 250, 500 y 1 000 mg/kg fueron evaluadas en modelos de inducción del dolor por vías química y térmica. Como resultado de este estudio se obtuvo que el extracto acuoso liofilizado de *O. tenuiflorum* mostró efecto analgésico en los modelos del plato caliente a la dosis de 1000 mg/kg; en el de contorsiones por ácido acético en ratones y foco calorífico en ratas a las dosis de 250, 500 y 1 000 mg/kg. Estos resultados indicaron que el extracto acuoso liofilizado de *O. tenuiflorum* ejerce un efecto antinociceptivo, preferentemente sobre la vía periférica.

### **2.1.3 ANTECEDENTES SOBRE EFECTO ESPASMOLÍTICO**

- **Bigovic D. et al. "Relaxant Effect of the Ethanol Extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on Isolated Rat ileum Contractions" (Efecto relajante del extracto etanolico de *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) en contracciones de íleon aislado de rata). *Molecules* 2010, 15, 3391-3401.**

*Helichrysum plicatum* (Turkish Helichrysum) es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de gastritis y desordenes hepáticos. El objetivo del presente estudio fue examinar la actividad relajante del extracto de flores de *H. plicatum* en íleon aislado de rata. Los segmentos de íleon de rata fueron suspendida en un baño de órganos. Concentraciones acumulativas del extracto etanólico de

*H. plicatum* produce efecto relajante sobre la contracción espontánea de íleon de rata. El extracto de *H. plicatum* causó una respuesta contráctil de  $81.68 \pm 6.17\%$  (a una dosis de 0.01 mg/mL) y  $30.08 \pm 9.07\%$  (a una dosis de 1 mg/mL). Similar efecto se pudo observar con papaverina (0.01-3 µg/mL). El extracto de *H. plicatum* produjo una alta relajación sobre la pre contracción con K<sup>+</sup> (80mM), un efecto similar causó la papaverina (0.01-3 µg/mL). El extracto de la planta (0.03-3mg/mL) también produjo una significativa inhibición de la curva concentración repuesta de la dosis acumulativa de acetilcolina. (5-1500 nM) ( $p < 0.01$ ). Atropina (140 nM) inhibió el efecto de la acetilcolina. El extracto (0.03-3mg/mL) inhibió la histamina (1-300 nM) y BaCl<sub>2</sub> (3-900 nM) indujo la contracción ( $p < 0.01$ ). Los resultados demostraron el efecto relajante del extracto etanólico de flores de *H. plicatum* sobre el intestino aislado de rata, el extracto de *H. plicatum* puede inhibir la contracción espontánea del íleon y las contracciones inducidas por acetilcolina, histamina y iones de bario, y potasio.

- **Alba R. et al. Efecto relajante de las hojas de *Ocimum basilicum* y *Foeniculum vulgare* colombianas en íleon aislado de rata. 2009. Univ. Med. Bogotá (Colombia), 50 (1): 98-109.**

El hinojo y la albahaca han sido usadas por largo tiempo en la medicina popular como antiespasmódicos para mejorar las dolencias gastrointestinales y el cólico intestinal. Se evaluó el efecto in vitro de la infusión al 10% de hojas secas de *Ocimum basilicum* (albahaca) y *Foeniculum vulgare* (hinojo) cundiboyacenses y la mezcla 1:1 de ambas infusiones, en el tono de íleon precontraído de rata. Se observó una disminución del tono al comparar con el agua destilada en cantidades iguales, la cual fue dependiente de la dosis, con una diferencia estadísticamente significativa, para cada una de las plantas y la mezcla. No se encontró un efecto aditivo con la mezcla de ambas plantas. El estudio demostró el efecto relajante de las infusiones de albahaca e hinojo al 10%, en el tono del íleon precontraído de rata.

- **Kazem M., et al. "Antispasmodic Effect of *Piper nigrum* Fruit Hot Water Extract on Rat Ileum" (Efecto antiespasmódico de la infusión de la fruta de *Piper nigrum* en íleon de rata). © 2008 Asian Network for Scientific Information. Pakistan Journal of Biological Sciences 11 (11): 1492-1496, 2008. Scientific Information.**

El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de la infusión de la fruta del *Piper nigrum* (BPE) sobre la contracción de íleon de rata y su mecanismo de acción. El extracto fue preparado añadiendo el polvo negro del pimienta, destilando y evaporando el solvente. El íleon se diseccionó de una rata adulta macho (Wistar) y se puso en una solución de Tyrode, las contracciones del intestino se pueden observar en un transductor isotónico de 1 g de tensión. Las concentraciones acumulativas del BPE ( $0.0625^{-1}$  mg/mL), reduce la contracción inducida de íleon con KCl (60mM) o Carbacol (10  $\mu$ M) concentraciones dependientes ( $p < 0.001$ ). El  $Ca^{+2}$  liberado en la solución de Tyrode, aumenta potasio (60mM), BPE, ( $0.0625^{-1}$  mg/mL) inhibe la contracción inducida y acumulativa de  $CaCl_2$  (0.225-2.7 mM) concentraciones dependientes (ANOVA,  $p < 0.05$ ). Se incubó el tejido preparado (20 a 30 minutos) con L-NAME (100 $\mu$ M), naloxona (1 $\mu$ M) y propanolol (1 $\mu$ M). Se reduce el efecto antiespasmódico del extracto en la contracción inducida de íleon con KCl. El efecto espasmolítico del extracto fue reducido por glibenclamida (10  $\mu$ M) y tetraetilamonio (1mM). El presente resultado sugiere que el efecto espasmolítico del extracto sobre el íleon de rata, fue posible por la vía del  $Ca^{+2}$ .

- **Sadraei H., et al. "Relaxant effect of four fractions separated from alkaloid extract of *Pycnocycla spinosa* on rat isolated ileum" (Efecto relajante de cuatro fracciones separadas de alcaloides del extracto de *Pycnocycla spinosa* en íleon aislado de rata). Isfahan University of Medical Sciences. Research in Pharmaceutical Sciences, 2008; 3(2):9-14.**

Extracto hidroalcohólico de *Pycnocycla spinosa* puede demostrar la acción espasmolítica *in vitro* y antidiarreica *in vivo*. El extracto hidroalcohólico de *Pycnocycla spinosa* está compuesto por alcaloides, flavonoides y saponinas. La fracción de alcaloide de *Pycnocycla spinosa* es un constituyente muy activo. El objetivo de la investigación fue separar diferentes fracciones de alcaloides del extracto de *P. spinosa* y su actividad espasmolítica en íleon aislado de rata. Las fracciones de alcaloides fueron separadas por la técnica de liberación de alcaloides. Cuatro fracciones de alcaloides fueron separadas por la técnica de cromatografía. Las cuatro fracciones inhibieron la respuesta espasmolítica de 80 mM KCl a concentración dependiente. Dos de las fracciones inhibieron la respuesta de la ACh y 5-HT. Este estudio demuestra la

relación de la acción antiespasmódica de diferentes componentes presentes en cuatro fracciones de alcaloides del extracto de *P. spinosa*.

## 2.2 BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

### 2.2.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

#### 2.2.1.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Según el sistema de clasificación de Arthur Cronquist (1981) otorgado por el Herbario Vargas (CUZ) de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Reino	: Vegetal
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Magnolidae
Orden	: Piperales
Familia	: Piperaceae
Género	: Peperomia
Especie	: <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill.
Nombre vulgar	: Pisco-papa, uchuy-papa, pichinchu-papa, añas papa, atoq papa.

#### 2.2.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

**Habito** hierba diminuta, glabra, acaulescente o casi sin tallo, las **hojas** nacen de un corno subgloboso, con enraizamiento en la parte inferior, la lamina foliar redonda o subdeltoidea de 5 – 7 mm de largo, peltadas, con el pecíolo insertado en la parte media, de 15 a 25 mm de longitud; **inflorescencias** en espigas de 4 – 5 mm de largo, **flores** pequeñas, bisexuales, sépalos y pétalos ausentes, aglomeradas; pedúnculo de 20 mm de longitud; brácteas subelípticas, con 2 estambres – peltadas; **fruto** en bayas ovoides, verruculosas; estilópodio corto – cónico; estigma apical (Watson L y Dallwitz J., 1992, Tupayachi A. y Galiano W., 2004).



Foto N° 01: *Peperomia verruculosa* Dahlistedt ex A.W. Hill. Hierba diminuta de 4 cm de altura, con diámetro del cormo subgloboso de 10 mm.

Fuente: G.L. López Aliaga Orosco

### 2.2.1.3 HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

La familia Piperaceae es reconocida en el Perú por presentar tres géneros y 830 especies, principalmente hierbas y arbustos. El género más rico en especies es Piper. Esta familia requiere mayor atención tanto en su taxonomía como en la representación en los herbarios. Los taxones endémicos se encuentran principalmente en las regiones bosques húmedos amazónicos, bosques muy húmedos montanos y bosques muy húmedos premontanos, entre los 100 y 2700 m de altitud. Se aplicaron las categorías y criterios de la UICN a 209 taxones. Aparentemente, sólo nueve especies se encuentran representadas dentro del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (Watson L y Dallwitz J., 1992 y León B. et al., 2006).

Esta especie también se ha recolectado en Cusco, en el distrito de San Jeronimo, Huaccoto, Pastizal. Sobre los 3900 m.s.n.m. por (Tupayachi A. y Galiano W., 2004)

Crecen espontáneamente y es extraído directamente por la comunidad de su hábitat natural. No es cultivada. Por lo que lleva al problema de escases de especies endémicas, que pueden extinguirse por la colecta indiscriminada.

#### **2.2.1.4 PARTE UTILIZADA**

Parte subterránea especialmente el cormo, sin raíces en decocción y directamente el zumo extraído, previamente machacado.

#### **2.2.1.5 PRINCIPALES CONSTITUYENTES FITOQUÍMICOS**

Las especies de esta familia producen una gran cantidad de diferentes compuestos químicos, sobre todo derivados de la fenilalanina. Los aceites esenciales contienen monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos a partes más o menos iguales. Son característicos los lignanos, un derivado furfuránico, cinnamoilamidas,  $\alpha$ -pironas y derivados de la porfirina. Proantocianidinas y flavonoles ausentes. Cianogénesis ausente (Tebbs, M.C.1993).

### **2.2.2 CONSIDERACIONES GENERALES DEL DOLOR**

#### **2.2.2.1 DOLOR**

El concepto de dolor postula que un fenómeno como tal no es inherente mental ni físico, pero puede describirse con igual validez en términos mentales o físicos. La definición resultante es:

- Una sensación particular personal de daño.
- Un estímulo perjudicial que indica una lesión actual o inminente de los tejidos.
- Un conjunto de respuestás que funcionan para proteger el organismo ante un daño.

La sensación de dolor es considerada como un mecanismo protector del organismo, que alerta a la persona que lo padece de que algo “anda mal” y lo incita a iniciar alguna acción destinada a suprimir o disminuir el dolor. Sin embargo cuando se cronifica, pierde el sentido protector y se convierte él mismo en la enfermedad o en elemento fundamental de ella, provocando un estado de sufrimiento. La naturaleza doble del dolor es la causa de algunas de las dificultades que se tienen para comprenderlo (Palma J., 2005).

#### **2.2.2.2 TIPOS DE DOLOR (Palma J., 2005)**

**Según su origen anatómico:**

**Nociceptivo somático:** Si aparece luego de la estimulación nociceptiva de piel: dolor superficial, o bien si es después de la estimulación de tejido conectivo, músculo, huesos y membranas sinoviales: dolor profundo. Este tipo

de dolor es percibido como una sensación desagradable, intensa y bien localizada.

**Nociceptivo visceral:** Se origina en una estimulación nociceptiva de vísceras contenidas en las cavidades craneana, torácica, abdominal y pélvica; usualmente poco localizado y acompañado de reflejos autónomos y somáticos.

**Neurogénico:** Dice relación con el dolor originado en el sistema nervioso periférico (SNP) ya sea por injuria o irritación de una rama nerviosa, o con el dolor derivado del daño o enfermedad en el sistema nervioso central (SNC).

**Según su duración:**

**Dolor agudo:** Es aquel que comprende el lapso estimado como necesario para que los tejidos sanen. Es un fenómeno de carácter transitorio asociado con daño tisular real o potencial y que es útil para el resguardo de la integridad del organismo.

**Dolor crónico:** En contraposición al dolor agudo, es aquel que tiene una duración de más de tres meses, o que por las características de su origen sobrepasa el tiempo que habitualmente podría definir un dolor agudo semejante. El dolor crónico es de tipo neuropático, ya que se origina en la lesión de estructuras nerviosas centrales y/o periféricas del sistema nociceptivo; no tiene valor adaptativo, ya que no es capaz de evocar respuestas reflejas ni conductuales protectoras, por el contrario, su percepción determina cambios psicológicos y cognitivos que influyen negativamente en la sobrevida del afectado.

### **2.2.2.3 VÍAS DEL DOLOR**

El comienzo de la información dolorosa es simple, los terminales nerviosos llamados nociceptores que forman una unidad funcional del dolor con tejidos y capilares cercanos. La injuria tisular causa que los terminales nerviosos se despolaricen, un evento que es propagado a lo largo de la fibra aferente finalizando en impulsos sensoriales en la espina dorsal. La descarga de fibras primarias aferentes en el sitio de la injuria causa la liberación de vesículas que contienen neuropéptidos tales como la sustancia P, que actúa de manera autocrina y paracrina para sensibilizar el nociceptor e incrementar esta tasa de descarga. El daño celular y la inflamación aumentan la concentración de otros mediadores químicos tales como la histamina, bradicinina y prostaglandinas en

los alrededores de las unidades funcionales de dolor. Estos mediadores adicionales actúan sinérgicamente para aumentar la transmisión de impulsos nociceptivos a lo largo de la fibra sensorial aferente. Las fibras primarias viajan a través de la periferie de la espina dorsal donde ella sinapta una neurona secundaria e interneuronas. Cuando son activadas, las interneuronas ejercen influencias inhibitorias sobre el tráfico de señales dolorosas. Influencias supraespinales eferentes, a su vez, determinan la actividad de interneuronas por liberación de una variedad de sustancias neurotransmisoras, resultando así un alto grado de modulación de nocicepción en la espina dorsal. Los eventos que ocurren en la periferia y en la espina dorsal pueden causar una disociación de la percepción del dolor desde la presencia o grado de la actual injuria tisular. Este fenómeno involucra muchos mediadores químicos y sistemas receptores, y puede incrementar la experiencia dolorosa cualitativamente, cuantitativamente, temporalmente y espacialmente.

La complejidad y plasticidad del sistema nociceptivo puede generar dificultades en el manejo clínico del dolor. Entendiendo la estructura y señales químicas asociadas con este sistema puede mejorar el uso de los analgésicos existentes y mejorar estrategias para el desarrollo de nuevas y más específicas drogas contra el dolor.

Es en el asta posterior de la médula espinal es donde se procesan e integran por primera vez los estímulos que ingresan. Se produce aquí la transmisión sináptica, desde la primera a la segunda neurona, mediada por la sustancia P, y aminoácidos, como el ácido glutámico, entre otros. La sustancia gris medular de las astas posteriores fue clasificada por Rexed en 6 láminas. Las fibras A $\delta$  terminan en arborizaciones en las láminas I y V, y las fibras C terminan con sus arborizaciones en la lámina II y con menor densidad en la lámina I. Aquí termina la primera neurona sensitiva. Muchas fibras nociceptivas, antes de su ingreso a la sustancia gris, emiten colaterales descendentes y ascendentes, constituyendo parte del haz de Lissauer. Estas colaterales tienen la posibilidad de formar sinapsis hasta dos segmentos medulares inferiores o superiores al del ingreso, lo que significa que la transmisión de una neurona primaria puede propagarse a varias raíces vecinas.

El soma de la segunda neurona de esta vía se puede encontrar en la lámina I de Rexed o en las láminas IV, V o VI. Es importante destacar que las segundas

neuronas reciben la información nociceptiva y la someten a transformaciones, mediante las cuales ésta va a ser filtrada y discriminada. Además pueden formar sinapsis con más de una primera neurona, proveniente de la piel o de una víscera, y esta sinapsis se produce siempre en la sustancia gelatinosa de Rolando, cualquiera sea la distribución del soma en el asta posterior. Las segundas neuronas dan origen a tres haces ascendentes contralaterales: El neoespinalámico y el paleoespinalámico, que conforman la vía espinalámica y el espino-reticulolámico (Palma J., 2005).

### 2.2.3 FÁRMACO PATRÓN ANALGÉSICO: INDOMETACINA

#### 2.2.3.1 FÓRMULA QUÍMICA

2-[1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metilindol-3-il]ácido acético

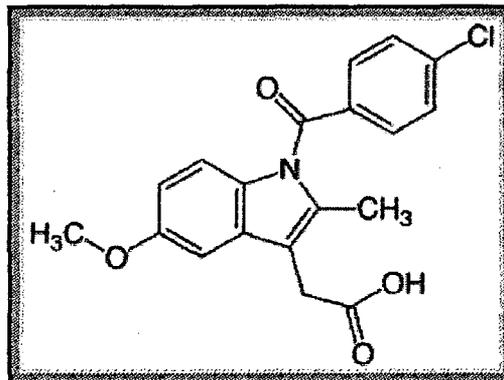


Figura N°01: Estructura química de Indometacina (Brenner GM et al., 2006).

**2.2.3.2 FARMACOCINÉTICA:** Absorción gastrointestinal rápida y completa. La unión a proteínas es de alto grado. Sufre metabolismo hepático. Se excreta de forma principal por el riñón y por bilis (Rodríguez P.C. et al. 2005).

**Acción antiinflamatoria:** Se ha reportado que indometacina es más potente que el ácido acetilsalicílico, la fenilbutazona o la hidrocortisona. También se ha demostrado que indometacina ejerce un efecto favorable sobre la poliartritis inducida experimentalmente y es más activa que la fenilbutazona o el ácido acetilsalicílico en la supresión de las manifestaciones tardías de la artritis diseminada.

**Actividad antipirética:** Se ha demostrado que indometacina es aproximadamente nueve veces más potente que la aminopirina, 24 veces más potente que la fenilbutazona y 43 veces más potente que el ácido acetilsalicílico.

**Actividad analgésica:** Las dosis moderadas de indometacina elevan el umbral de respuesta a la presión sobre áreas inflamadas en la rata. Cualitativamente indometacina actúa como un analgésico del tipo antiinflamatorio-antipirético representado por los salicilatos y no del tipo narcótico representado por la morfina.

Se encontró que indometacina es 28 veces más potente que el ácido acetilsalicílico y 14 veces más potente que la fenilbutazona.

### **2.2.3.3 FARMACODINÁMIA**

**Mecanismo de acción:** Indometacina (de color verde y amarillo) unida a las dos subunidades de una molécula de ciclooxigenasa bloqueando su sitio activo.

La actividad de la indometacina se logra por su capacidad para inhibir la enzima ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis de prostaglandinas. EL efecto es más intenso sobre la COX-1 que sobre la COX-2, lo que explica sus efectos secundarios.

**Efecto:** La inhibición de la síntesis de prostaglandinas trae acarreada la disminución de los efectos que estas ejercen en el organismo, tanto positivos como negativos. Por un lado inhibe la respuesta inflamatoria del organismo, especialmente interesante en fármacos que atraviesan la barrera articular inhibiendo el desarrollo de la artritis en particular, y de la reacción inflamatoria en general. Por otra parte, la intervención de las prostaglandinas en la respuesta alérgica periférica, hace que su inhibición logre un efecto analgésico añadido al antiinflamatorio.

La inhibición del efecto protector gástrico o renal explica algunos de los efectos secundarios de la indometacina: gastritis, úlcera gástrica (y sus complicaciones como la hemorragia digestiva o la perforación) y nefritis (glomerulonefritis por AINE, con un cuadro anatomopatológico característico).

### **2.2.3.4 EFECTOS ADVERSOS:** (Rodríguez P.C. et al. 2005)

**SNC:** cefalea, mareos, depresión, somnolencia, confusión, fatiga, neuropatía periférica, convulsiones, alteraciones psíquicas, síncope y vértigo.

**CV:** hipertensión, edema, insuficiencia cardíaca.

**OS:** visión borrosa, daño de retina y cornea, sordera, tinnitus.

**GI:** náuseas, anorexia, diarrea, úlcera péptica, sangrado GI, estreñimiento, dispepsia y pancreatitis.

**GU:** hematuria, insuficiencia renal aguda, proteinuria y nefritis intersticial.

**Hematológicos:** anemia hemolítica, anemia aplásica, agranulocitosis, leucopenia, púrpura trombocitopénica.

**Piel:** prurito, urticaria, síndrome de Stevens-Johnson.

**Otros:** hiperpotasemia, hipersensibilidad, alteraciones respiratorias.

#### **2.2.3.5 INTERACCIONES:** (Rodríguez P.C. et al. 2005)

- La indometacina con acetaminofeno, compuestos de oro y otros antiinflamatorios, diuréticos y triamtereno incrementa la posibilidad de nefrotoxicidad.
- Antic응agulantes: Aumenta la potencia de estos.
- Antihipertensivos diuréticos: Disminuye la efectividad de estos.
- Antiinflamatorios, corticoesteroides, corticotropina, salicilatos y alcohol: Incrementa los efectos adversos GI.
- Insulina e hipoglucemiantes orales: potencia los efectos hipoglucémicos.
- Litio y metotrexato: Disminuye su eliminación renal con riesgo a toxicidad.
- Se disminuye los niveles de indometacina con ASA, cefamandol, cefoperazona, dextran, dipiridamol, mezlocilina, ac. Valproico y otros antiinflamatorios.
- La indometacina aumenta la toxicidad si se administra con derivados cumarínicos, fenitoína, nifedipina y verapamilo.

