

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO
ABAD DEL CUSCO**

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

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**EFFECTO ANTIINFLAMATORIO Y TOXICIDAD AGUDA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE *Acmella oleracea* (L.) R.K.
Jansen (Botoncillo) EN RATONES ALBINOS**

**TESIS PRESENTADA POR:
Br. MARLENI NUÑEZ GUTIERREZ**

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**ASESORA:
M.C.s. CARLA DEL CARPIO JIMENEZ**

**CO ASESOR:
M.C.s. CARLOS SERRANO FLORES**

**CUSCO – PERÚ
2011**

TESIS AUSPICIADA POR EL CONSEJO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNSAAC

DEDICATORIA

*A Dios por guiarme y fortalecerme
todos los días de mi vida.*

*A mis padres Pedro y Aquilina
por su amor, por su apoyo
incondicional y esfuerzos que
realizan para que sea mejor como
persona y profesional cada día.*

*A mis hermanos Cesar, Mauro, Hilan,
Américo, Daniel y Lidia por apoyarme en
todo momento, por sus consejos y estar
pendiente de mis pasos, a todos mis
sobrinos en especial a Mirna.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por abrirme las puertas y cumplir mis expectativas profesionales.

Al consejo de investigación de la UNSAAC por el apoyo económico para la realización de la presente tesis.

A mi asesora MCs. Carla del Carpio Jiménez, por su aliento, orientación y darme sugerencias respecto a la elaboración de la investigación.

Al Magíster Carlos Serrano Florez, por su co-asesoramiento y enseñanzas brindadas en la investigación de los estudios preliminares de la especie estudiada.

A la Profesora Velia, Bibliotecaria de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, por su amabilidad y cariño.

A todas mis amigas que estuvieron pendientes de mí y en especial a mi amiga Verónica por apoyarme en la ejecución de este trabajo de investigación y darme aliento en situaciones difíciles.

A cada uno de los docentes de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica por haber contribuido en mi formación profesional.

PRESENTACIÓN

Es muy grato presentar al público lector el trabajo de Investigación intitulada "Efecto antiinflamatorio y toxicidad aguda del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) en ratones albinos realizado en Cusco.

La realización del trabajo de investigación significó un considerable esfuerzo que ha permitido obtener los resultados que presento en las conclusiones y lo cual estimo significativo y un aporte valioso para la farmacología de la especie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen e intercambio del conocimiento científico, que espero pueda servir no solo a los investigadores, sino a los estudiantes, profesionales de Farmacia y Bioquímica y población en general, para el adecuado uso y manejo sostenible de esta especie dentro de nuestro país.

La investigación se presenta por 2 partes: Evaluación de la toxicidad aguda en ratones albinos para encontrar las dosis de extracto a utilizar en la Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico al 70% de la parte aérea de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen en ratones albinos *Mus musculus*.

Mi persona agradece a los diferentes profesionales que apoyaron en la certificación botánica, recolección, estudio preliminar, evaluaciones, etc. que apoyaron para que este trabajo se haga realidad.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
PRESENTACIÓN.....	iii
ABREVIATURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	ix

CAPITULO I GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	3
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4. JUSTIFICACIÓN.....	5
1.5. HIPÓTESIS.....	5

CAPITULO II MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. ANTECEDENTES	7
2.1.1. ANTECEDENTES SOBRE METODOLOGÍA FARMACOLÓGICOS.....	7
2.1.2. ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS	10
2.1.2.1. DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.....	10
2.1.2.2. DEL GÉNERO <i>Acmella</i>	11