#### **2.2.3.6 PRECAUCIONES:**

Ancianos: presencia de enfermedades GI, alteraciones de la función hepática o renal, enfermedades cardiovasculares, infecciones enfermedades mentales o depresión (Rodríguez P.C. et al. 2005).

#### **2.2.3.7 CONTRAINDICACIONES:** (Rodríguez P.C. et al. 2005)

Hipersensibilidad al fármaco, ASA y otros AINEs que producen asma, rinitis o urticaria. Embarazo, lactancia y niños con enfermedades no controladas como: hemorragia activa, alteraciones en la coagulación, enfermedades congénitas, etc.

Embarazo: Sin clasificación.

Lactancia: Concentraciones en leche son similares a las concentraciones sanguíneas maternas. Se recomienda evitar la lactancia.

## 2.2.4 INDUCTOR ALGÉSICO: ÁCIDO ACÉTICO AL 3%

### 2.2.4.1 FÓRMULA QUÍMICA

Ácido etanoico o ácido metilencarboxílico.

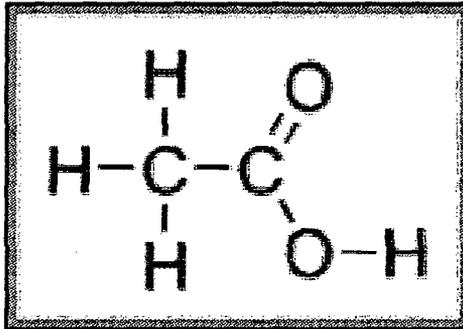


Figura N°02: Estructura química de ácido acético (Brenner GM et al., 2006).

Se puede encontrar en forma de ión acetato. Éste es un ácido que se encuentra en el vinagre, siendo el principal responsable de su sabor y olor agrios. Su fórmula es  $\text{CH}_3\text{-COOH}$  ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ). De acuerdo con la IUPAC se denomina sistemáticamente ácido etanoico.

### 2.2.4.2 APLICACIONES Y USOS

- En apicultura es utilizado para el control de las larvas y huevos de las polillas de la cera, enfermedad denominada galleriosis, que destruyen los panales de cera que las abejas melíferas obran para criar o acumular la miel.
- Sus aplicaciones en la industria química van muy ligadas a sus ésteres, como son el acetato de vinilo o el acetato de celulosa (base para la fabricación de lalo, rayón, celofán, etc.).
- Son ampliamente conocidas sus propiedades como mordiente en soluciones fijadoras, para la preservación de tejidos (histología), donde actúa empíricamente como fijador de nucleoproteínas, y no así de proteínas plasmáticas, ya sean globulares o fibrosas. (Resultados avalados por J. Baker).
- En el revelado de fotografías en blanco y negro, era utilizado en una solución muy débil como "baño de paro": al sumergirse en él el material revelado, se neutralizaba la alcalinidad del baño revelador y se detenía el proceso; posteriormente el baño fijador eliminaba el resto de material no revelado.

- Otros de sus usos en la medicina es como tinte en las colposcopias para detectar la infección por virus de papiloma humano, cuando el tejido del cervix se tiñe de blanco con el ácido acético es positivo para infección de virus de papiloma humano, a esta tinción se le conoce como aceto blanco positivo.
- También sirve en la limpieza de manchas de la casa en general.

#### **2.2.4.3 SEGURIDAD**

El ácido acético concentrado es corrosivo y, por tanto, debe ser manejado con cuidado apropiado, dado que puede causar quemaduras en la piel, daño permanente en los ojos, e irritación a las membranas mucosas. Estas quemaduras pueden no aparecer hasta horas después de la exposición. Los guantes de látex no ofrecen protección, así que debe usarse guantes especialmente resistentes, como los hechos de goma de nitrilo, cuando se maneja este compuesto. El ácido acético concentrado se enciende con dificultad en el laboratorio. Hay riesgo de flamabilidad si la temperatura ambiente excede los 39 °C (102 °F), y puede formar mezclas explosivas con el aire sobre esta temperatura (límite de explosividad: 5,4%–16%).

Los peligros de las soluciones de ácido acético dependen de su concentración. Las soluciones de más de 25% ácido acético son manejados en una campana de extracción de humos, debido al vapor corrosivo y pungente. El ácido acético diluido, en la forma de vinagre, es inocuo. Sin embargo, la ingesta de soluciones fuertes es peligrosa a la vida humana y animal en general. Puede causar daño severo al sistema digestivo, y ocasionar un cambio potencialmente letal en la acidez de la sangre.

Debido a incompatibilidades, se recomienda almacenar el ácido acético lejos del ácido crómico, etilénglicol, ácido nítrico, ácido perclórico, permanganato, peróxidos e hidróxidos.

#### **2.2.4.4 RIESGO**

- Ingestión: Dolor de garganta, vómito, diarrea, dolor abdominal, sensación de quemazón en el tracto digestivo.
- Inhalación: Dolor de garganta, dificultad respiratoria, tos.
- Piel: Irritación, graves quemaduras.
- Ojos: Irritación, visión borrosa, quemaduras profundas.

## 2.2.5 CONSIDERACIONES GENERALES DEL SISTEMA DIGESTIVO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

### 2.2.5.1 DESCRIPCIÓN

La función digestiva y de absorción depende de una variedad de mecanismos que suavizan el alimento, propiamente a través del tracto gastrointestinal y lo mezcla con la bilis y las enzimas digestivas secretadas por las glándulas salivales y pancreáticas. Algunos de estos mecanismos dependen de la propiedad intrínseca del musculo intestinal. Otros involucran la operación de los reflejos involucrando las neuronas intrínsecas del intestino, reflejos del SNC, efectos paracrinos de los mensajeros químicos y las hormonas gastrointestinales.

Las células intersticiales de Cajal alojadas en la musculatura del tracto gastrointestinal están involucradas en la generación eléctrica de marcapasos para la motilidad gastrointestinal. Esta actividad de los marcapasos se manifiesta como un ritmo lento de ondas en la membrana potencial y controla la frecuencia y la propagación de las características de la actividad contráctil del intestino (Krinke G., 2000).

Las hormonas son agentes humorales secretados por las células en la mucosa y transportadas en la circulación para influenciar las funciones del estomago, intestino y páncreas.

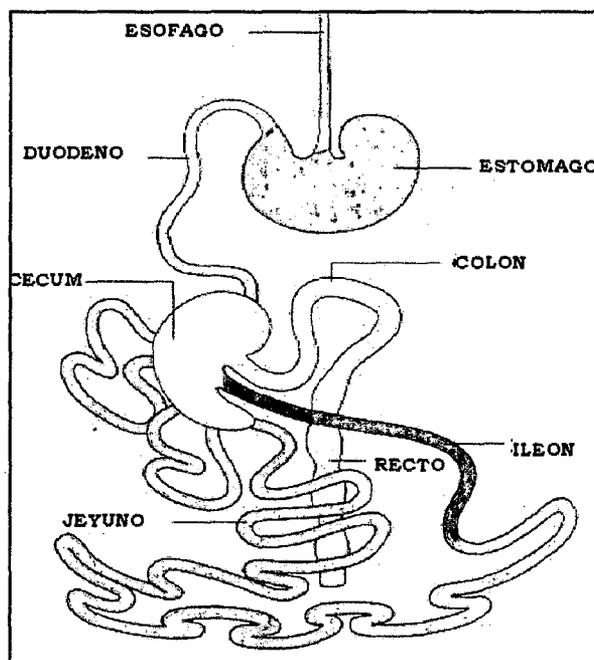


Figura N°03: Organización del tracto gastrointestinal de la rata. El esófago se conecta con estomago por la parte central (Suckow M., 2006).

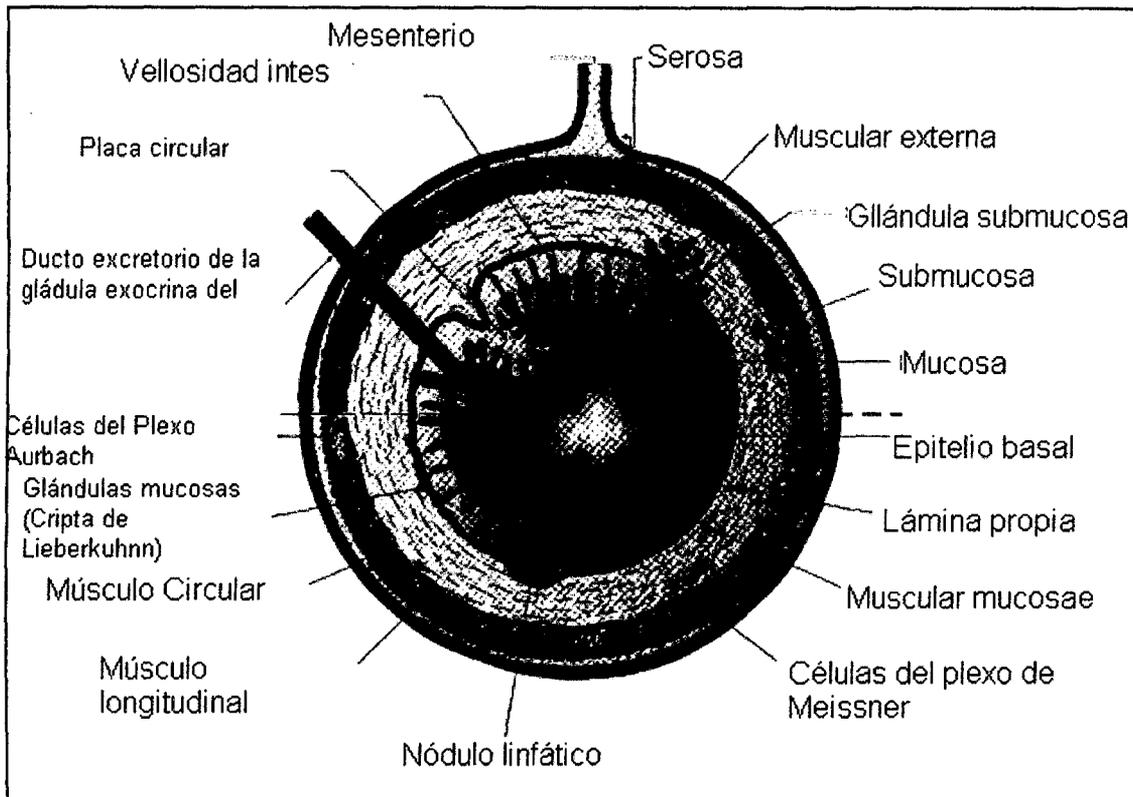


Figura N°04: Representación esquemática de las características generales de la organización del tracto gastrointestinal (Krinke G., 2000).

### 2.2.5.2 INTESTINO DELGADO (Sharp P., 1998)

La longitud y el tiempo de tránsito varía con la edad de la rata. Los valores de longitud listados abajo corresponden a adultos.

- Duodeno: 10 cm de longitud
- Yeyuno: 100 cm de longitud
- Íleon: 3 cm de longitud.

### 2.2.5.3 INTESTINO LARGO

- **Ciego.-** Tiene una pared delgada, bolsa en forma de coma con un prominente área linfoide que se encuentra en la parte lateral del apéndice.
- **Colon.-** Tiene tres divisiones: ascendente, transversa y descendente.
- **Recto.-** Región que se encuentra en el canal pélvico.

Una de las funciones básicas del sistema digestivo es la motilidad, de la cual depende el resto de sus misiones. Cada tramo del tubo digestivo tiene funciones que cumplir, estando dotado para ello de actividad motora específica y perfectamente diferenciada (Trensuerras J.A.F. 1992).

El sistema digestivo, se define de modo simple como un tubo muscular que comienza en la boca y termina en el ano. El diámetro de este tubo es variable, algunos de sus segmentos son anchos y otros delgados, puede dividirse en: esófago, estómago, intestino delgado, colon, recto y ano. Algunos de estos órganos están separados por esfínteres, los cuales regulan el vaciado del bolo alimenticio (Drucker CR, 2005).

## **2.2.6 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

### **2.2.6.1 VÍA ORAL**

Los fármacos se van a absorber en el estómago y/o, sobre todo, en el intestino delgado. Es la vía más fisiológica, aunque tiene el inconveniente de que no todos los fármacos se absorben por esta vía. Para el ratón se utiliza una jeringuilla con una aguja de calibre grueso y con la punta redondeada (cánula de administración oral). El ratón se inmoviliza y se introduce la aguja por la boca. Conviene asegurarse de que la cánula se encuentra en el estómago. La administración de fármaco, por error, en las vías respiratorias puede provocar la muerte del animal (Suckow M., 2006).

### **2.2.6.2 VÍA INTRAPERITONEAL**

Es la vía parenteral más utilizada en experimentación porque es fácil de realizar, porque la superficie de absorción es muy amplia y por tanto el tiempo de latencia muy corta. La punción se realiza en la mitad inferior del abdomen fuera de la línea alba con una aguja biselada. El ángulo de punción debe ser de 45°. Se debe aspirar para descartar que la punta se encuentre en un asa intestinal o en un vaso (Suckow M., 2006).

### **2.2.6.3 VÍA INTRAVENOSA**

Se utiliza para administración de fármacos que requieran rapidez de acción o para infusión continua. El ratón se inmoviliza en un cilindro de vidrio. La cola se coloca encima de la ranura del corcho. Se dilata la vena caudal con un algodón empapado en alcohol o por presión. Se introduce la aguja con el bisel hacia arriba con la mano derecha hasta estar en el vaso. Seguidamente se coloca la jeringa horizontalmente sobre la piel y se introduce en el vaso. Si el movimiento es correcto el émbolo comenzará a llenarse de sangre tras una ligera aspiración. La administración debe realizarse lentamente para evitar el shock de velocidad (Suckow M., 2006).

## 2.2.7 FÁRMACO PATRÓN ESPASMOLÍTICO: ATROPINA

### 2.2.7.1 FÓRMULA QUÍMICA

(8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl) 3-hydroxy-2-phenylpropanoate

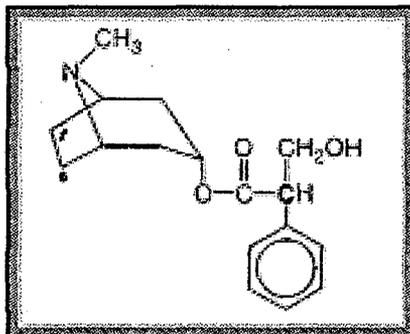


Figura N°05: Fórmula Química (Goodman&Gilman's, 2008)

**2.2.7.2 MECANISMO DE ACCIÓN:** Compite con la acetilcolina por los receptores colinérgicos muscarínicos localizados en la unión neuroefectora del parasimpático y el SNC (Rodríguez P.C. et al. 2005).

**2.2.7.3 FARMACOCINÉTICA:** La administración intravenosa producen sus efectos máximos en la frecuencia cardiaca en un lapso de 2 a 4 min. La absorción GI y la absorción intramuscular son buenas y los efectos inhibitorios máximos de la salivación se presentan en 30 min. A una hora. Se distribuye en todo el organismo incluyendo el SNC. La unión a proteínas plasmáticas es de 18%. El metabolismo es hepático por hidrólisis. Se excreta en la orina y heces entre 30 a 50% en su forma activa. T<sub>1/2</sub> bifásica, inicial 2 horas y terminal 12.5 horas (Rodríguez P.C. et al. 2005).

**2.2.7.4 EFECTOS ADVERSOS:** (Rodríguez P.C. et al. 2005)

**SNC:** cefalea, cansancio, ataxia, desorientación, alucinaciones, delirio, insomnio, excitación, mareos, agitación y confusión.

**CV:** Palpitaciones y bradicardia en dosis bajas, taquicardia en dosis altas (en forma sistémica y oral) y taquicardia en forma oftálmica.

**OS:** Fotofobia, aumento de presión intraocular, visión borrosa, midriasis, cicloplejía, etc.

**GI:** Resequedad de la boca, estreñimiento, íleo parálitico, alteraciones del gusto, náuseas, vómitos, disfagia, etc.

**GU:** retención urinaria, dificultad para orinar, impotencia.

**Hematológicos:** leucocitosis.

**Piel:** resequedad.

**Otros:** reacciones alérgicas graves incluidas anafilaxias y urticaria.

#### **2.2.7.5 INTERACCIONES:** (Rodríguez P., 2005)

**Amantadina:** Aumenta los efectos anticolinérgicos adversos. Evitar el uso simultáneo.

Potenciación con el alcohol y otros fármacos depresores del SNC.

Potenciación con fármacos de efectos anticolinérgicos.

#### **2.2.7.6 CONTRAINDICACIONES:** (Rodríguez P.C. et al. 2005).

Hipersensibilidad al fármaco o al metabisulfito de sodio, glaucoma agudo de ángulo cerrado, obstrucción GI o vesical, íleo paralítico, megacolon tóxico, atonía intestinal, etc.

La forma oftálmica está contraindicada en hipersensibilidad al fármaco o a los alcaloides de la belladona, glaucoma, adherencias entre iris y cristalino.

**Embarazo:** categoría C.

**Lactancia:** consideraciones generales.

#### **2.2.8 INDUCTOR ESPASMÓGENO: ACETILCOLINA**

(Rodríguez P.C. et al. 2005)

##### **2.2.8.1 FÓRMULA QUÍMICA**

Etanoato de 2-(N,N,N-trimetil)-etanamonio

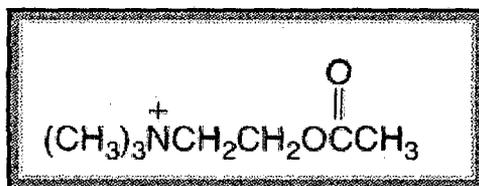


Figura N°06: Estructura química (Goodman&Gilman's, 2008)

##### **2.2.8.2 METABOLISMO**

La acetilcolina es sintetizada a partir de Colina y Acetil CoA, derivados del metabolismo de la glucosa a través de la enzima Colina acetiltransferasa.

Cuando se une a los muchos receptores de acetilcolina de las fibras musculares, la estimula para contraerse. La acetilcolina tiene su uso también en el cerebro, donde tiende a causar acciones excitatorias. Las glándulas que reciben impulsos de la parte parasimpática del sistema nervioso autónomo se

estimulan de la misma forma. Por eso un incremento de acetilcolina causa una reducción de la frecuencia cardíaca y un incremento de la producción de saliva.

#### **2.2.8.3 SÍNTESIS**

La acetilcolina se sintetiza en ciertas neuronas mediante la enzima colina acetiltransferasa también llamada ColinoAcetilasa, a partir de colina y acetil-CoA. Los compuestos orgánicos de mercurio tienen gran afinidad por los grupos sulfhídricos, por lo que se les atribuye el efecto de disfunción de la enzima colina acetiltransferasa. Esta inhibición puede producir deficiencia de acetilcolina, contribuyendo a una sintomatología de disfunciones motoras.

#### **2.2.8.4 ELIMINACIÓN**

Normalmente, la acetilcolina se elimina rápidamente una vez realizada su función; esto lo realiza la enzima acetilcolinesterasa que transforma la acetilcolina en colina y acetato. La inhibición de esta enzima provoca efectos devastadores en los agentes nerviosos, con el resultado de una estimulación continua de los músculos, glándulas y el sistema nervioso central. Ciertos insecticidas deben su efectividad a la inhibición de esta enzima en los insectos. Por otra parte, desde que se asoció una reducción de acetilcolina con la enfermedad de Alzheimer, se están usando algunos fármacos que inhiben esta enzima para el tratamiento de esta enfermedad.

#### **2.2.8.5 AGONISTAS Y ANTAGONISTAS**

La botulina actúa evitando la liberación de acetilcolina. La nicotina, al igual que la muscarina, es una sustancia colinérgica que actúa incrementando la actividad de ciertos receptores de acetilcolina. Por el contrario, la atropina y la escopolamina actúan bloqueando dichos receptores. La atropina y la escopolamina son agentes anticolinérgicos. La histamina actúa disminuyendo la acción de la acetilcolina, entonces tomando antihistamínicos estamos reduciendo su acción con lo que mejoraría algunas enfermedades como las distonías que se caracterizan por una contracción continua de los músculos.

#### **2.2.8.6 PROPIEDADES**

Debido a lo difuso de sus acciones y su rápida hidrólisis por la acetilcolinesterasa, la acetilcolina tiene virtualmente ninguna aplicación terapéutica. Farmacológicamente, la acetilcolina tiene diversos efectos en ciertos órganos y sistemas del cuerpo.

- Sistema cardiovascular: vasodilatación, disminución de la frecuencia cardíaca (efecto cronotrópico negativo), disminución de la velocidad de conducción del nodo sinoauricular y auriculoventricular y una disminución en la fuerza de contracción cardíaca (efecto inotrópico negativo).
- Tracto gastrointestinal: provoca contracción del mismo. Estos efectos pueden producir náusea, vómito y diarrea.

### 2.2.8.7 ENFERMEDADES RELACIONADAS

La miastenia gravis es una enfermedad autoinmune, caracterizada por debilidad muscular y fatiga. Ocurre cuando el cuerpo produce de forma inapropiada anticuerpos contra los receptores de acetilcolina, y de este modo inhibe las transmisiones de señales de la acetilcolina. Los fármacos que inhiben la acetil colinesterasa (p.e. neostigmina o fisostigmina) son efectivas para el tratamiento de esta afección. La distonía es una enfermedad caracterizada por una contracción muscular permanente. Puede estar provocada por una exceso de acetil colina a nivel muscular. La toxina botulínica es un anticolinérgico inyectable. Los astihistamínicos inhiben la histamina con lo que se produce una disminución de la acción de la acetil colina.

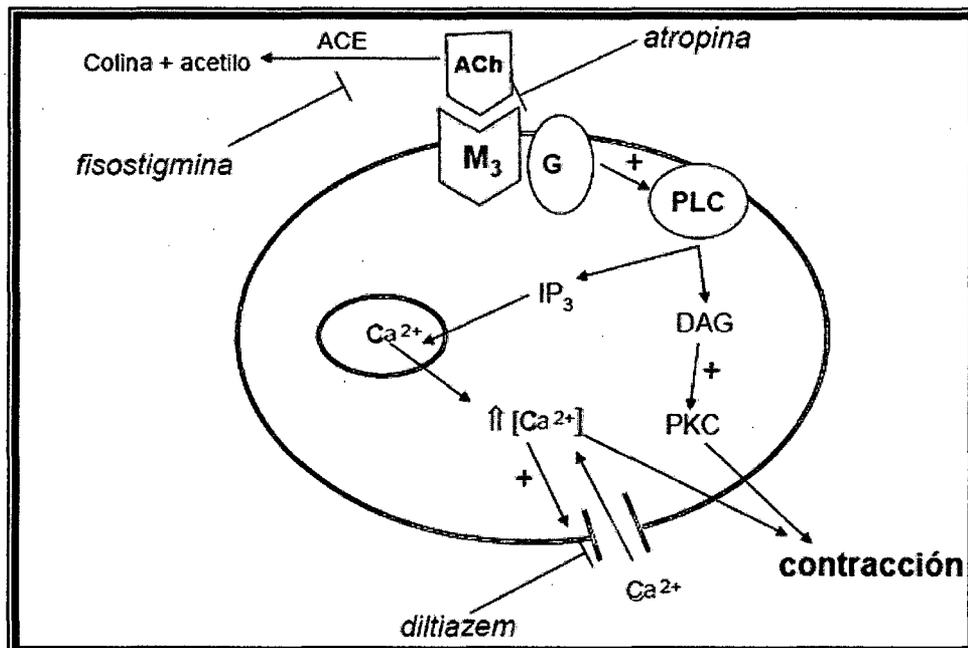


Figura Nº 07: Mecanismo de acción de acetilcolina, atropina, diltiazem y fisostigmina (Barastegui AC, 1976)

## **2.2.9 SISTEMA DE NEUROTRANSMISIÓN COLINERGICA**

La acetilcolina es la sustancia encargada de la transmisión de impulsos nerviosos de las neuronas pre a las postganglionares, en los ganglios del sistema nervioso autónomo. A nivel del sistema nervioso parasimpático también media la transmisión entre la neurona postganglionar y el órgano efector. Además, es el mediador de la transmisión nerviosa de la placa motora terminal.

Se encuentra en las neuronas motoras de la espina dorsal, en las neuronas preganglionares del SNA y en las neuronas postganglionares del SNP. Los receptores colinérgicos se dividen en nicotínicos y muscarínicos (Katzung BG, 2007).

### **2.2.9.1 RECEPTORES NICOTÍNICOS:**

Son proteínas pentaméricas compuestas de subunidades heterólogas: hay varios subtipos, de estos, los del sistema nervioso central existen también como pentámeros, pero compuestos por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ; y cada subunidad parece estar codificada por genes diferentes. El receptor nicotínico de la ACh consta de cinco subunidades ordenadas alrededor de un pseudo eje de simetría.

Se han identificado al menos dos tipos de receptores nicotínicos: los N1 presentes en los ganglios del sistema nervioso autónomo, y los N2 en la placa terminal muscular.

Se unen a los canales iónicos, son más rápidos y generalmente excitatorios, se bloquean por el curaré y se estimulan por la nicotina y la acetilcolina.

Actúa mediante despolarización directa de la membrana postsináptica, al activar canales de sodio. Las sinapsis nicotínicas colinérgicas actúan en las uniones neuromusculares en ciertos ganglios y en lugares centrales del sistema nervioso central. El receptor nicotínico de la acetilcolina es el receptor de neurotransmisión mejor caracterizado.

La exposición continuada de receptores nicotínicos a agonistas lleva a una disminución de la respuesta, incluso aunque la concentración de agonistas disponible al receptor no varíe. La pérdida de respuesta por una exposición previa al agonista se llama desensibilización (Katzung BG, 2007).

### 2.2.9.2 LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS

Constituyen el tipo predominante de receptor colinérgico en el cerebro, donde parece hallarse involucrados en la memoria y aprendizaje; se ha reportado que estos receptores están involucrados en los trastornos afectivos, como depresión y manía. Estos receptores son glucoproteínas pertenecientes a una super familia de glucoproteínas receptoras cuyas funciones están mediadas por interacción con proteínas G. Se han detectado 5 subtipos de receptores muscarínicos, de estos los más conocidos son el  $M_1$  y el  $M_2$ .

Se unen a la proteína G, son más lentos, son excitatorios o inhibitorios, son bloqueados por la atropina y estimulados por la muscarina, pilocarpina y acetilcolina.

Parecen actuar a través de GMP cíclico como segundo mensajero, las sinapsis muscarínicas se hallan en el músculo liso, músculo cardiaco, ganglios y muchas otras regiones del sistema nervioso central, los receptores muscarínicos superan a los nicotínicos en número, en un factor de 10 a 100.

En cuanto a los receptores muscarínicos, hay que decir que el receptor nicotínico es más semejante a otros canales iónicos asociados a ligandos (ej. el receptor del GABA) que al receptor muscarínico. El receptor transduce su señal a través de las membranas por interacción con proteínas adheridas a GTP (Katzung BG, 2007).

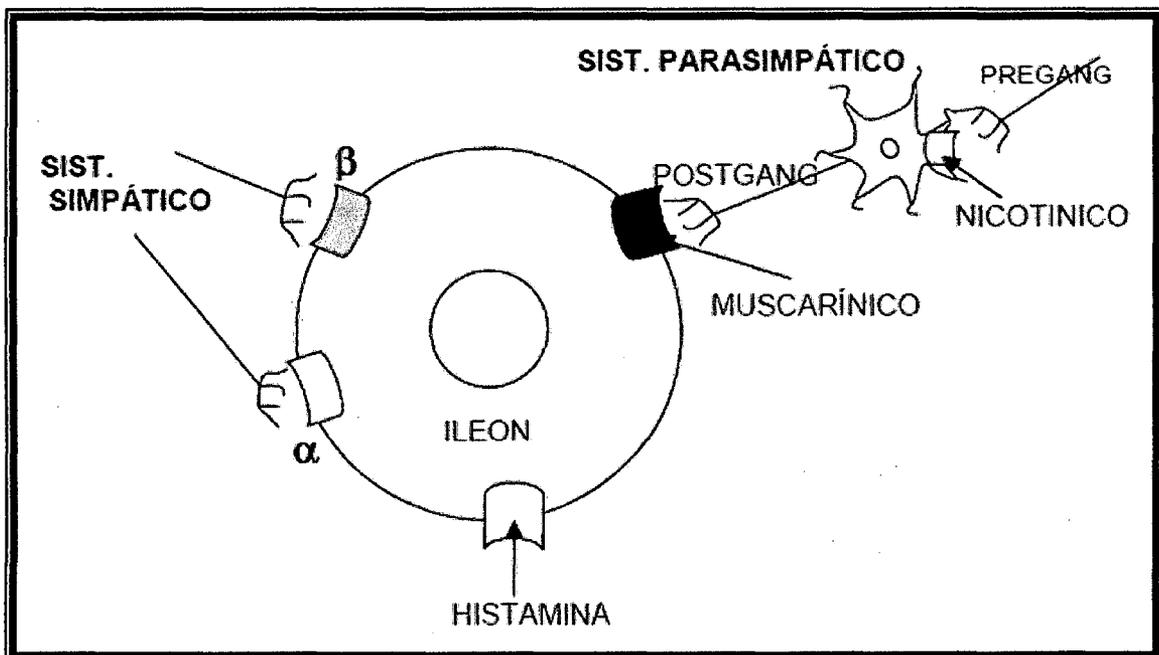


Figura N° 08: Inervación de la musculatura lisa del íleon (Barastegui AC, 1976).

### **2.2.10.1 BAÑO DE ÓRGANO (Chávez S. JD y Sucari M. FM, 2009)**

Se denomina así al conjunto de materiales necesarios para realizar experiencias en órganos animales. En realidad, son varios elementos que constituyen un sistema que intenta reproducir las condiciones físico-químicas fisiológicas necesarias para que el órgano responda.

Los fenómenos homeostáticos en el órgano aislado tiene un nivel menos elevado que en el organismo entero, ya que en la mayoría de las regulaciones reflejas se suprimen y solo quedan los fenómenos nerviosos, atribuibles a los plexos intramurales existentes, sin embargo, se observa la existencia de mecanismos de autorregulación, cuya importancia no debe ser ignorada.

En lo que concierne a la experimentación farmacológica, es importante anotar que el órgano aislado se encuentran en condiciones muy diferentes a las del órgano in situ en cuanto a los aportes nutritivos y muy especialmente a lo referente a las posibilidades de recuperación frente a las diversas formas de estímulo a las que pueden ser sometidos.

La temperatura inferior a la temperatura óptima, aumenta el tiempo de latencia y la duración de las respuestas en la fibra muscular lisa.

Entre los factores químicos más importantes, debemos destacar la composición de los medios con que se pretende nutrir al órgano durante la experiencia y sobre todo el balance de los iones sodio, potasio, calcio y el equilibrio ácido-básico, estos factores también pueden acarrear modificaciones en la reactividad de los diferentes órganos.

Igualmente es importante mantener un pH óptimo y concentraciones de oxígeno y anhídrido carbónico adecuadas en el medio de cultivo. Finalmente debe tenerse en cuenta que los diferentes órganos que pueden ser utilizados en experimentación farmacológica están constituidos por tres clases diferentes de tejido muscular: liso, estriado y cardiaco; que al cumplir una función particular nos indican el tipo de estudio que sobre ellos podemos realizar.

El equipo para órganos aislados comprende un conjunto de materiales necesarios para realizar experiencias en órganos en animales.

En realidad, son varios elementos que constituyen un sistema que intenta reproducir las condiciones físico-químicas fisiológicas necesarias para que el órgano responda.

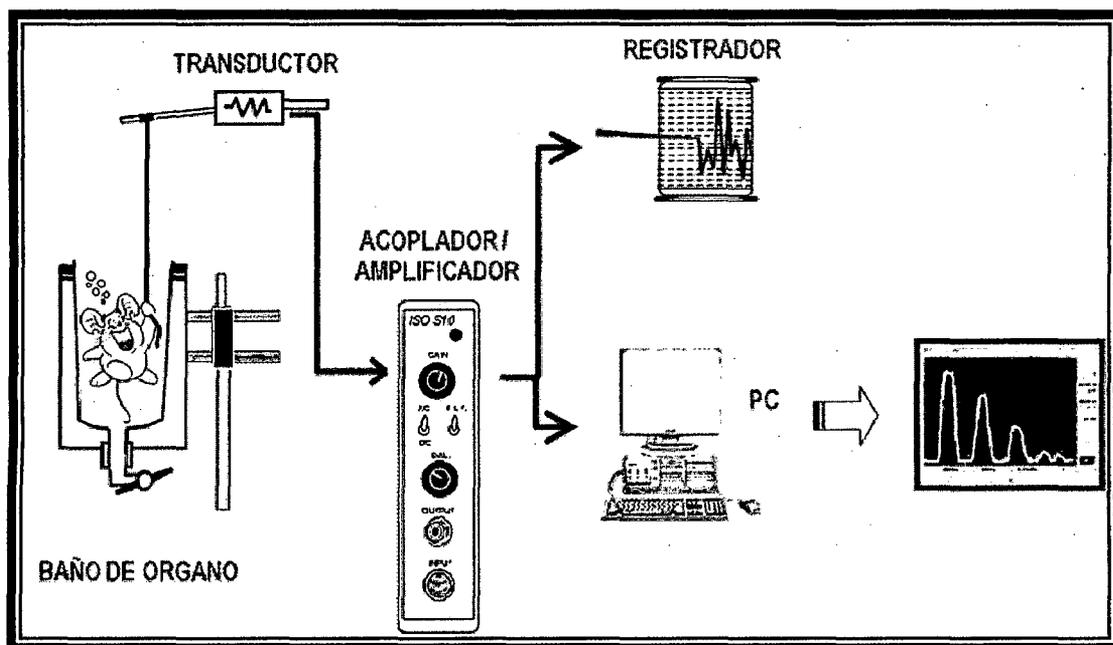


Figura N° 09: Esquema de los elementos necesarios para la realización de un experimento en órgano aislado (Penzo F., 2003).

**Copa de Tejido**, es un vaso de cristal de volumen fijo (25 ml), en el que se dispone la pieza de tejido mediante un sistema de sujeción (varilla). Esta copa se llena de solución nutritiva y se sitúa inmersa en el baño propiamente dicho.

Recibe una entrada para aireación y una conducción regulable para el medio de incubación; para cambiar esta solución se recurre a un rebosamiento de la copa y drenaje inferior o vaciado. En cualquier caso se debe comprobar que el llenado de la copa se efectúa siempre al mismo nivel.

Los extractos se administran con una pipeta o una jeringa en el interior de la copa. El volumen de solución del extracto añadido total no debe ser superior al 10% del volumen total de la copa.

**Aireación**, se realiza a través de conducciones adecuadas, regulables, a partir de aireadores (aire) o botellas de gas (oxígeno o carbógeno, que contiene 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Habitualmente se utiliza carbógeno, salvo en caso de mayor requerimiento metabólico (músculo esquelético) en el que se utiliza oxígeno. Cuando el medio contiene NaHCO<sub>3</sub> como tampón, conviene utilizar carbógeno, ya que el oxígeno puro haría perder CO<sub>2</sub> y el pH se elevaría hasta valores mayores de 8, con el consiguiente deterioro de la actividad del órgano.

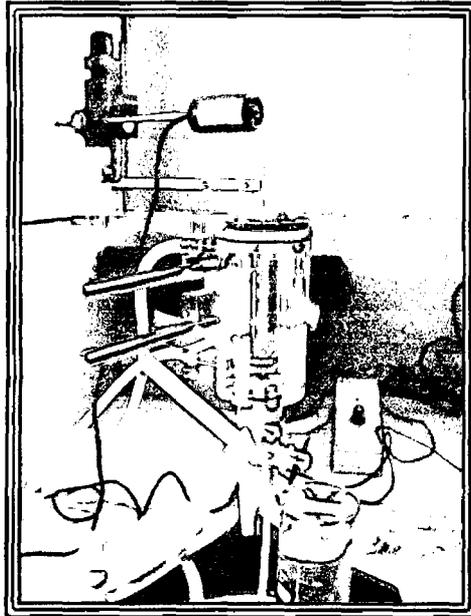


Foto N° 02: Baño de órgano de 25 mL de volumen, se observa el conducto de oxígeno.

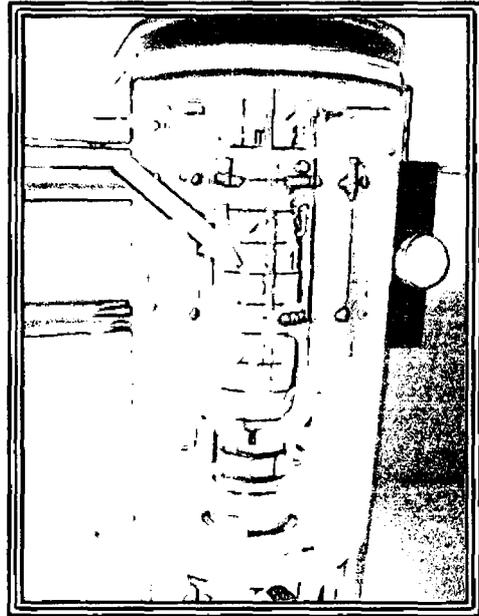


Foto N° 03: Baño de órgano en funcionamiento con órgano montado y suministro de oxígeno.

**Temperatura**, el control de la temperatura se realiza mediante un baño maría con un termostato, el cual circula alrededor de la copa de tejidos. Se debe evitar administrar las disoluciones de los extractos aún frías.

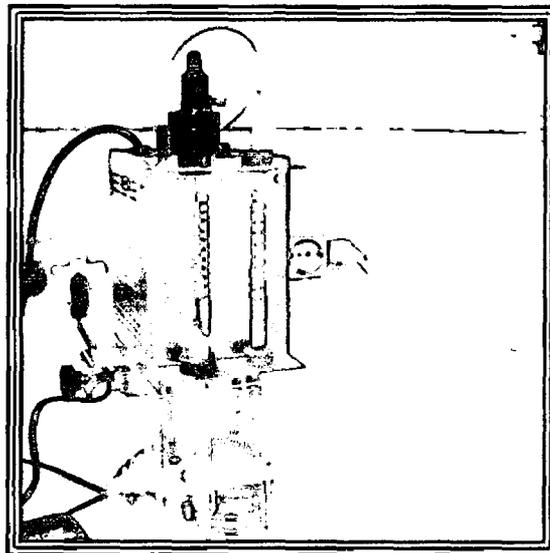


Foto N° 04: Termostato que regula la temperatura del Baño de órgano a 37°C.

**Solución salina fisiológica**, se entiende por solución salina fisiológica (SSF), aquella diseñada para mantener la viabilidad del órgano aislado.

Diferentes preparados exigen distintas SSF de acuerdo a las características de cada uno. El principio que determina la composición de la SSF es la

aproximación artificial a las condiciones fisiológicas del entorno en que se encuentra dicho órgano o tejido cuando forma parte del organismo.

Se deben, pues, tratar de respetar los siguientes parámetros:

- Composición electrolítica
- Fuente de energía (metabólica)
- Osmolaridad
- Temperatura
- pH
- Tensión mecánica
- Presión parcial de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>

Como fuente de energía se utiliza la dextrosa y más raramente otros sustratos como sucrosa o aminoácidos.

**Sistema de registro**, está dotado de amplificador y registrador. Los cambios de tensión, es decir la contracción o relajación del músculo liso del preparado utilizado, deben ser adecuadamente amplificados a fin de obtener un registro que se pueda medir. El transductor isométrico permite la traducción de los cambios en la tensión mecánica originados por la contracción del músculo liso, en cambios de corriente eléctrica, que posteriormente serán aumentados por un amplificador al que va conectado.

Este a su vez envía su señal a un registrador. La señal llega a un ordenador, que gracias al programa Chart for Windows, (versión 5), registra en la pantalla la actividad mecánica del músculo (la señal eléctrica se transforma en un mensaje digital que comprende el ordenador).

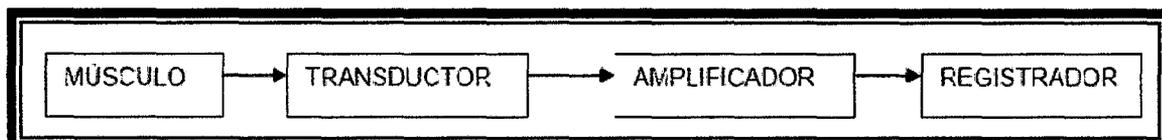


Figura Nº 10: Ruta seguida por la señal en el equipo de órgano aislado (Barastegui AC, 1976).

#### 2.2.10.2 VENTAJAS DE LA UTILIZACIÓN DEL ÓRGANO AISLADO: (Guía de los Trabajos Prácticos. Escuela Luis Razetti, 2006)

- Posibilita la cuantificación precisa de la respuesta o efecto (se elimina la interacción con otros órganos y sistemas).
- No hay fenómenos reflejos (neuronal) o retroalimentación humoral.
- No hay influencia de la farmacocinética (no obstante, el metabolismo de la droga puede estar presente).

- Conocimiento exacto de la concentración del fármaco sin interferencias de procesos de acceso y disposición.

### **2.2.10.3 INCONVENIENTES DE LA UTILIZACIÓN DE UN ÓRGANO AISLADO:**

(Guía de los Trabajos Prácticos. Escuela Luis Razetti, 2006)

Aunque se corresponde con la acción de un fármaco, la información no siempre se puede extrapolar al organismo entero.

Existe una gran variedad de órganos y tejidos que se pueden trabajar "in vitro", midiendo por ejemplo, la capacidad contráctil de éstos (útero, intestino delgado, músculo esquelético, conducto deferente, corazón y vasos sanguíneos, estómago, músculo liso de las vías aéreas).

Sin embargo la técnica exige una gran minuciosidad y un correcto montaje del preparado. A pesar de intentar mantener las condiciones fisiológicas, debemos tener en cuenta que el órgano va a estar en un medio artificial.

### **2.2.10.4 SISTEMA POWERLAP (Chávez S. JD y Sucári M. FM, 2009)**

PowerLab es un sistema integrado de hardware y software diseñado para registrar, mostrar y analizar los datos experimentales. El sistema consta de una unidad de grabación PowerLab y programas de software (como Chart y Scope) que se ejecutan en la computadora que está conectada al PowerLab. El PowerLab es capaz de hacer sus propios cálculos y realizar muchas tareas durante el registro de datos.