2.1.3.	ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS.....	12
2.1.3.1.	DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.....	12
2.1.3.2.	DEL GÉNERO <i>Acmella</i>	12
2.1.4.	ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS.....	13
2.1.4.1.	DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.....	13
2.1.4.2.	DEL GÉNERO <i>Acmella</i>	14
2.2.	BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	17
2.2.1.	ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA PLANTA EN ESTUDIO.....	17
2.2.1.1.	SINONIMIA DEL NOMBRE CIENTÍFICO.....	17
2.2.1.2.	NOMBRE COMUNES.....	17
2.2.2.	IDENTIFICACION BOTÁNICA.....	18
2.2.3.	ECOLOGIA.....	19
2.2.4.	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	19
2.2.5.	USOS.....	19
2.2.6.	FORMA DE CULTIVO.....	20
2.2.7.	HÁBITAT.....	20
2.2.8.	COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	20
2.3.	CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA ASTERACEAE.....	21
2.4.	INFLAMACIÓN.....	23
2.4.1.	CONCEPTO.....	23
2.4.2.	INFLAMACIÓN AGUDA.....	24
2.4.3.	MEDIADORES QUIMICOS DE LA INFLAMACIÓN.....	27
2.4.4.	INFLAMACION CRÓNICA.....	31
2.5.	MODELOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.....	32
2.6.	FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS.....	33
2.6.1.	GLUCOCORTICOIDES.....	33
2.6.2.	ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS(AINES)	34
2.6.2.1.	CLASIFICACIÓN DE LOS AINES.....	35
2.7.	AGENTE INFLAMATORIO.....	36
2.8.	DESCRIPCIÓN DEL ANTIINFLAMATORIO PATRON INDOMETACINA.....	36
2.9.	DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA.....	39

2.9.1.	TOXICIDAD.....	39
2.9.2.	PRUEBAS TOXICOLÓGICAS.....	39
2.9.2.1.	VÍA DE ADMINISTRACIÓN.....	39
2.9.2.2.	VÍA ORAL.....	40
2.9.2.3.	SELECCIÓN DE DOSIS.....	40
2.9.2.4.	RELACION DOSIS-TOXICIDAD.....	41
2.9.2.5.	TOXICIDAD AGUDA.....	41
2.9.2.6.	LA DOSIS LETAL COMO CONSTANTE BIOLÓGICA.....	42
2.9.2.7.	EL METODO DE LORKE PARA LA DETERMINACIÓN DE DL50.....	43
2.9.2.8.	PRUEBAS DESCRIPTIVAS DE TOXICIDAD EN ANIMALES.....	45
2.9.2.9.	GLOSARIO.....	46

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	48
3.1.1.	MUESTRA VEGETAL.....	48
3.1.2.	MUESTRA BIOLÓGICA.....	48
3.2.	MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.....	48
3.2.1.	MATERIALES DE CAMPO.....	48
3.2.2.	MATERIALES DE LABORATORIO.....	48
3.2.3.	INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.....	49
3.2.4.	REACTIVOS.....	49
3.2.5.	OTROS MATERIALES.....	50
3.3.	RECURSOS E INFRAESTRUCTURA	50
3.4.	DISEÑO METODOLÓGICO.....	50
3.4.1.	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	50
3.4.2.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	51
3.4.2.1.	PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO.....	51
3.4.2.2.	PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA.....	52

3.4.3.	DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	57
3.4.3.1.	VARIABLES IMPLICADAS.....	57
3.4.3.1.1.	VARIABLES INDEPENDIENTES.....	57
3.4.3.1.2.	VARIABLES DEPENDIENTES.....	59
3.4.3.2.	VARIABLES INTERVINIENTES.....	60
3.4.3.3.	CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	61
3.5.	METODOS Y PROCEDIMIENTOS.....	63
3.5.1.	PREPARACION DE LA PLANTA EN ESTUDIO	63
3.5.1.1.	RECOLECCIÓN,.....	63
3.5.1.2.	IDENTIFICACION BOTANICA.....	63
3.5.1.3.	SECADO DE LA MUESTRA.....	63
3.5.1.4.	MOLIENDA.....	63
3.5.1.5.	DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD.....	63
3.5.1.6.	OBTENCION DE EXTRACTOS.....	64
3.5.1.7.	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.....	65
3.5.1.8.	ANALISIS FITOQUÍMICO.....	65
3.6.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	66
3.6.1.	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO.....	66
3.6.2.	PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA POR VIA ORAL.....	71
3.7.	TECNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOPIACIÓN DE DATOS.....	73
3.8.	PROCESAMIENTO DE DATOS.....	73