Una vez que el PowerLab transfiere los datos a la computadora, estos están disponibles para su visualización, manipulación, impresión, almacenamiento y recuperación.

Chart junto con el PowerLab, tienen la capacidad de registrar gráficos, dependiendo de su hardware, puede grabar hasta 16 canales simultáneamente, con velocidades de hasta 200 000 muestras por segundo.

Chart permite gran flexibilidad en mostrar los datos. Puede cambiar las líneas, patrones y colores de la pantalla de datos. Puede ampliar o reducir la escala horizontal y vertical, dividir la pantalla, cambiar el tamaño de cada uno de los canales de mostrar u ocultar los canales.

Se pueden ver las tendencias generales en la grabación, o un pequeño vistazo a la sección de datos en gran detalle.

Chart ofrece una amplia gama de cálculos y hace más fácil extraer los parámetros y estadísticas de los datos. Puede medir cantidades absolutas o relativas y calcular, almacenar y exportar más parámetros con el DataPad. Puede vincular el gráfico de datos o cuadro de datos a otras aplicaciones que el apoyo de vínculos como Microsoft Excel.

Puede combinar aritméticamente datos en diferentes canales, sin problemas, estos pueden ser realizados durante la toma de muestras o después de la grabación, dependiendo de sus requisitos. También puede utilizar la ventana del espectro para analizar las componentes de frecuencia de sus datos.

### **2.2.11 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS**

**Algesia:** Disminución de la respuesta al dolor, estado en que se interpreta (percibe) que los estímulos dolorosos duelen.

**Algésico:** Sustancia que produce dolor.

**Analgésico:** Sustancia (sintética o natural) que mitiga el dolor.

**Antinocicepción:** Respuesta neural baja o nula frente a una injuria tisular.

**Contorsión:** Es la contracción de la musculatura abdominal junto con una elongación de las extremidades posteriores.

**Espasmolítico:** Que suprime o cura los espasmos o contracciones involuntarias persistentes de un músculo o grupo muscular.

**Espasmógeno:** Ocasiona que el músculo se contraiga de manera intermitente, dando como resultados el espasmo.

**Estímulo nocivo:** Un estímulo nocivo es el que daña los tejidos normales.

**Efecto analgésico:** Evalúa la capacidad de un extracto vegetal para evitar la transmisión del dolor al SNC, o disminuir sensaciones primarias (tacto, vibración, etc).

**Método:** Modo ordenado de obrar o hablar; orden que se siguen en las ciencias, principios para aprender una ciencia o arte.

**Nociceptor:** Un receptor preferencialmente sensible para un estímulo nocivo o para un estímulo el cual podría llegar a ser dañino si se prolonga.

**Nocicepción:** Es la respuesta neural que aparece tras la injuria tisular. Implica la transmisión y procesamiento de la información sensorial relacionada a la injuria y sus respuestas reflejas medibles.

**Técnica:** Conjunto de procedimientos de un arte o ciencia, pericia para el manejo y uso de procedimientos.

# CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 MATERIALES

### 3.1.1 MATERIALES BIOLÓGICOS

#### **Muestra vegetal:**

- Se utilizó 150g del corno subgloboso de la especie *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa).

#### **Animales de experimentación:**

- 15 ratas macho de la especie *Rattus norvegicus* de 3 meses de edad con peso de  $300\pm 50$ g.

Procedentes del bioterio de la Universidad Católica Santa María (anexo N° 03)

- 20 ratones de la especie *Mus musculus* de 3 meses de edad con peso de  $25\pm 5$ g.

Procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud (anexo N° 02).

### 3.1.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- |  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| ➤ Tubos de ensayo de 10 ml.<br>(Pirex)           | ➤ Pipetas pasteur (Pirex)            |
| ➤ Vasos de precipitados 20,<br>50 150ml. (Pirex) | ➤ Gradillas                          |
| ➤ Embudos (Piréx)                                | ➤ Baguetas (Pirex)                   |
|  | ➤ Termómetros digital<br>(Termostat) |

- Probeta de 100 ml. (Pirex)
- Pizetas
- Mortero (Porcelana)
- Fiolas 25, 100 y 250 ml. (Pirex)
- Placas Petri (Pirex)

### 3.1.3 REACTIVOS

- Agua destilada
- Etanol 70°
- Etanol 96°
- Bencina
- Reactivo de Benedict
- Reactivo de Dragendorf
- Reactivo Acetato de Cobre
- Reactivo de Mayer
- Acido clorhídrico ©, 1% y 5%
- Hidróxido de Sodio al 20%.
- Hidróxido de Potasio al 20%.
- Solución de ninhidrina al 1%.
- Limaduras de magnesio.
- Cloruro férrico al 1%.
- Cloroformo p.a. (Merck)
- Acido sulfúrico © p.a. (Merck)
- Acido pícrico p.a. (Merck)
- Eter etílico p.a. (Merck)
- NaCl p.a. (Merck)
- KCl p.a. (Merck)
- NaHCO<sub>3</sub> p.a. (Merck)
- Mg Cl<sub>2</sub> p.a. (Merck)
- CaCl<sub>2</sub> p.a. (Merck)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> p.a. (Merck)
- Glucosa

### 3.1.4 FÁRMACO PATRÓN

**ANALGÉSICO:** Indometacina Tab. 25 mg.

**ESPASMOLÍTICO:** Atropina 1mg/ml i.v.

### 3.1.5 INDUCTORES

**ALGÉSICO:** Acido acético glacial al 3%

**ESPASMÓGENO:** Bromuro de Acetilcolina 226.11 p.a.

### 3.1.6 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Balanza analítica sensible al 0.001 gr.
- Balanza para pesar ratas (OHAUS Pioner)
- Baño maría con termostato (Termotrionic)
- Transductor (Isométrico 5-25g)
- Cocina eléctrica

- Estufa 100°C
- Equipo de órgano aislado (PanLab Model N° TRI201)

### 3.1.7 MATERIALES DE CAMPO

- |                       |                                |
|-----------------------|--------------------------------|
| ➤ Libreta de campo    | ➤ Cordel                       |
| ➤ Bolsas de papel     | ➤ Aireador                     |
| ➤ Cámara fotográfica. | ➤ GPS o Altímetro              |
| ➤ Cuaderno de apuntes | ➤ Hojas de papel periódico     |
| ➤ Lapiceros           | ➤ Plumones de tinta indeleble. |
| ➤ Etiquetas           | ➤ Cartón cartulina             |

### 3.1.8 MATERIALES DE GABINETE

- Computadora
- Bibliografía especializada
- Fotocopias
- Papel bond A4

### 3.1.9 OTROS

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| ➤ Algodón                   | ➤ Frasco de vidrio oscuro.  |
| ➤ Barbijo                   | ➤ Soporte universal         |
| ➤ Gorros                    | ➤ Gasa                      |
| ➤ Guantes estériles         | ➤ Cánula nasogástrica       |
| ➤ Frascos viales            | ➤ Cronómetro                |
| ➤ Cinta masking.            | ➤ Equipo de disección       |
| ➤ Jeringas tuberculina 1 ml | ➤ Hilo de sutura negra N° 3 |
| ➤ Jeringas de 5 y 10 ml.    | ➤ Regla de 10 cm.           |
| ➤ Molino de granos          | ➤ Jaula para ratones        |

### 3.1.10 LUGAR DE EJECUCIÓN DEL TRABAJO DE TESIS

- Recolección de la especie en estudio realizada en la comunidad de Janac Chuquibamba, distrito de Lamay, Provincia de Calca, durante los meses de Febrero a Marzo del año 2010.
- Pruebas preliminares y efecto analgésico *in vivo*, realizadas en los laboratorios de farmacobotánica y farmacología de la UNSAAC, durante

los meses de Mayo a Julio del año 2010.

- Efecto espasmolítico *ex vivo* fue realizada en el laboratorio de farmacología de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa en los meses de Agosto a Setiembre del año 2010.

### 3.2 DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.2.1 TIPO DE ESTUDIO

- **Determinación del efecto analgésico *in vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en animales de experimentación.**

Estudio de tipo correlacional que determina el efecto analgésico *in vivo* con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en ratones *Mus musculus*, previa contorsión inducida con ácido acético al 3%.

**Diseño:** Cuasi-experimental únicamente con grupo control y sin pre-prueba.

G <sub>1</sub>	-	Y	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	Y	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>2</sub>	Y	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>3</sub>	Y	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>4</sub>	Y	O <sub>5</sub>

#### **Leyenda:**

G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub>: Grupos que constan de 04 ratones macho *Mus musculus*, a los que se les administraron solución fisiológica, Indometacina, extractos 12.5 mg/Kg, 25 mg/Kg y 50 mg/Kg respectivamente.

Y: Inductor de contorsión (Acido acético glacial 3%, 0.25 mL (intraperitoneal).

-: Control (Solución fisiológica 0.5 ml vía oral).

X<sub>1</sub>: Patrón (Indometacina 10mg/Kg por peso vía oral).

X<sub>2</sub>: Extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) 12.5 mg/Kg vía oral.

X<sub>3</sub>: Extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) 25 mg/Kg. vía oral.

X<sub>4</sub>: Extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) 50 mg/Kg. vía oral.

O<sub>1</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, O<sub>4</sub>, O<sub>5</sub>: Medición del número de contorsiones abdominales que presenta el animal de experimentación.

➤ **Determinación del efecto espasmolítico ex vivo del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en animales de experimentación.**

Estudio de tipo correlacional que determina el efecto espasmolítico ex vivo con el extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en segmentos contraídos de íleon de ratas macho *Rattus norvegicus*, por inducción con acetilcolina.

**Diseño:** Cuasi-experimental con pre-prueba, post-prueba y grupo control.

G <sub>1</sub>	O <sub>1</sub>	Z	-	O <sub>2</sub>
G <sub>2</sub>	O <sub>3</sub>	Z	X <sub>1</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>3</sub>	O <sub>5</sub>	Z	X <sub>2</sub>	O <sub>6</sub>
G <sub>4</sub>	O <sub>7</sub>	Z	X <sub>3</sub>	O <sub>8</sub>
G <sub>5</sub>	O <sub>9</sub>	Z	X <sub>4</sub>	O <sub>10</sub>

**Leyenda:**

G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub>: Grupos que constan de 03 segmentos de íleon de ratas macho *Rattus norvegicus*, los cuales recibieron el siguiente tratamiento: solución fisiológica, atropina, extractos de 50 µg/mL, 100 µg/mL y 200 µg/mL.

O<sub>1</sub>, O<sub>3</sub>, O<sub>5</sub>, O<sub>7</sub>, O<sub>9</sub>: Medición de la contracción inducida del íleon de rata.

Z: Inductor de contracción (Acetilcolina a dosis acumulativa).

-: Control (Sin estímulo).

X<sub>1</sub>: Patrón (Atropina 10<sup>-4</sup> M).

X<sub>2</sub>: Extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) 50 µg/mL

X<sub>3</sub>: Extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) 100 µg/mL

X<sub>4</sub>: Extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) 200 µg/mL

O<sub>2</sub>, O<sub>4</sub>, O<sub>6</sub>, O<sub>8</sub>, O<sub>10</sub>: Medición de la contracción del íleon de rata inducido con acetilcolina.

### **3.2.2 VARIABLES**

#### **3.2.2.1 VARIABLES IMPLICADAS**

##### **3.2.2.1.1 VARIABLE INDEPENDIENTE**

**Dosis del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en animales de experimentación.**

**Definición conceptual:** Es la cantidad de extracto disuelto en solución fisiológica o agua destilada administrado por vía oral, dosificado por kilogramo de peso corporal del animal de experimentación (Villar del Fresno AM., 1999).

##### **Definición operacional**

**Naturaleza** : Cuantitativa

**Escala de medición** : Razón

**Unidad de medida** : mg/ml

**Medición** : Directa

**Instrumento de medida** : Balanza analítica de precisión 0.001 g.

**Procedimiento:** La dosis a administrar se obtuvo de acuerdo al peso el animal a ensayar luego se pesó el extracto y se diluyó con cloruro de sodio 0.9%, obteniéndose tres concentraciones diferentes (Lock U., 1994 y Villar del Fresno AM., 1999).

##### **3.2.2.1.2 VARIABLE DEPENDIENTE**

###### **A. Efecto analgésico**

**Definición conceptual.-** Ausencia de dolor en respuesta a estímulos que normalmente provocarían dolor. Sustancia (sintética o natural) que inhibe las reacciones del cuerpo a estímulos dolorosos o percepción de dolor (Nagle Hitner, 2007).

##### **Definición operacional**

**Naturaleza** : Cuantitativa

**Escala de medición** : Razón

**Unidad de medida** : Número de contorsiones abdominales.

**Medición** : Indirecta

**Instrumento de medida** : Observación

**Procedimiento** : El extracto, la sustancia de referencia y el vehículo se administraron por vía intraperitoneal, 30 minutos antes de la inducción de

dolor, cada animal se aísla en una caja y se observa el número de contorsiones abdominales que realiza el animal durante 20 minutos (Collier HDJ,1968, CYTEC,1995).

### **B. Efecto espasmolítico**

**Definición conceptual.-** Fármaco u otro tipo de agente que previene o rompe los espasmos de la musculatura lisa, como por ejemplo la del útero, el tubo digestivo, intestino o el aparato urinario (Mosby, 2000).

#### **Definición operacional**

**Naturaleza** : Cuantitativa

**Escala de medición** : Razón

**Unidad de medida** : Disminución de la contracción.

**Medición** : Indirecta

**Instrumento de medida** : Equipo amplificador y transductor isotérmico.

**Procedimiento:** Placas petri con solución de Tyrode, oxigenado con segmentos de 2 cm de íleon de rata; estos segmentos de íleon se introduce en el equipo de baño de órganos llena de solución nutriticia conectados al amplificador y transductor isométrico, el que dará lectura de la contracción del órgano (Chávez S. JD y Sucari M. FM, 2009).

**Cuadro N° 01: Resumen de variables**

DEFINICION OPERACIONAL	VARIABLE		
	INDEPENDIENTE	DEPENDIENTE	
	Extracto hidroalcohólico de <i>Peperomia verruculosa</i> Dahlstedt ex A.W. Hill.	Efecto analgésico in vivo	Efecto espasmolítico ex vivo
NATURALEZA	Cuantitativa	Cuantitativa	Cuantitativa
ESCALA DE MEDICION	Razón	Razón	Razón
UNIDAD DE MEDIDA	mg/mL	Número de contorsión	Disminución de contracción
MEDICIÓN	Directa	Indirecta	Indirecta
INSTRUMENTO DE MEDIDA	Balanza analítica de precisión 0.001 g	Observación	Equipo amplificador y transductor isométrico
EXPRESION FINAL	mg/mL	% de inhibición de la contorsión	% de disminución de contracción

Fuente: Elaboración propia

### 3.2.2.2 VARIABLES NO IMPLICADAS

#### 3.2.2.2.1 VARIABLES INTERVINIENTES

##### A. De la muestra vegetal

Tiempo de recolección : Enero a Marzo  
 Estadío de crecimiento : En floración  
 Altitud de recolección : 3800 m.s.n.m.  
 Temperatura de secado : Temperatura ambiente 13°C.

##### B. De la extracción

Tipo de extracción : Hidroalcohólica  
 Solvente, concentración de solvente : Alcohol de 70%  
 Temperatura de maceración : Temperatura ambiente 13°C.  
 Tiempo de maceración : 15 días.  
 Agitación periódica de la maceración : Cada 24 horas.

### **C. De los animales de experimentación**

**Sexo:** Variable en sujeto nominal macho, en este estudio se utilizaron ratas macho de la especie *Rattus norvegicus* y ratones macho de la especie *Mus Musculus*.

**Peso:** Variable de sujeto que se define como la masa que presenta cada unidad experimental el peso promedio de los sujetos de experimentación es de  $25 \pm 5$ g. (ratones) y de  $300 \pm 50$ g. (ratas).

**Edad:** Variable de sujeto cuya definición es el tiempo transcurrido desde el nacimiento de la unidad experimental hasta el momento de la experimentación.

**Lugar de crianza:** Los ratones y las ratas fueron criados en un ambiente con ventilación adecuada y una temperatura promedio de 20° C. manteniendo buenas prácticas de higiene.

### **D. Del ambiente**

Temperatura ambiente de laboratorio a la que se realizaron las distintas pruebas. La temperatura promedio es de 13° C.

#### **3.2.2.2 VARIABLES SUBJETIVAS**

En la presente investigación se trabajó cumpliendo las exigencias a simple ciego.

### **3.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN**

#### **3.3.1 DE LA MUESTRA VEGETAL**

##### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Se recolectó plantas íntegras de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill., en floración libres de hongos, polvo e insectos.

##### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

Se excluyeron las muestras vegetales que presentan las partes aéreas dañadas o contaminadas con hongos, polvo, insectos, manchas, etc.

#### **3.3.2 DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

##### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

Se incluyeron ratones albinos machos *Mus musculus* de tres meses de edad, con peso promedio de  $25 \pm 5$  gr, para la evaluación del efecto analgésico *in vivo* inducido por ácido acético glacial al 3%.

Se incluyeron ratas albinas machos *Rattus norvegicus* de tres meses de edad, con peso promedio de  $300 \pm 50$  g, para la evaluación del efecto espasmolítico *ex vivo* inducido por acetilcolina.

### 3.4 PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

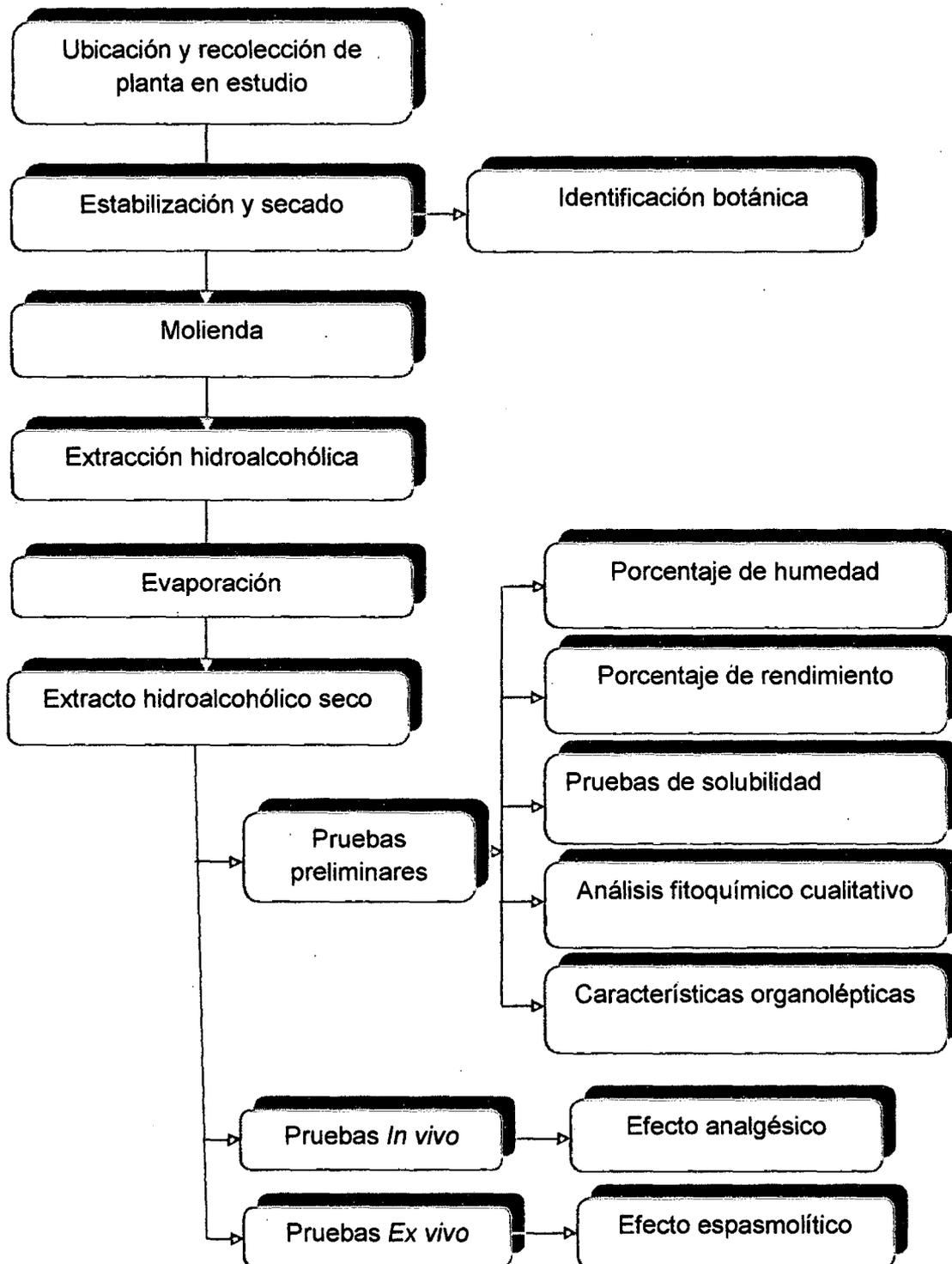


Figura N° 11: Flujograma de la Investigación (Elaboración propia).

### 3.4.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

**Recolección.-** La especie vegetal en estudio *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), fue recolectada en la Comunidad de Janac Chuquibamba, Distrito de Lamay, Departamento de Cusco, a 3800 m.s.n.m. en el mes de febrero del 2010; en su estado silvestre, en bolsas de papel periódico.



Foto N° 05: Zona de recolección a 3800 m.s.n.m.



Foto N° 06: Proceso de recolección y limpieza, sobre los a 3800 m.s.n.m.

**Selección.-** El material fue cuidadosamente seleccionado, tomando en cuenta que las partes aéreas (hojas, tallos, flores) estén enteras y libres de partículas de polvo, manchas, insectos u hongos. Se procedió a la separación de las partes aéreas y raíz, para lograr un adecuado secado del corno subgloboso se cortaron en pequeños trozos.

**Desecación.-** Se realizó en una mesa con papel periódico, en ambiente sombreado y ventilado.

**Molienda.-** Una vez obtenida la muestra seca se procedió a la molienda en un molino de granos (Marca Corona).

**Maceración.-** Molida la muestra se procedió a macerar en etanol al 70% con agitación cada 24 horas por un periodo de 15 días a temperatura ambiente, realizando tres extracciones hasta agotamiento (5, 10 y 15 días), y los filtrados obtenidos fueron concentrados a sequedad a 37 °C para finalmente obtener el extracto seco.

### 3.4.2 PORCENTAJE DE HUMEDAD

La determinación de la humedad se realizó por triplicado en placas Petri conteniendo 10 gramos de muestra fresca trozada, las cuales fueron introducidas a la estufa a una temperatura de 40°C hasta la conseguir un peso constante; para luego determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula:

$$\%H = \frac{M1-M2}{M1} \times 100 \dots\dots \text{Ec. 01}$$

Donde:

%H = Porcentaje de Humedad

M1 = Peso de muestra fresca

M2 = Peso de muestra seca

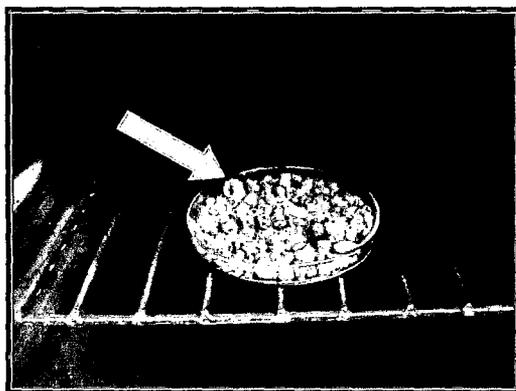


Foto N° 07: Proceso de secado del corno subgloboso, picado en estufa a 40°C.

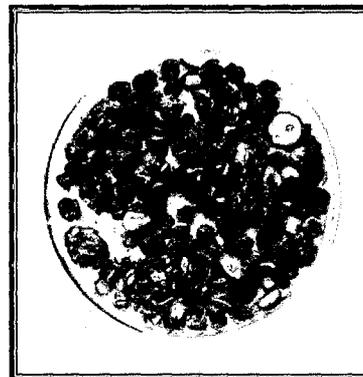


Foto N° 08: Muestra seca del corno subgloboso de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), por triplicado.

### 3.4.3 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Se pesó 50g del corno subgloboso de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), previamente secas y molidas, se sometió a maceración con etanol al 70%; se realizaron 4 extracciones por agotamiento cada 8 días. El porcentaje de rendimiento de extracción se calculó mediante la siguiente relación:

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100 \dots\dots \text{Ec. 02}$$

Donde:

% E = Porcentaje rendimiento.

Pf = Peso final (extracto seco).

Pi = Peso inicial (muestra molida).



Foto N° 09: Filtrado del extracto hidroalcohólico al 70%

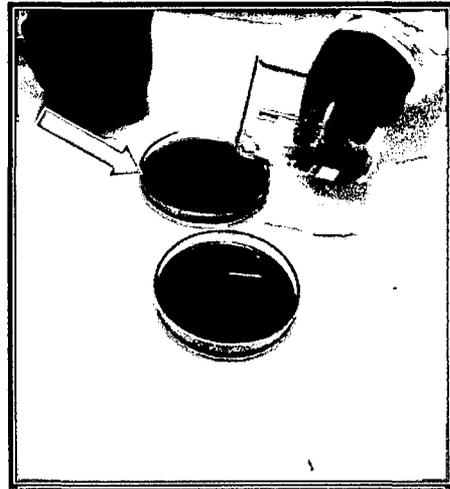


Foto N° 10: Separación del extracto hasta agotamiento.

### 3.4.4 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para realizar las pruebas de solubilidad se tomó aproximadamente 10 mg del extracto en diferentes tubos de ensayo y luego se le agregó 1 ml de solvente de diferentes polaridades, ordenados en forma descendente del más polar al menos polar, así determinar la naturaleza disolutiva de los extractos, mediante agitación aproximadamente por 2 minutos, a temperatura aproximada de 15°C (temperatura ambiente) y a 40 °C.

**Cuadro N° 02**  
**Solventes para las pruebas de solubilidad**

SOLVENTES	
Agua destilada	Acetona
Cloruro de sodio al 0.9%	Cloroformo
Metanol	Éter etílico
Etanol al 40%	Benceno
Etanol al 50%	Hexano
Etanol al 70%	Éter de petróleo
Etanol al 96%	Bencina
Acetato de etilo	

Fuente: Elaboración propia

### 3.4.5 ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Se realizó la marcha fitoquímica para la determinación de metabolitos, secundarios en el extracto seco mediante reacciones químicas específicas de caracterización.

**Cuadro N° 03**  
**Prueba del Análisis Fitoquímico Cualitativo**

METABOLITO SECUNDARIO	REACTIVO
Azúcares reductores	Benedict
Glucósidos	Benedict modificado
Alcaloides	Dragendorf y Mayer
Aminoácidos	Ninhidrina
Flavonoides	Shinoda
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico
Taninos	Gelatina-sal
Saponinas	Prueba de la espuma
Esteroides y triterpenoides	Lieberman y Bouchard
Quinonas	Borntrager

Fuente: Elaboración propia

Para la preparación de los reactivos y el procedimiento a seguir (anexo N° 05).



Foto N° 11: Marcha fitoquímica cualitativa de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)

### 3.4.6 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Por este método se hace una descripción morfológica de la droga, para lo cual se tomó una determinada cantidad del extracto del corno subgloboso, una vez tomada la muestra se procedió a realizar los ensayos de análisis sensorial, es decir comprobar todos aquellos parámetros que captan los órganos de los sentidos como el gusto, olfato, vista y tacto; una vez realizada la evaluación se registraron todas las observaciones. Estas características con frecuencia son fugaces, puesto que las influencias exteriores son capaces de alterarlos y borrarlos totalmente. (Palacios V. J., 1997 y Harrison T.J., 1984).

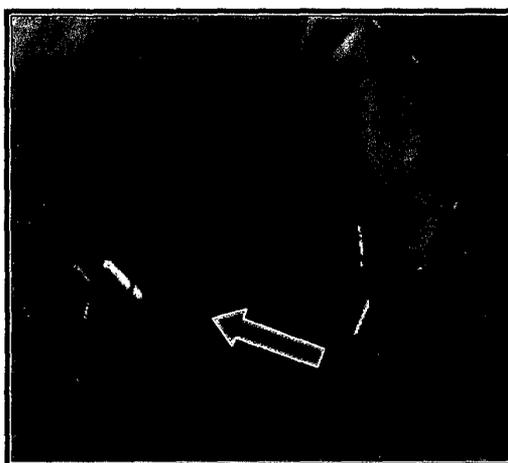


Foto N° 12: Observamos las características organolépticas del extracto de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)

### 3.4.7 EFECTO ANALGESICO

#### 3.4.7.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los extractos, la sustancia de referencia y el vehículo se administra por vía oral (v.o.), en un volumen de 0.5 mL, 30 min antes de la inyección intraperitoneal (i.p.) de 0.25 mL de una solución acuosa de ácido acético de 3%. El fármaco patrón es la Indometacina a una dosis de 10 mg/Kg vía oral (v.o.). Los extractos se ensayan a diferentes dosis: 12.5, 25 y 50 mg/Kg vía oral (v.o.). Siempre que sea posible se utiliza el agua como vehículo. Inmediatamente después de la administración del agente algésico, cada animal se aísla en una caja individual para observar el número de contorsiones abdominales que presenta el animal durante 20 min. (Collier HDJ, 1968 y CYTED, 1995).

$$\%Inh = \frac{NCc - NCp}{NCc} \times 100 \dots\dots \text{Ec. 03}$$

Donde:

%Inb = Porcentaje de inhibición de la contorsión

NCc = Número de contorsiones del grupo control

NCp = Número de contorsiones del grupo problema



Foto N° 13: Administración intraperitoneal de ácido acético al 3%, 0.25 mg/Kg de peso.

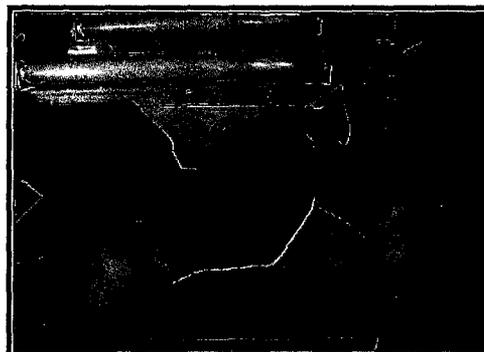


Foto N° 14: Administración por vía oral del extracto, Indometacina y solución fisiológica 0.5 mg/mL

**Fundamento:** El fundamento de esta técnica consiste en la inducción de dolor en el ratón, mediante la inyección de ácido acético al 3% V/V Intraperitoneal que produce una baja de pH, causando el dolor.

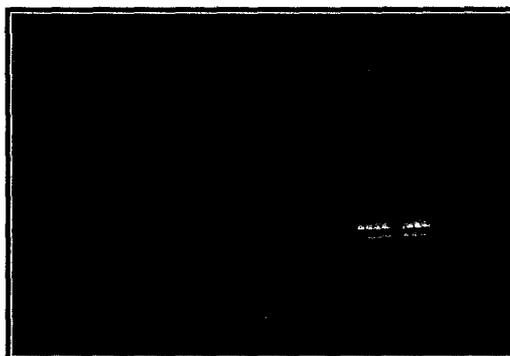


Foto N° 15: Contorsión provocada por la inyección intraperitoneal de 0.25 mL/kg de una solución de ácido acético al 0.3%.

### 3.4.7.2 PROCEDIMIENTO

#### a. PREPARACION DE SOLUCIONES

##### Preparación de ácido acético glacial al 3%.

Tomar 0.3 mL de ácido acético glacial al 99.9% de pureza y aforar a 10 mL con agua destilada. Del cual se le administra a cada ratón por vía intraperitoneal de 0.25 mL.



Foto N° 16: Acido acético glacial al 3%, aforado a fiola de 10mL.

#### **Preparación de diluciones del extracto (ver anexo N° 12)**

**Para 50 mg/Kg:** Se procede a pesar 5.2 mg del extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en una fiola de 5 mL y se afora con solución fisiológica, de tal modo que se administra por vía oral 0.5 mL a cada animal.

**Para 25 mg/Kg:** Se procede a pesar 2.7 mg del extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en una fiola de 5 mL y se afora con solución fisiológica, de tal modo que se administra por vía oral 0.5 mL a cada animal.

**Para 12.5 mg/Kg:** Se procede a pesar 1.45 mg del extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en una fiola de 5 mL y se afora con solución fisiológica, de tal modo que se administra por vía oral 0.5 ml a cada animal.



Foto N° 17: Diluciones del extracto de 50, 25 y 12.5 mg/Kg de peso del extracto de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa).

#### **Preparación de Indometacina 10mg/Kg**

Se pesa 0.96 mg de **Indometacina 25 mg** y aforar a 5 mL. Del cual se administró a cada ratón por vía oral 1.25 mL.

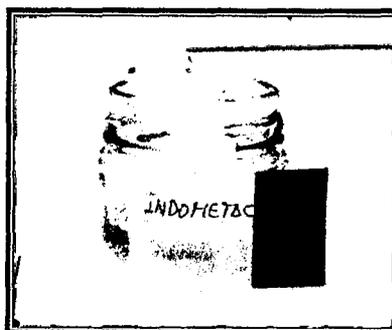


Foto N° 18: Cálculo y preparación de la solución de Indometacina 10 mg/Kg de peso.

### b. PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES

Se utilizaron ratones macho, con un peso comprendido entre  $25 \pm 5$  g, que han permanecido en ayunas durante un periodo de 12 horas previo al experimento.

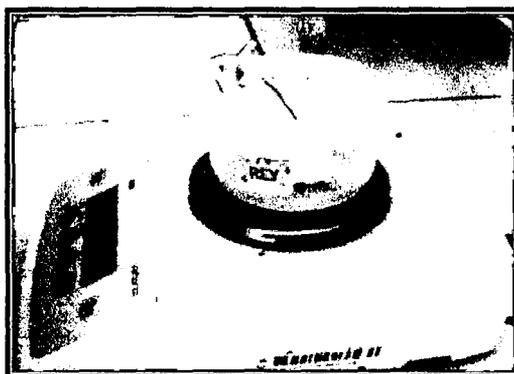


Foto N° 19: Registro del peso de ratones por cada grupo experimental.



Foto N° 20: Marcado del ratón para diferenciar de cada grupo experimental.

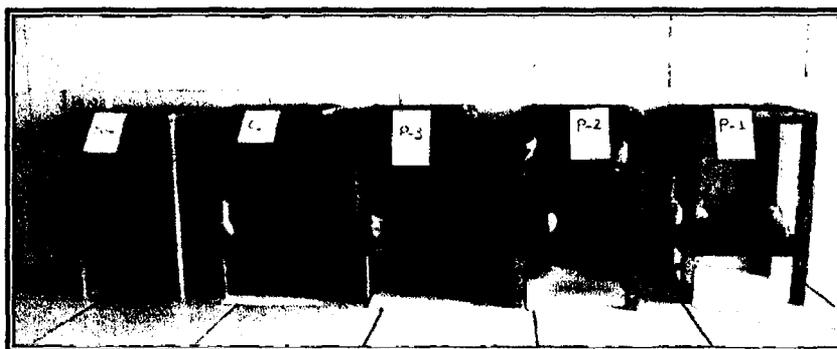


Foto N° 21: Formación de cada grupo, con animales de experimentación.

### 3.4.8 EFECTO ESPASMOLÍTICO

#### 3.4.8.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La porción de íleon así obtenida se conserva en una placa petri que contiene solución de Tyrode a 37 C° de temperatura. Se toma el corte aproximado de 2 cm. de longitud, procediéndose a la eliminación del tejido superfluo y limpieza intraluminal (Pascual et al., 1999).

A continuación se colocarán dos puntos opuestos de sujeción donde el extremo distal se fija a la varilla y el proximal se acopla a un transductor isométrico a través de un gancho metálico atado al transductor con hilo de sutura seda negra trenzada N° 03, ajustado con la correspondiente tensión (Pascual et al., 1999). Para el montaje de la preparación se ha utilizado un baño de órgano con una copa con capacidad para 25 mL. que se llena de solución Tyrode, se burbujea con un aireador y se mantiene a la temperatura constante de 37 °C (Cherbut et al., 1996).

$$\%Dism. Cont. = \frac{DCc - DCp}{DCc} \times 100 \dots\dots Ec. 04$$

Donde:

% Dism. Cont. = Porcentaje de disminución de contracciones

DCc = Disminución de contracción del grupo control

DCp = Disminución de contracción del grupo problema

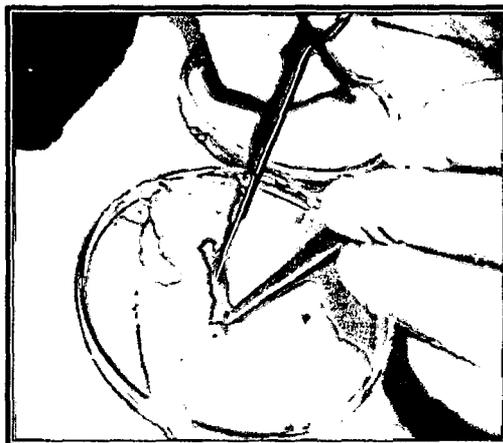


Foto N° 22: Limpieza y eliminación del tejido superfluo del íleon, en solución de Tyrode, a 37°C y suministro de aire.



Foto N° 23: Montaje del íleon en un baño de órgano de 25 mL, oxigenado.

Se debe tener en cuenta ciertos parámetros en el Chart antes de empezar las lecturas, primero elegir en el menú de programación un solo canal de lectura, buscar la velocidad de muestreo adecuada en nuestro caso se trabajó con la

velocidad 1s/sample, luego elegir la amplitud que será de 50 mV, en escala vertical unipolar o bipolar dependiendo del requerimiento, y una escala horizontal de 1:1.

La preparación se deja estabilizar por 20 min. Una vez conseguido una línea basal estable, podemos añadir al baño las sustancias que provoquen la contracción o relajación de la musculatura lisa (Cherbut C. et al., 1996).

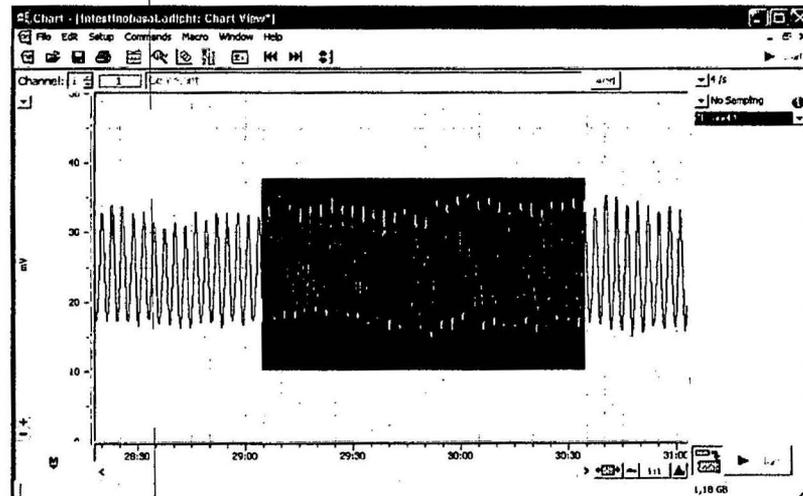


Foto N° 24: Selección de lectura en el Chard

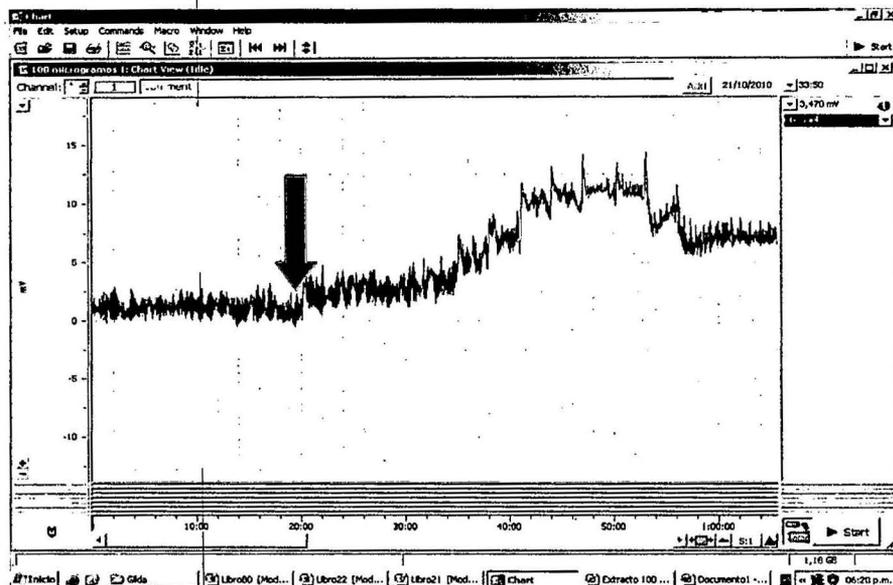


Foto N° 25: Estabilización de 20 min antes de añadir el extracto o fármaco.

Al contraerse el íleon este tira del transductor con una fuerza que se transforma en una señal eléctrica. Después de ser ampliada por el amplificador, podremos observar en la pantalla del ordenador una subida o bajada de la línea basal (Cherbut et al., 1996).

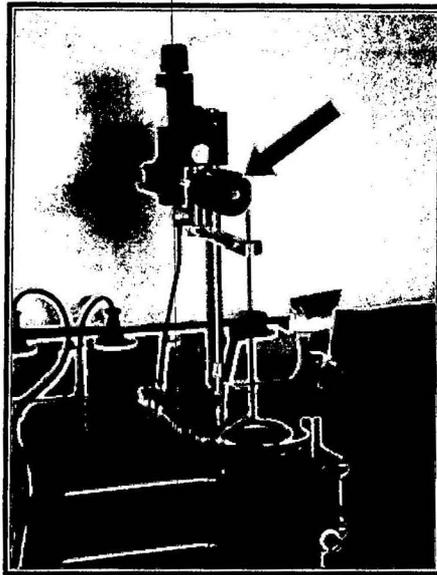


Foto N° 26. Transductor isométrico, ubicado en la parte superior del baño de órgano.



Foto N° 27: Adición directa del extracto o patrón al baño de órgano donde está montado el íleon.

Se hicieron pruebas añadiendo concentraciones del extracto hidroalcohólico, luego lavando el tejido (íleon) antes de adicionar la siguiente concentración, pero no se obtuvo buenos resultados con este procedimiento, puesto que las contracciones espontáneas (mV) disminuía considerablemente, por lo cual se decidió cambiar el tejido para cada concentración utilizada.

**FUNDAMENTO:** Consiste en la inducción de contracciones de un segmento de íleon, específicamente la capa muscular del íleon que es la musculatura lisa, con la dosis acumulativa de acetilcolina, que interacciona con los receptores muscarínicos ( $M_3$ ). Desencadena una serie de procesos, que conducen a un incremento de  $Ca^{+2}$  intracelular provocando la contracción del músculo liso.

### 3.4.8.2 PROCEDIMIENTO

#### a. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

**Solución de Tyrode** (para 500 mL de solución)

NaCl	4 g
KCl	0.1 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
MgCl <sub>2</sub>	0.05 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.025 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.5 g
Glucosa	0.5 g
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p.	500 mL

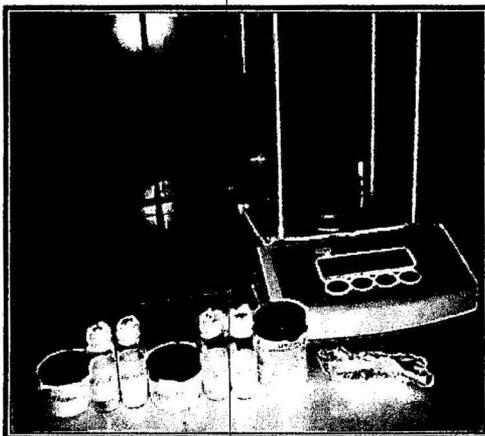


Foto N° 28: Pesado de los reactivos para la preparación de la solución de Tyrode.



Foto N° 29: Preparación de 500 mL solución de Tyrode con agua destilada

### Preparación de Acetilcolina $2 \times 10^{-2}$ M

Para 10 mL de solución se pesa 0.045222g de ACh (PM = 226.11) y aforar hasta 10 mL con Solución de Tyrode.

Para añadir la acetilcolina al baño de órganos, la copa debe tener un volumen de 20 mL.

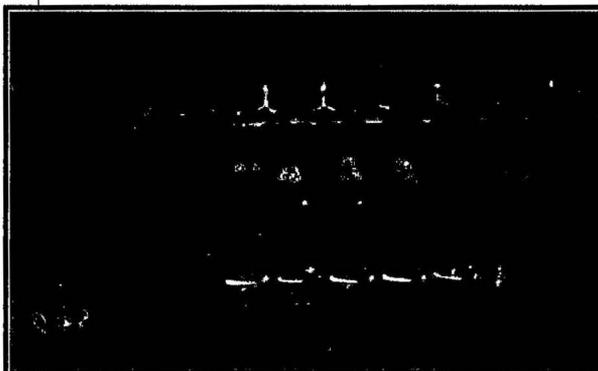


Foto N° 30: Diluciones de acetilcolina de  $2 \times 10^{-2}$  a  $2 \times 10^{-7}$

### Preparación de las diluciones de los extractos.

Se procede a pesar 10 mg del extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) en una fiola de 10 ml y se afora con solución Tyrode, de tal modo que se tendrá una concentración igual a 1 mg/mL.

A la copa de tejido se le agregan volúmenes de 0.05, 0.1 y 0.2 mL de la solución obteniéndose concentraciones de 50, 100 y 200  $\mu$ g/mL de extracto.

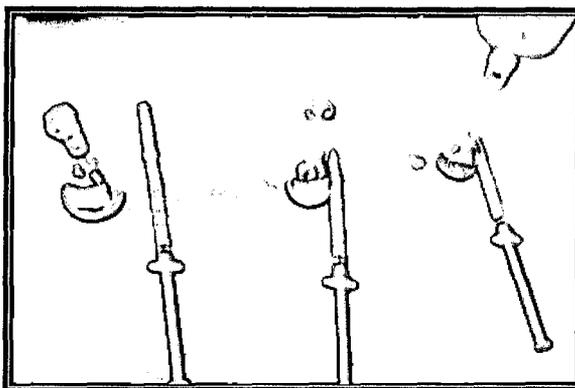


Foto N° 31: Diluciones de extracto hidroalcohólico de 50, 100 y 200 µg/mL

### Preparación de Atropina $10^{-4}$ M (PM = 289.37)

Se toma 0.29 ml de **Atropina 1mg/1mL** y se afora a 10 mL con agua destilada, del cual obtenemos  $10^{-1}$  M.

De esta solución  $10^{-1}$  M, se toma 1 mL y se afora a 10 mL, así sucesivamente hasta llegar a la  $10^{-4}$  M. El cual es usado como patrón.

### b. PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES

Se utilizaron ratas macho, con un peso comprendido entre  $250 \pm 50$  g, que han permanecido en ayunas durante un periodo de 24 horas previo a su sacrificio. Se sacrifican mediante un golpe en la cabeza (Pascual et al., 1999).

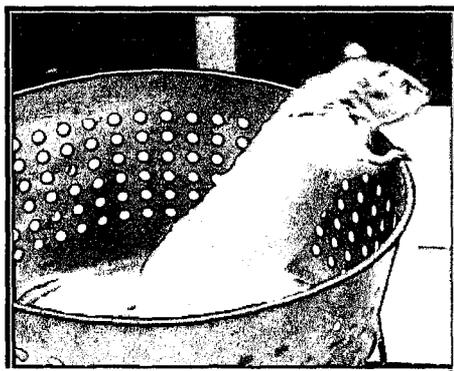


Foto N° 32: Registro de peso de las ratas

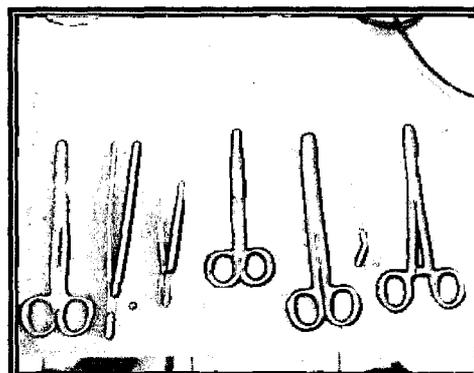


Foto N° 33: Equipo de disección para remoción del paquete intestinal y extirpación del íleon.

Se accede a la masa intestinal por disección de la piel y de la musculatura de la pared anterior del abdomen. Se identifica el íleon y se extrae un segmento de una longitud aproximada de 2 cm., despreciándose 1 cm. más distales (unión

ileocecal) por poseer una gran cantidad de receptores alfa-adrenérgicos excitadores (Pascual et al., 1999).

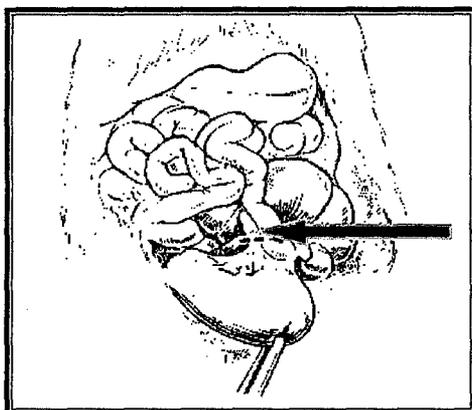


Foto N° 35: Identificación del ileon y extirpación, para luego introducirlo a la solución Tyrode oxigenada para su limpieza.

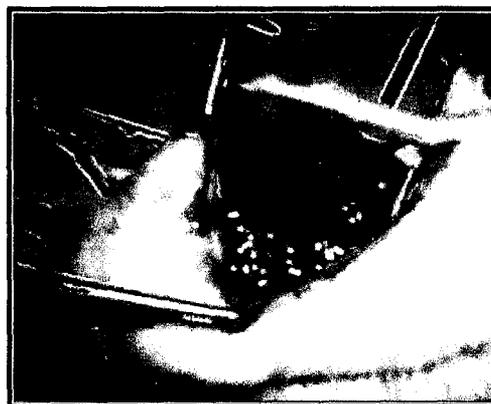


Foto N° 34: Disección de la piel y la musculatura de la pared anterior del abdomen.

### 3.4.9 DE LA ESCALA DE VALORACION DE LOS EFECTOS FARMACOLÓGICOS ANALGÉSICO Y ESPASMOLÍTICO

Cuadro N° 04: Criterios de valoración del efecto farmacológico del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)

CRITERIOS DE VALORACIÓN	% DE EFECTO FARMACOLÓGICO
Muy efectivo	75% - 100%
Efectivo	50% - 75%
Medianamente	25% - 50%
Poco efectivo	1% - 25%
No efectivo	0%

Fuente: Propia 2010

### 3.4.10 TÉCNICAS DE ANALISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos obtenidos en cada uno de los indicadores del efecto analgésico y espasmolítico, serán procesados mediante el paquete estadístico SPSS.13.0 (Statistical Package for Social Science), análisis de varianza de (ANOVA) y jerarquización de DUNCAN.

# CAPÍTULO IV: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 4.1 DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES

### 4.1.1 DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Tabla N° 01

Porcentaje de humedad del corno subgloboso de *Peperomia verruculosa*

Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)

Número de determinaciones	Peso de la muestra fresca (g)	Peso de la muestra seca (g)	% de humedad
1	10	6.12	38.79
2	10	6.32	36.72
3	10	5.98	40.16
<b>Promedio del porcentaje de humedad</b>			<b>38.56±1.732</b>

Fuente: Datos experimentales.

### **Interpretación y discusión:**

En la Tabla N° 01, el porcentaje de humedad fue de 38.56%, es relativamente bajo. Las pruebas se realizaron por triplicado, de acuerdo al método gravimétrico.

Es importante conocer el porcentaje de humedad para el proceso de secado, permitiendo interrumpir los procesos de degradación producidos por las enzimas o fermentos, también impide el desarrollo de microorganismos y las reacciones de oxidación e hidrólisis, que pueden dañar las características organolépticas del extracto seco.

#### **4.1.2 DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO**

**Tabla N° 02**

**Porcentaje de rendimiento del extracto hidroalcohólico al 70% de  
*Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)**

<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>% de extracción</b>
50	8.7	17.4

Fuente: Datos experimentales.

### **Interpretación y discusión:**

En la Tabla N° 02, el porcentaje de rendimiento fue de 17.4 %, es importante la determinación del porcentaje de rendimiento; puesto que éste determina la cantidad de planta pulverizada necesaria para obtener el extracto hidroalcohólico y la cantidad necesaria de muestra a recolectar para la investigación, también permite hacer comparaciones del porcentaje de rendimiento con solventes de diferente polaridad y otras especies.

#### 4.1.3 DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

**Cuadro N° 05: Características organolépticas del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)**

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>EXTRACTO HIDROALCOHOLICO</b>
<b>Color</b>	Pardo oscuro
<b>Olor</b>	Suigéneris
<b>Sabor</b>	Amargo
<b>Aspecto</b>	Uniforme
<b>Consistencia</b>	Blanda

Fuente: Datos experimentales obtenidos en ficha (ver anexo N° 06)

#### **Interpretación y discusión:**

El extracto seco obtenido por maceración con etanol al 70% es de color pardo oscuro, de aspecto uniforme, sabor amargo, olor suigeneris, de consistencia blanda, resultados semejantes a los obtenidos por (Chávez et al., 2009); estas características son de importancia para la identificación del extracto, muy inherentes y particulares para cada tipo de especie sostenido por (Moscoso G., 2002).

#### 4.1.4 DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

**Cuadro N° 06: Pruebas de solubilidad del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)**

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD		
SOLVENTE	T° AMBIENTAL: 17°C	40°C
Agua destilada	+++	+++
Solución fisiológica	+++	+++
Metanol	+-	+-
Etanol al 40%	+-	+-
Etanol al 50%	+++	+++
Etanol al 70%	+++	+++
Etanol al 96%	+++	+++
Acetato de etilo	---	---
Acetona	+--	+--
Cloroformo	+--	+--
Éter etílico	---	---
Benceno	---	---
Hexano	---	---
Éter de petróleo	---	---
Bencina	---	---

Fuente: Datos experimentales obtenidos en ficha (ver anexo N° 07)

#### **Leyenda:**

- (+++) :Muy soluble
- (+ + -) :Soluble
- (+ - -) :Parcialmente soluble
- (- - -) :Insoluble

#### **Interpretación y discusión:**

A temperatura de 40°C, las pruebas de solubilidad del extracto hidroalcohólico no tuvieron ninguna diferencia considerable en comparación con las pruebas de solubilidad a temperatura ambiente.

De las pruebas de solubilidad del extracto seco hidroalcohólico se evidencia que es altamente soluble en solventes polares principalmente en agua, a diferentes concentraciones de etanol-agua y suero fisiológico; siendo parcialmente soluble e insoluble en solventes apolares.

#### 4.1.5 DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

**Cuadro N° 07: Análisis fitoquímico cualitativo del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa)**

ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO		
METABOLITO SECUNDARIO	REACCIÓN/ PRUEBA	RESULTADOS
Azúcares reductores	Benedict	---
Glucósidos	HCl 1% Reflujar NaOH 1% Benedict	---
Alcaloides	Dragendorf	++-
Aminoácidos	Ninhidrina	---
Flavonoides (flavonas e isoflavonas)	Shinoda	++-
Compuestos fenólicos	FeCl <sub>3</sub> 1%	+++
Taninos	Gelatina – NaCl 1%	---
Saponinas	Índice de espuma	---
Lactonas: α,β-insaturada	Baljet	+++
Esteroides y triterpenoides	Lieberman-Bourchad Salkowski	--- +--
Quinonas (antraquinonas y naftoquinonas)	Bornträger	++-

Fuente: Datos experimentales obtenidos en ficha (ver anexo N° 08)

#### Leyenda:

- --- : Ausencia de metabolito
- +-- : Leve presencia de metabolito
- ++- : Moderada presencia del metabolito
- +++ : Intensa presencia del metabolito

### **Interpretación y discusión:**

El Cuadro N° 06, por reacciones de caracterización específicas se determinó la presencia de metabolitos secundarios, tal como se muestra en el cuadro, la intensa presencia de compuestos fenólicos y lactonas ( $\alpha,\beta$ -insaturada), moderada presencia de alcaloides, flavonoides (flavonas e isoflavonas) y quinonas (antraquinonas y naftoquinonas), además de una leve presencia de esteroides y triterpenoides, corroborándose la presencia de alcaloide, triterpenoides y flavonoides como dihidroflavonoles e isoflavonas en (Guillermo N. et al., 2002), flavonoides y compuestos fenólicos afirmado por (Lorente LD, 2006), son capaces de inhibir las contracciones del íleon, inducida tanto eléctricamente como farmacológicamente.

Los compuestos fenólicos y flavonoides presentan actividad antialérgica, antiinflamatoria, analgésica y capacidad antioxidante.

Por otro lado los alcaloides, triterpenoides y compuestos fenólicos presentan actividad analgésica y cicatrizante (Blanco N., 2006). No obstante, (Gálvez et al., 1995) sostiene que los flavonoides no ejercen, sólo un efecto preventivo en modelos de diarrea aguda, sino también en modelos de diarrea crónica.

#### 4.2 DEL EFECTO ANALGÉSICO

Tabla N° 03

**Efecto analgésico *in vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contorsión abdominal inducida por ácido acético al 3% en ratones albinos.**

GRUPOS DE COMPARACION	N°	Media (contorsiones abdominales)	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Patrón	4	4.5	2.4	1.2	0.7	8.3	2.0	7.0
Extracto 12.5 mg/kg	4	8.8	5.7	2.9	-0.4	17.9	2.0	14.0
Extracto 25 mg/kg	4	1.8	2.1	1.0	-0.5	5.0	0.0	4.0
Extracto 50 mg/kg	4	1.5	1.7	0.9	-1.3	4.3	0.0	3.0
Control	4	9.0	4.2	2.1	2.2	15.8	6.0	15.0

Fuente: Procesamiento estadísticos de datos experimentales 2010.

En la tabla N° 03 se aprecia el efecto analgésico *in vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex. A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contorsión abdominal inducida por ácido acético al 3% en ratones albinos, donde en promedio se tienen los siguientes resultados, aplicando el patrón (Indometacina), los ratones presentaron 4,5 contorsiones en un periodo de 20 minutos, mientras que con el extracto de 50 mg/kg presentó cerca de 1,5 contorsiones, mostrando mejor efecto analgésico que la Indometacina, así como el grupo control (blanco), donde se observaron en promedio de 9 contorsiones en 20 minutos.

**Tabla N° 04**

**Análisis de varianza (ANOVA) del efecto analgésico *in vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contorsión abdominal inducida por ácido acético al 3% en ratones albinos.**

ANOVA	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	212.300	4	53.075	4.157	0.018
Intra-grupos	191.500	15	12.767		
Total	403.800	19			

Fuente: Elaboración propia 2010

**Leyenda:**

gl = Grados de libertad

F = Distribución de Fischer

Sig. = Significancia:  $p < 0,05$  (significativa) y  $p < 0,01$  (muy significativa)

En la tabla precedente se aprecia la comparación del efecto analgésico aplicando el ANOVA (Análisis de Varianza), donde con un nivel de significancia de 0.018 se concluye que existen diferencias significativas entre los grupos de comparación.

**Tabla N° 05**

**Prueba de DUNCAN del efecto analgésico *in vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contorsión abdominal inducida por ácido acético al 3% en ratones albinos.**

Duncan <sup>a</sup>			
Grupos de comparación	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Extracto 50 mg/kg	4	1.500	
Extracto 25 mg/kg	4	1.750	
Patrón	4	4.500	
Extracto 12.5 mg/kg	4		8.750
Control	4		9.000
Sig.		0.278	0.111

Fuente: Elaboración propia 2010.

En la tabla N° 05, se aprecia los resultados posteriores al ANOVA, para conocer el orden jerárquico del efecto analgésico del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex. A.W. Hill. (Uchuy papa), obteniendo finalmente que el extracto de 50 y 25 mg/kg se encuentran en un mismo grupo con el patrón, mostrando estadísticamente el mismo efecto analgésico, mientras que el extracto de 12.5 mg/kg y el grupo control (blanco) mostraron un efecto analgésico menos efectivo.

Se muestra la prueba de Duncan para los niveles medios del número de contorsiones abdominales de *Mus musculus*, a los 20 minutos, agrupados en subgrupos homogéneos, se observa que existen diferencias significativas en el número de contorsiones, siendo marcadas para el grupo patrón y los extractos de 50 y 25 mg/kg; mas al observar que los valores son positivos se trata de la disminución del número de contorsiones abdominales.

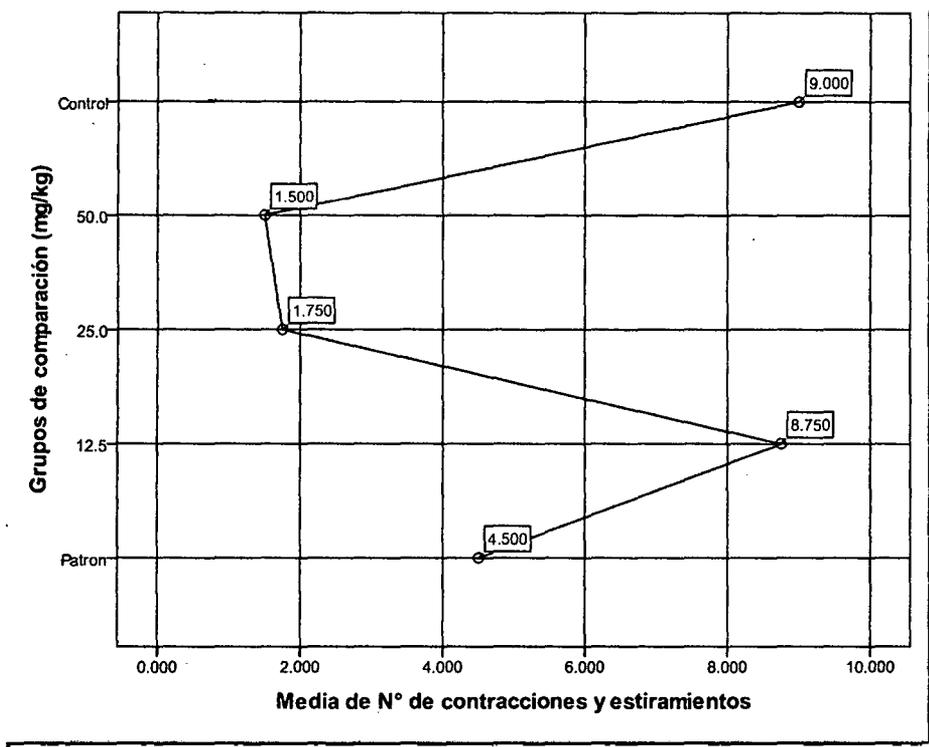


Figura N° 12: Media del efecto analgésico *in vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) (Fuente propia 2010)

### Interpretación y discusión:

Analizados los resultados obtenidos, después de administrar el extracto hidroalcohólico a 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), a ratones albinos *Mus musculus* por vía oral, y evaluar el efecto analgésico, considerando la disminución de contorsión, teniendo como fármaco patrón a la Indometacina, vemos que hay significancia estadística del efecto analgésico en relación con el grupo que no recibió extracto o fármaco (control), evidenciado con el análisis de varianza ANOVA, el efecto de los extractos con dosis de 50 mg/Kg, seguido de 25 mg/Kg; siendo mejor el extracto de 50 mg/Kg, de lo que este análisis estadístico realizado apoya a la hipótesis del trabajo planteado. Los antecedentes bibliográficos demuestran que el efecto analgésico obtenido, se encuentra en el rango de concentración efectiva de 25-250 mg/Kg, obtenido por (Fernández D. et al. 2010 y Ledón N. et al. 1996), a diferencia de (Muñoz C.E., 2009) que lo obtiene a la dosis de 100 mg/Kg y el efecto analgésico periférico semejante al obtenido por (Barzaga F., 2005, Buznego R. et al., 2005 y Llanio, M. et al. 2003).

Tabla N° 06

Media del número de contorsiones abdominales y porcentaje de inhibición respecto al grupo control

GRUPO	MEDIA DEL N° DE CONTORSIONES ABDOMINALES	% DE INHIBICIÓN DEL DOLOR
Indometacina 10 mg/Kg	4.5	50
Extracto 12.5 mg/Kg	8.8	22.22
Extracto 25 mg/Kg	1.8	80.55
Extracto 50 mg/Kg	1.5	83.33
Control	9.0	-

FUENTE: Tratamiento estadístico de datos experimentales

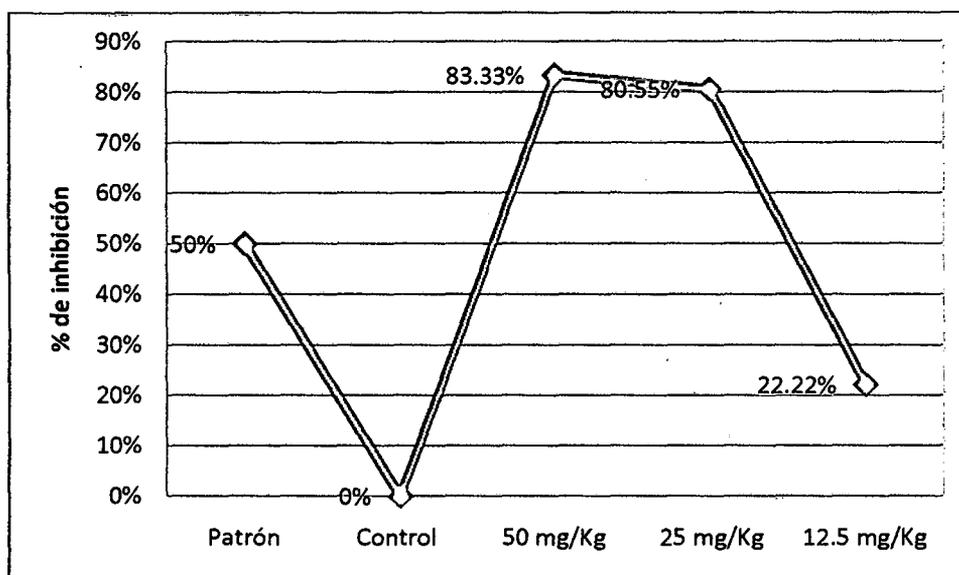


Figura N° 13: % de inhibición de contorsión abdominal de los grupos de estudio frente al patrón (Fuente propia 2010).

### 4.3 DEL EFECTO ESPASMOLITICO

**TABLA N° 07**

**Efecto espasmolítico *ex vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.**

GRUPOS DE COMPARACION	N°	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Patrón	13	1.34	0.40	0.11	1.09	1.58	0.90	2.50
50 µg/mL	13	4.43	1.82	0.50	3.33	5.53	2.22	8.30
100 µg/mL	13	2.67	1.00	0.28	2.07	3.28	1.57	4.88
200 µg/mL	12	4.77	1.88	0.54	3.57	5.96	2.47	8.61
Control	11	3.31	0.64	0.19	2.89	3.74	2.44	4.24
Total	62	3.28	1.78	0.23	2.83	3.73	0.90	8.61

Fuente: Procesamiento estadísticos de datos experimentales 2010

En la tabla N° 07, se aprecia el efecto espasmolítico *in vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre la contracción del íleon de rata inducida por acetilcolina, donde en promedio se tienen los siguientes resultados, aplicando el patrón (Atropina), los órganos presentaron una amplitud de contracción constante de 1,34 contracciones en periodos de tiempo de 3 minutos, mientras que con el extracto de 100 µg/mL presentaron cerca de 2,67 siendo este extracto el que más se aproxima al grupo patrón.

**Tabla N° 08**

**Análisis de varianza (ANOVA), del efecto espasmolítico *ex vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.**

<b>ANOVA</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Inter-grupos</b>	97.416	4	24.354	14.373	0.000
<b>Intra-grupos</b>	96.583	57	1.694		
<b>Total</b>	193.999	61			

Fuente: Elaboración propia 2010

En la tabla precedente se aprecia la comparación del efecto espasmolítico aplicando el ANOVA (Análisis de Varianza), donde con un nivel de significancia de 0.000 se concluye que existen diferencias muy significativas entre los grupos de comparación.

**Tabla N° 09**

**Prueba de DUNCAN del efecto espasmolítico *ex vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.**

Duncan <sup>a,b</sup>				
Grupos de comparación	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Patrón	13	1.338		
100 µg/mL	13		2.672	
Control	11		3.313	
50 µg/mL	13			4.427
200 µg/mL	12			4.765
Sig.		1.000	0.226	0.521

Fuente: Elaboración propia 2010

En la Tabla N° 09, se aprecia los resultados posteriores al ANOVA, para conocer el orden jerárquico del efecto espasmolítico del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), obteniendo finalmente que el extracto de 100 µg/mL. se encuentra más cerca del efecto espasmolítico del grupo patrón, sin embargo el grupo control mostró estadísticamente el mismo efecto espasmolítico que el extracto de 100 µg/mL.

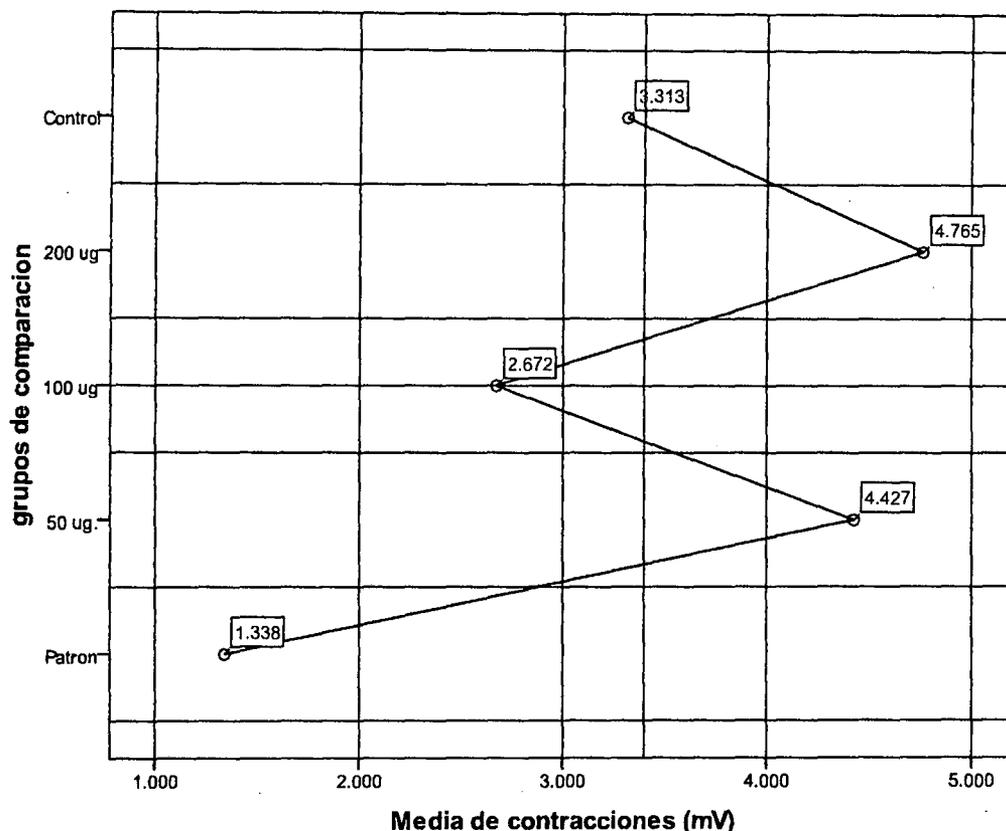


Figura N° 13: Media del efecto espasmolítico *ex vivo* del extracto hidroalcohólico al 70% de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa) sobre las contracciones inducidas por acetilcolina en íleon de rata.

### Interpretación y discusión:

Analizados los resultados obtenidos, después de administrar el extracto hidroalcohólico a 70° de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), al baño de órganos con íleon de ratas macho *Rattus norvegicus*, y evaluar el efecto espasmolítico, considerando la disminución de amplitud de contracción, teniendo como fármaco patrón a la Atropina, vemos que no hay significancia estadística del efecto espasmolítico en relación con el grupo que no recibió extracto o fármaco (control), evidenciado con el análisis de varianza ANOVA, siendo óptimo el efecto con la dosis de 100 µg/mL, este análisis estadístico realizado apoya a la hipótesis del trabajo planteado. Los antecedentes bibliográficos demuestran que el efecto espasmolítico obtenido, es similar a la investigación realizada por (Alba R. et al., 2009 y Ruiz S., et al., 2004). También demostraron efecto relajante frente a la acetilcolina (Bigovic D., 2010 y Sadraei H., 2008).

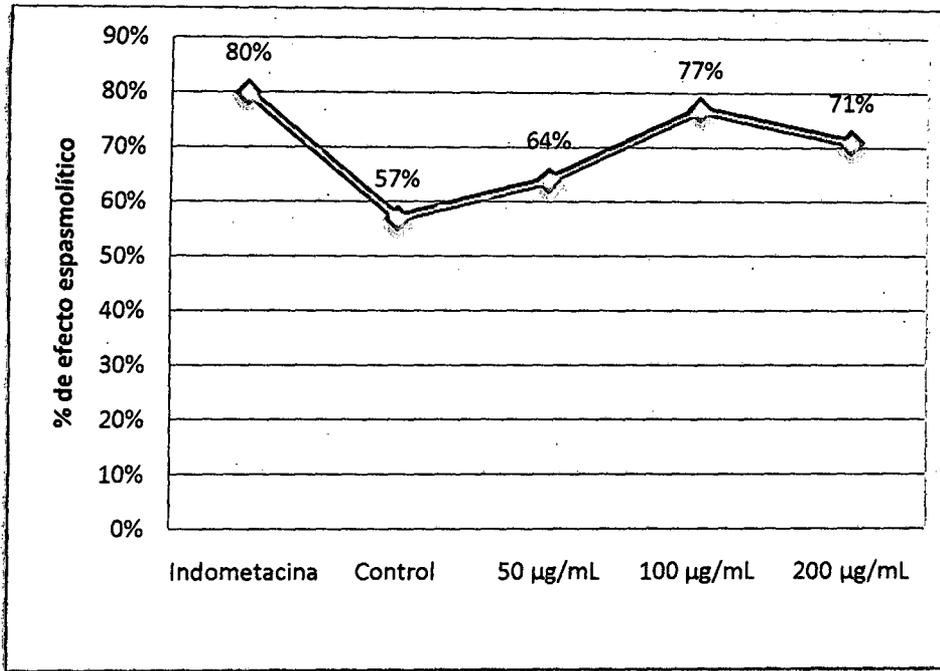


Figura N° 14: % de efecto espasmolítico sobre las contracciones de los grupos de estudio frente al patrón (Elaboración propia 2010).

#### 4.4 DE LA ESCALA DE VALORACION DE LOS EFECTOS FARMACOLÓGICOS ANALGÉSICO Y ESPASMOLÍTICO

**Cuadro N° 08: Criterios de valoración del efecto Analgésico**

<b>DOSIS EVALUADA</b>	<b>% DE INHIBICION DE LA CONTORSION</b>	<b>CRITERIO DE VALORACION</b>
12.5 mg/kg	22.22%	Poco efectivo
25 mg/Kg	80.55%	Muy efectivo
50 mg/Kg	83.33%	Muy efectivo
Indometacina	50%	Medianamente

Fuente: Propia 2010

En el cuadro N° 08, las dosis de 25 y 50 mg/Kg, se conoce que el % de inhibición de la contorsión es 80.55 y 83.33 % respectivamente, superando al efecto de la Indometacina y en el criterio de valoración se ubican entre los muy efectivos.

**Cuadro N° 09: Criterios de valoración del efecto espasmolítico**

<b>DOSIS EVALUADA</b>	<b>% DE DISMINUCION DE CONTRACCION</b>	<b>CRITERIO DE VALORACIÓN</b>
50 µg/mL	64%	Efectivo
100 µg/mL	77%	Muy efectivo
200 µg/mL	72%	Efectivo
Atropina	80%	Muy efectivo

Fuente: Propia 2010

En el cuadro N° 09, la dosis de 100 µg/mL, tiene como % de disminución de contracción 77%, aproximándose al patrón Atropina, ubicándose entre los muy efectivos.

# CONCLUSIONES

1. Se determinó que el extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), presenta efecto analgésico sobre la contorsión abdominal de ratones *Mus musculus*, inducido con ácido acético, y efecto espasmolítico sobre la contracción de íleon de rata *Rattus norvegicus*, inducido con acetilcolina, por lo tanto se acepta la hipótesis.
2. En las pruebas preliminares se reportó lo siguiente: un porcentaje de humedad correspondiendo al 38.56%, porcentaje de rendimiento de 17.4%, en la marcha de solubilidad se observó que es altamente soluble en solventes polares y en el estudio fitoquímico cualitativo mostró la presencia en gran cantidad de compuestos fenólicos y lactonas, seguido de alcaloides, flavonoides y quinonas del extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa).
3. El extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), administrado por vía oral en ratones *Mus musculus*, a distintas dosis de 12.5, 25 y 50mg/kg, evidencia que el extracto de 25 y 50 mg/kg, presentan mayor efecto analgésico sobre la contorsión abdominal, inducida con ácido acético.
4. El extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), administrado sobre el íleon aislado de rata *Rattus norvegicus*, a distintas dosis de 50, 100 y 200µg/mL, demostró que el extracto de 100µg/mL, presenta alto efecto espasmolítico sobre el íleon contraído, inducida con acetilcolina.
5. Se determinó que el extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), administrada a la dosis de 25 y 50 mg/kg, inhibe la contorsión abdominal en 80.55 y 83.33%, superando a la Indometacina que lo hace en 50% y se ubica en los muy efectivos.
6. Se determinó que el extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), administrado a la dosis de 100 µg/mL, inhibe la contracción del íleon aislado en 77%, aproximándose a la atropina que lo hace al 80% y se encuentra entre los muy efectivos.

# SUGERENCIAS

## A los investigadores:

1. Obtener un extracto acuoso o una tintura de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), para poder realizar estudios *in vivo*, con el fin de evaluar su el efecto espasmolítico en otras formas de extracción polar.
2. Realizar pruebas de fraccionamiento de metabolitos secundarios responsables del efecto analgésico y espasmolítico del extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa).
3. Realizar pruebas de toxicidad aguda y crónica, para luego realizar estudios clínicos para valorar cuan interpolable es el efecto espasmolítico de la especie en estudio, en relación al ileon aislado de *Rattus norvegicus*.
4. Realizar ensayos que determinen la forma farmacéutica del extracto hidroalcohólico de *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill. (Uchuy papa), con el fin de utilizar el efecto farmacológico demostrado en la presente investigación.
5. Realizar instalaciones de semilleros para la protección y conservación de la presente especie en extinción.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Alba Rosero, Carolina; Camacho, Robinson; Polanco, Mauricio; Gómez, Sebastián. Efecto relajante de las hojas de *Ocimum basilicum* y *Foeniculum vulgare* colombianas en íleon aislado de rata. 2009. Univ. Med. Bogotá (Colombia), 50 (1): 98-109. Disponible en: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v50n1/pdf/Efecto%20relajante.pdf>.
2. Barzaga Fernández, Pedro; Núñez Figueredo, Yanier; Agüero Fernández, Sarah; Chávez Hernández, Ismael; González Sanabria, María Lidia; Iser Valdés, Yadira y Olivera Carpio, Maylin. Efecto analgésico del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Rev Cubana Plant Med. v.10 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 2005.
3. Barastegui Almagro C. Esquemas y prácticas de Farmacología. Ed. Espaxs 1976.
4. Bigovic D., Brankovic S., Kitic D., Radenkovic M., Jancovic T., Savikin K. y Zivanovic S. "Relaxant Effect of the Ethanol Extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on Isolated Rat Ileum Contractions" (Efecto relajante del extracto etanolico de *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) en contracciones de íleon aislado de rata). *Molecules* 2010, 15, 3391-3401. Disponible en: [www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules)
5. Blanco Hernández, Neylim; Ramos Ruiz, Alberto y Vizoso Parra, Ángel. Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* H.B.K. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana Facultad de Medicina "Dr. Salvador Allende". Rev Cubana Plant Med v.11 n.3-4 Ciudad de la Habana jul.-dic. 2006.
6. Brack A. E. "Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú" PNUD – CBC. Cusco – Perú. Junio. 1999, Pág. 7, 394.
7. Brenner G M y Stevens C W. Pharmacology (Farmacología), 2nd Edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company (Elsevier). 2006.
8. Buznego Rodríguez, M.T.; Cuba Peña, Alfredo; Garriga Sarría, Eneida; Cuéllar Cuéllar, Armando y Pérez-Saad, Héctor. Efecto de los extractos de cloroformo y tolueno de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta

- exploratoria y pruebas de analgesia. Instituto de Neurología y Neurocirugía. Rev Cubana Plant Med 2005;10(2). Disponible en:  
[http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10\\_2\\_05/pla06205.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol10_2_05/pla06205.htm)
9. Collier HDJ, Dinnen LC, Johnson CA, Scheider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. B J Pharmacol Chemother. 1968;32:295-310.
  10. Cotillo Z. P., Rojas R. L. Métodos Farmacológicos en la Investigación de Productos Vegetales, Editorial JAMAD, Primera Edición Lima. Perú. 1990.
  11. Chávez Soto, Jennifer Dora y Sucari Morales, Flor Mariela. "Estudio del efecto espasmolítico *in vitro* de los extractos de *Minthostachys mollis* (Muña) y *Senecio nutans* (Chachacoma) en íleon aislado de *Rattus norvegicus*" UCSM. 2009.
  12. Cherbut C.; Aubé A.; Blottiere H.; Pacaud P.; Scarpignato C.; Galmiche J. "In vitro Contractile Effects of Short Chain Fatty Acids in the Rat Terminal Ileum". Laboratory of Physiology, University of Bordeaux. Vol. 38. Pag. 53-58. Francia 1996.
  13. Drucker Colín, René. Fisiología Médica. Editorial Manual moderno. México. 2005. Pág. 377- 379.
  15. Fernández Dorta, L.; Más Ferreiro, Rosa; Fernández Travieso, Julio César; Hernández Ortega, Caridad. Efectos del extracto de alcoholes purificados de la cera de abejas (*Apis mellifera*) en dos modelos de analgesia. Revista Cubana de Farmacia. 2010; 44(2)205-212. Disponible en:  
<http://scielo.sld.cu/pdf/far/v44n2/far09210.pdf>
  15. Forés Ramón "Plantas medicinales y curativas – La salud a través de las Plantas" Edición MMV, Madrid-España, 2005, Pág. 1, 13-18, 23-26.
  16. Gálvez J, Sánchez de Medina F. Jiménez J, Torre MI, Fernández MI, Núñez MC, Rios A, Gil A, Zarzuelo A. Effect of quercetin on lactose-induced chronic diarrhoea in rats. 1995. Planta Med 61, 302-306.
  17. Goodman&Gilman's. Manual de Farmacología y Terapéutica. Bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial McGrawMedical. 2008.
  18. Guía de los Trabajos Prácticos. Cátedra de Farmacología y Toxicología. Escuela Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. 2006.

19. Guillermo Navarro, Ruth Fabiola. Comprobación del efecto cicatrizante de *Peperomia scutellaefolia* R. et P., aspectos etnofarmacológicos, botánicos y estudio químico. UNMSM. 2002.
20. Gracia Milián, Ana Julia; Martínez T. María del Carmen; Morón R. Francisco y Pinedo Zulima. Efecto espasmolítico del aceite de *Piper auritum* en el músculo liso intestinal. 2001. Rev Cubana Plant Med. Disponible en:  
[http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id\\_articulo=4806&id\\_seccion=495&id\\_ejemplar=529&id\\_revista=77](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=4806&id_seccion=495&id_ejemplar=529&id_revista=77)
21. Hammond et al. B., Gerald, Fernández D., Irma; Villegas F., León y Vaisberg J., Abraham. "A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, department of Ancash, Perú" (Estudio de las plantas medicinales tradicionales del Callejón de Huaylas, departamento de Ancash, Perú). *Journal of Ethnopharmacology* 61 (1998).
22. Harrison T. Jack. *Farmacognosia I*. Lima-Peru. 1984. Pag 16, 73, 113.
23. Hitner Henry. *Introducción a la farmacología*. Mexico. McGraw-HillInteramericana editores S.A. 2007. Pág. 194.
24. Katzung Bertram G. *Farmacología Básica y Clínica*. Decima edición. Edit. El Manual Moderno. México. 2007.
25. Kazem M., Naseri G. y Yahyavi H. "Antispasmodic Effect of *Piper nigrum* Fruit Hot Water Extract on Rat Ileum" (Efecto antiespasmódico de la infusión de la fruta de *Piper nigrum* en íleon de rata). © 2008 Asian Network for Scientific Information. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (11): 1492-1496, 2008. Scientific Information.
26. Krinke G. *The handbook of experimental animals*. Editors-in-Chief. 2000. Pág. 364
27. Ledón Nuris, Casacó Angel, González Ricardo, Merino Nelson, González Addys y Tolón Zenaida. Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propoleo rojo colectado en Cuba. *Rev Cubana Farm* v.30 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 1996. Disponible en:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75151996000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100008)

28. León B. et al. Piperaceae endémicas del Perú. Rev. peru. biol. Número especial 13(2): 492s - 563s. © Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Diciembre 2006.
29. Lock U. Olga. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales, Lima Perú: Copyright Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; Segunda Edición. 1994. Pág. 59
30. Lorente Lamarca, Dolores. Estudio Farmacognóstico de *Euphorbia hirta* L. Departamento de Farmacología. Universidad de Granada. 2006.
31. Llanio, M.; Fernández, M. D.; Mata, A.; Cabrera, B.; Valdés-Iglesias O.; Díaz C.; Cabranes Y. ¿Poseen Algunas Algas de las Costas Cubanas Propiedades Antiinflamatorias, Analgésicas y Antioxidantes?. Departamento de Bioactivos Marine y Productos Naturales. CEBIMAR. Instituto de Oceanología. Serie Oceanológica. No. 1, 2003.
32. Mantilla H. Justo. Las plantas medicinales de nuestra madre tierra. Cusco, Perú: IEPLAM; 2002. p, 3-4.
33. Manual de técnicas de investigación. Marzo 1995. CYTEC
34. Mosby. Diccionario General. Ediciones Harcourt. S.A. 2000.
35. Moscoso, G. Tesis. Actividad Hipoglusemiente de *Notholaena nivea* (Poiret) Desv. "Inca saire" en pacientes con diabetes tipo 2. Carrera profesional de Farmacia y bioquímica. UNSAAC. Cusco-Perú. 2002.
36. Muñoz C.E., Vergel N.E., Aragón D.M., Ospina L.F. Efecto antinociceptivo de *Critoniella acuminata*, *Physalis peruviana* y *Salvia rubescens*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 38 (1), 31-41, 2009.
37. Nagle Hitner. Introducción a la Farmacología. Editorial McGraw Hill. 5ta Edición. 2007. Pág. 193.
38. Palacios V. J. Plantas Medicinales Nativas de Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONCYTEC. Segunda Edición. Lima. Perú. 1997.
39. Palma Cartes, J.R. Estudio de la interacción antinociceptiva entre nimesulida y paracetamol en dolor agudo experimental. Universidad de Chile, Facultad de odontología y Medicina, Dpto. de Neurofarmacología. Santiago-Chile. 2005. Disponible en:  
[http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/palma\\_j/sources/palma\\_j.pdf](http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2005/palma_j/sources/palma_j.pdf)
40. Pascual G.; Riascos D.; Holguín E.; Aceros H.; Velásquez S. "Guía para la Realización del Informe del Laboratorio de Intestino Aislado de Rata".

Departamento de Ciencias Fisiológicas Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana. Colombia 1999.

41. Penzo Franco. Farmacología en órgano aislado. Panlab SL. Technology for bioresearch. 2003.
42. Rodríguez Palomares, Consuelo y Rodríguez Palomares, Arturo. Farmacología clínica. McGraw-hill interamericana editores, S.A. México. 2005. Pág. 2, 9-10, 253-290.
43. Ruiz Salvador, Ana Karelía; De la Paz Naranjo, José; García Milián, Ana Julia; Sebazco Pernas, Caridad; Carrazana Lee, Armando y Pereira Relis, Elizabeth. Actividad espasmolítica de una tintura de *Melissa officinalis* L. en modelos experimentales. Rev Cubana Plant Med v.9 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic. 2004.
44. Sadraei H., Asghari G. y Khazael M. "Relaxant effect of four fractions separated from alkaloid extract of *Pycnocycla spinosa* on rat isolated ileum" (Efecto relajante de cuatro fracciones separadas de alcaloides del extracto de *Pycnocycla spinosa* en íleon aislado de rata). Isfahan University of Medical Sciences. Research in Pharmaceutical Sciences, 2008; 3(2):9-14
45. Saldierna F. Recetario de Hierbas y plantas medicinales. Lima: Ediciones Euromexico S.A.de C.V.; 2000. Pág. 3.
46. Sharp P. The Laboratory Rat. Editor-in-Chief. 1998.
47. Suckow M. "The Laboratory Rat" (Las ratas de laboratorio), American college of laboratory. 2006. Pág. 104, 608-609.
48. Tebbs, M.C. «Piperaceae.», Kubitzki, K., Rohwer, J.G. & Bittrich, V. (Editores). The Families and Genera of Vascular Plants. II. Flowering Plants - Dicotyledons. Springer-Verlag: Berlín. (1993).
49. Trensguerres, J.A.F. Fisiología Humana. Editorial McGraw-Hill. Madrid. 1992. Pág. 805-806.
50. Tupayachi A., Galiano, W. Missouri botanical garden herbarium. 2004. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Specimen/2739302>
51. Villar del Fresno Ángel M. Farmacognosia general. Editorial síntesis S.A. España. 1999. Pág. 47-56
52. Watson, L., Dallwitz M.J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. 1992. (Version: 21st March 2010). Disponible en: <http://delta-intkey.com/angio/www/piperace.htm>

# ANEXOS

## ANEXO N°01: Identificación Botánica de la especie en estudio

### UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL  
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO  
Calle Tigré N° 127  
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA  
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210  
243835 - 243836 - 243837 - 243838
- LOCAL CENTRAL  
Plaza de Armas s/n  
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015
- MUSEG INKA  
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA  
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"  
Av. De la Cultura N° 721  
"Estudio Universitario" - Teléfono: 227192

### LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS (CUZ)

### CERTIFICA

Que, la Bachiller: **LOPEZ ALIAGA OROSCO, GILDA LEONOR**, de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; ha presentado al Herbario Vargas (CUZ) una muestra botánica herborizada para su determinación.

Dicho material ha sido sometido a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y comparación con muestras existentes en el herbario; de la que se desprende que el material analizado corresponde a la especie *Peperomia verruculosa*. Siendo su posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981)

Reino : Vegetal  
División : Magnoliophyta  
Clase : Magnoliopsida  
Subclase : Magnolidae  
Orden : Piperales  
Familia : Piperaceae  
Género : *Peperomia*  
Especie : *Peperomia verruculosa* Dahlstedt ex A.W. Hill.  
N. vulgar : Pisco-papa, uchuy-papa, pinchinchu-papa.

Se le expide, la presente certificación de determinación de la especie para los fines que viera por conveniente

Cusco, Abril de 2010

Arch/HV CUZ



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco  
Herbario Vargas (CUZ)  
M. Sc. Encarnación De La Torre Mavorga  
Directora

ANEXO N°02: Certificado sanitario de los ratones



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS  
COORDINACIÓN DE BIOTERIO

CERTIFICADO SANITARIO N° 223-2010

Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M - 40 - 2010
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 60
Cepa	: Balb/c/CNPB	Edad	: 30 a 34 días
Peso	: 20 a 24 g	Sexo	: Machos
Boleta de Venta N°	: 004-12985	G.R. 022307	Destino : Glida Leonor López Aliaga Orosco - Cuzco
Fecha	: 28-09-10		

El Médico Veterinario, que suscribe, **Arturo Rosales Fernández**, Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias \*.

\*Referencia : PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.

Chorrillos, 28 de Setiembre del 2010  
(Fecha de emisión del certificado)

NOTA : El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.

  
M.V. Arturo Rosales Fernández  
C.M.V.P. 1588

## ANEXO N°03: Constancia de adquisición de ratas



*Universidad Católica de Santa María*

☎ (5154)251210 ☎ (5154)251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo 1350  
AREQUIPA - PERÚ

### CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE COORDINADOR DE LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA, DEJA CONSTANCIA QUE: LA SRTA. GILDA LEONOR LOPEZ ALIAGA OROSCO, HA ADQUIRIDO DEL BIOTERIO DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA 15 RATAS, DE RAZA WISTAR NOVERGICUS, SIENDO SU CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA LA SIGUIENTE:

**Reino:** Animal

**Phylum:** Chordata

**Sub-phylum:** Vertebrata o Craniata

**Super-clase:** Gnathostomata

**Clase:** Mamíferos

**Sub-clase:** Theria

**Infra-clase:** Eutheria

**Orden:** Rodentia

**Sub-Orden:** Myomorpha

**Familia:** Wistar norvegicus

**Género:** Wistar

**Especie:** Rattus norvegicus

SE EXPIDE LA PRESENTE CONSTANCIA A SOLICITUD DE LA INTERESADA, PARA LOS FINES QUE CONVENGA.

AREQUIPA, 2010-10-22



**ANEXO N°04: Constancia de uso del Equipo de órganos aislados**



**Universidad Católica de Santa María**

(5154)251210 (5154)251213 ucsm@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe Apto. 1350  
AREQUIPA - PERÚ

**CONSTANCIA**

No.0008

EL QUE SUSCRIBE COORDINADOR DE LABORATORIOS DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA, DEJA CONSTANCIA QUE:

LA SEÑORITA **GILDA LEONOR LÓPEZ ALIAGA OROSCO**, EGRESADA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS, MATEMÁTICAS, FARMACIA E INFORMÁTICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO, HA DESARROLLADO SU TRABAJO DE INVESTIGACIÓN TITULADO "EFECTO ANALGÉSICO IN VIVO Y ESPASMOLÍTICOS IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 70% DE *Peperomia verruculosa Dahlstedt ex A.W. Hill*. (UCHUY PAPA) EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN" EN LO REFERENTE AL EFECTO ESPASMOLÍTICO IN VITRO UTILIZANDO EL EQUIPO DE ÓRGANOS AISLADOS EN EL LABORATORIO H-203 DE LA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA, EN EL PERIODO DEL 18 AL 22 DE OCTUBRE.

SE EXPIDE LA PRESENTE CONSTANCIA A SOLICITUD DE LA INTERESADA, Y PARA LOS FINES QUE CONVENGA.

Arequipa, 2010-10-22

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA  
*Gilda Orosco*  
Prof. Gilda Leonor López Aliaga Orosco  
Coordinadora de Laboratorios y Gabinetes

## **ANEXO N°05: Preparación de los reactivos para el screening fitoquímico**

- **Ninhídrina.**- 0,2 g de Ninhídrina en 100 ml de etanol.
- **Cloruro Férrico.**-1 g de cloruro férrico en 100 ml de agua destilada.
- **Solución de Gelatina - Sal.**- Se prepara una solución de NaCl al 10 %, luego gelatina al 1% en solución acuosa, mezclar ambas soluciones de volúmenes iguales.
- **Shinoda.**- Se usa limadura de magnesio más gotas de ácido clorhídrico concentrado.
- **Liebermann - Burchard.**- Se emplea gotas de anhídrido acético más gotas de ácido sulfúrico concentrado.
- **Bortrager.**- Se emplea solución de hidróxido de sodio al 10 %.
- **Dragendorff.**- 8 g de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 20 ml de ácido nítrico ( $d=1,18 \text{ g/mL}$ ) y 27,2 g de KI en 50 ml de agua. Mezclar las 2 soluciones y dejar en reposo durante 21 horas. Decantar y completar a 100 mL.
- **Mayer.**- 1,35 g de  $\text{HgCl}_2$  en 50 mL de agua. Agregar 5 g de KI a la solución y diluir a 100 mL.

### **PROCEDIMIENTO A SEGUIR EN LA IDENTIFICACIÓN.**

- **Azúcares Reductores: Reacción de Benedict.**

A 0.5mL de extracto diluido agregar 0.2mL de reactivo de Benedict. Se somete a ebullición por 5 minutos y se deja enfriar. La formación de un precipitado rojo ladrillo indica positivo para azúcares reductores.
- **Glucósidos: Reacción de Benedict Modificado.**

A 200 mg de extracto seco agregar 2mL de HCl al 1% y reflujar por 5 minutos, enfriar, neutralizar con NaOH al 1 % y realizar la reacción de Benedict. La formación de un precipitado rojo ladrillo indica positivo para glucósidos.
- **Aminoácidos: Reacción de Ninhídrina.**

A 0.5mL del extracto seco disuelto acidificado (HCl 1%) calentar por 5 minutos en baño de agua a ebullición. Coloraciones rojizas, violetas o amanillas indican prueba positiva.
- **Compuestos Fenólicos: Reacción con  $\text{FeCl}_3$  (1% en  $\text{H}_2\text{O}$ )**

Se toma una cantidad de extracto y se reparte en 5 lunas de reloj, añadiendo unas gotas de agua destilada. Se deja un testigo y se adiciona una gota de cloruro férrico en el segundo, dos en la tercera y así sucesivamente hasta llegar al quinto. Coloraciones verdes a marrón para derivados de catecol y coloraciones azuladas para derivados de piragalol.

➤ **Flavonoides: Reacción de Shinoda**

A una cantidad de extracto se le agrega un trozo de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. Coloración amarilla a roja para flavonas y flavonoles, rojo a magenta para flavanoles, rojo, magenta, violeta y azul para flavanonas, no dan coloraciones isoflavononas, chalconas y auronas.

➤ **Flavonoides: Prueba del Amoniaco**

En una tira de papel filtro se coloca una gota de extracto disuelto. Se seca y se expone a los vapores de amoniaco. Coloración amarilla para flavonas, flavonoles y xantonas, amarillo-rojo para chalconas y auronas, naranja para dihidroflavonoles, incoloro-naranja para dihidroflavonas y azul para antocianinas.

➤ **Taninos: Reacción Gelatina (1g) - NaCl (10mg) (100 mL H<sub>2</sub>O)**

A 0.5 ml de extracto agregar 3 a 5 gotas de la solución gelatina sal. Formación de precipitado indica prueba positiva.

➤ **Alcaloides: Reacción de Dragendorff**

Se toma 0.5ml de la solución acida del extracto y agregar 2 a 3 gotas de reactivo de Dragendorff. La formación de un precipitado o coloración roja indica prueba positiva para alcaloides.

➤ **Alcaloides: Reacción de Mayer**

Se toma 0.5 ml del extracto acuoso y agregar 2 a 3 gotas de reactivo de Mayer. La formación de un precipitado blanco o blanco amarillento indica prueba positiva para alcaloides.

➤ **Saponinas: Indicé Afrosimétrico o de la Espuma**

En un tubo de ensayo se colocan 0.5 g de extracto y se le agrega 10ml de agua. Se agita vigorosamente por 30 segundos y se deja en reposo durante 15 minutos. Se considera positivo si la espuma sobrenadante tiene una altura mayor a 5 mm.

➤ **Triterpenos - Esferoides: Reacción de Liebermann-Burchard**

Se coloca aproximadamente 0.5 ml de extracto; y se agrega 2 a 3 gotas de reactivo de Liebermann-Burchard. Una coloración azul o verde para esferoides, rojo, rosado o violeta para triterpenos y amarillo pálido para esferoides o triterpenos saturados.

➤ **Quinonas: Reacción de Bornträger**

El material seco y pulverizado se macera en benceno por 24 horas. 5ml de extracto bencénico se agitan con 2.5ml de NaOH al 10%. Coloración roja de la capa alcalina para antraquinonas.

**ANEXO N°06: Ficha de datos de la recolección de la especie**

<b>Nombre común</b>	
<b>Departamento/provincia</b>	
<b>Distrito/localidad</b>	
<b>Altitud</b>	
<b>Habitad</b>	
<b>Naturaleza</b>	
<b>Parte recolectada</b>	
<b>Fecha de recolección</b>	
<b>Peso total de planta recolectada</b>	
<b>Nombre de Recolector</b>	

Fuente: Referencia tomada del Herbario Vargas (CUZ) - UNSAAC

**ANEXO N°07: Ficha de recolección de las características organolépticas del extracto**

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>EXTRACTO HIDROALCOHOLICO</b>
<b>Color</b>	
<b>Olor</b>	
<b>Sabor</b>	
<b>Aspecto</b>	
<b>Consistencia</b>	

Fuente: Referencia tomada de (Chávez S. y Sucari M. 2009)

## ANEXO N°08: Ficha de recolección de datos de las pruebas de solubilidad

PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	
SOLVENTE	T° AMBIENTAL: 17°C
Agua destilada	
Solución fisiológica	
Metanol	
Etanol al 40%	
Etanol al 50%	
Etanol al 70%	
Etanol al 96%	
Acetato de etilo	
Acetona	
Cloroformo	
Éter etílico	
Benceno	
Hexano	
Éter de petróleo	
Bencina	

Fuente: Pruebas de solubilidad

### Leyenda:

- (+ + +) :Muy soluble
- (+ + -) :Soluble
- (+ - -) :Parcialmente soluble
- (- - -) :Insoluble

**ANEXO Nº9: Ficha de recolección del análisis fitoquímico cualitativo**

ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO		
COMPONENTES	REACCION/ PRUEBA	RESULTADOS
Azúcares reductores	Benedict	
Glucósidos	HCl 1% Reflujar NaOH 1% Benedict	
Alcaloides	Dragendorf	
Aminoácidos	Ninhidrina	
Flavonoides (flavonas e isoflavonas)	Shinoda	
Compuestos fenólicos	FeCl <sub>3</sub> 1%	
Taninos	Gelatina – NaCl 1%	
Saponinas	Índice de espuma	
Lactonas: α,β-insaturada	Baljet	
Esteroides y triterpenoides	Lieberman-Bourchad Salkowski	
Quinonas (antraquinonas y naftoquinonas)	Bornträger	
Aldehídos y otros grupos reductores	Fehling	
Anillos aromáticos	Formaldehido- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Dobles enlaces olefínicos	Permanganato de potasio	

Fuente: Screening fitoquímico

**Leyenda:**

- --- : Ausencia de metabolito
- + - - : Leve presencia de metabolito
- + + - : Moderada presencia del metabolito
- + + + : Intensa presencia del metabolito

**ANEXO N° 10: Ficha de recolección de datos del efecto analgésico**

GRUPO	TIEMPO (min)	INDUCCION Acido acético 3%	CONTROL Solución fisiológica	PATRON Indometacina	EXTRACTO DOSIS 1 mg/Kg	EXTRACTO DOSIS 2 mg/Kg	EXTRACTO DOSIS 3 mg/Kg	OBSERVACION N° de contracciones y estiramientos (20 min)
G-1	1							
	2							
	3							
	4							
G-2	1							
	2							
	3							
	4							
G-3	1							
	2							
	3							
	4							
G-4	1							
	2							
	3							
	4							
G-5	1							
	2							
	3							
	4							

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO Nº 11: Ficha de recolección de datos del efecto espasmolítico**

GRUPOS	RATAS	INDUCTOR Acetilcolina	PATRON Atropina	EXTRACTO 50mg/ml	EXTRACTO 100mg/ml	EXTRACTO 200mg/ml	log [C1]	Contracción (g)	Contrac- Basal	% Efecto (E/Emax) x 100
G-1	1									
	2									
	3									
G-2	1									
	2									
	3									
G-3	1									
	2									
	3									
G-4	1									
	2									
	3									
G-5	1									
	2									
	3									

FUENTE: Elaboración propia.

FECHA: ..... Hora: .....

Lugar: Laboratorio de Farmacología de la C.P. de Farmacia y Bioquímica-UCSM

**ANEXO N° 12: Cálculo de dosis de extracto para los animales de experimentación**

**Extracto de 50mg/Kg:** para ratón de 26g de peso en promedio.

$$50 \text{ mg} \text{ ---- } 1000\text{g}$$

$$X \text{ ----- } 26 \text{ g}$$

$$X = 1.3 \text{ mg} \times 4 = 5.2 \text{ mg de extracto para 5 mL}$$

Por lo tanto el volumen administrado a cada animal es 1.25 mL

**Extracto de 25 mg/Kg:** para ratón de 27g de peso en promedio.

$$25 \text{ mg} \text{ ---- } 1000 \text{ g}$$

$$X \text{ ----- } 27 \text{ g}$$

$$X = 0.67\text{mg} \times 4 = 2.7 \text{ mg de extracto para 5 mL}$$

Por lo tanto el volumen administrado a cada animal es 1.25 mL

**Extracto de 12.5 mg/Kg:** para ratón de 29 g de peso en promedio.

$$12.5\text{mg} \text{ ---- } 1000 \text{ g}$$

$$X \text{ ----- } 29 \text{ g}$$

$$X = 0.36 \times 4 = 1.45 \text{ mg de extracto para 5 mL}$$

Por lo tanto el volumen administrado a cada animal es 1.25 mL

**Indometacina 10mg/Kg:** para ratón de 24 g de peso en promedio.

$$10 \text{ mg} \text{ ---- } 1000 \text{ g}$$

$$X \text{ ----- } 24 \text{ g}$$

$$X = 0.24 \times 4 = 0.96 \text{ mg de extracto para 5 mL}$$

Por lo tanto el volumen administrado a cada animal es 1.25 mL