CAPITULO IV

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1.	DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES.....	75
4.1.1.	HUMEDAD.....	75
4.1.2.	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN.....	75
4.1.3.	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.....	76
4.1.4.	ANALISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO.....	77

4.2.	DE LA TOXICIDAD AGUDA POR EL METODO DE LORKE.....	78
4.3.	DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VIA ORAL.....	82
4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA ORAL.....	83
4.5.	DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA TÓPICA.....	89
4.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA TÓPICA.....	90
	CONCLUSIONES	98
	RECOMENDACIONES	100
	BIBLIOGRAFÍA	101
	ANEXOS	108
	FOTOGRAFÍAS	118

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: IDENTIFICACION BOTANICA POR EL HERBARIO CUZ.....	109
ANEXO 2: CERTIFICADO SANITARIO DE LOS RATONES ALBINOS.....	110
ANEXO 3: PRUEBAS FITOQUIMICAS REACCIONES DE RECONOCIMIENTO.....	111
ANEXO 4: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VIA ORAL.	113
ANEXO 5: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VIA TOPICA.....	114
ANEXO 6: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA LA DETERMINACION PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN.....	115
ANEXO 7: FICHA PARA LA RELECCION DE DATOS PARA LA TOXICIDAD AGUDA FASE I.....	116
ANEXO 8: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LAS CARACTERISTICAS A OBSERVARSE EN LA DETERMINACION DE LA TOXICIDAD AGUDA.....	117

INDICE DE CUADROS

CUADRO 2.1: MODO DE UTILIZACIÓN DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen.....	20
CUADRO 2.2: MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA REACCIÓN INFLAMATORIA Y SU POSIBLE MECANISMO.....	24
CUADRO 2.3: MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN.....	28
CUADRO 2.4: ESTUDIO DE VALORES DE DL50.....	42
CUADRO 2.5: MODELO PARA DETERMINAR LAS NUEVAS DOSIS EN EL SEGUNDO TEST DE LORKE.....	44
CUADRO 2.6: EJEMPLO PARA DETERMINAR LAS NUEVAS DOSIS EN EL SEGUNDO TEST DE LORKE.....	45
CUADRO 3.1: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES IMPLICADAS.....	55
CUADRO 3.2: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES INTERVINIENTES.....	56
CUADRO 3.3: SOLVENTES EN ORDEN CRECIENTE DE POLARIDAD.....	65
CUADRO 3.4: REACTIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	66
CUADRO 3.5: DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA ORAL.....	69

CUADRO 3.6: DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO	
ANTIINFLAMATORIO VÍA TOPICA.....	69
CUADRO 3.7: TOXICIDAD AGUDA FASE I Y II.....	73
CUADRO 4.1: PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS PARTES AEREAS DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K.Jansen (botoncillo).....	75
CUADRO 4.2: PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN.....	75
CUADRO 4.3: PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (Botoncillo).....	76
CUADRO 4.4: RESULTADOS DEL ANÁLISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANOLICO SECO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (Botoncillo).....	77
CUADRO 4.5: RESULTADOS DE LA FASE I DEL ENSAYO DE LA TOXICIDAD AGUDA VÍA ORAL DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen.....	78
CUADRO 4.6: RESULTADOS DE LA FASE II DE LA TOXICIDAD AGUDA VÍA ORAL DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (Botoncillo).....	79
CUADRO 4.7: DOSIS LETAL MEDIA DL50 DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO AL 70% DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen ADMINISTRADO VÍA ORAL A RATONES ALBINOS.....	81
CUADRO 4.8: EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO AL 70% DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen ADMINISTRADO VÍA ORAL SOBRE EL EDEMA AURICULAR INDUCIDO POR TPA (13-ACETATO DE12- TETRADECANOILFORBOL).....	82
CUADRO 4.9: RESULTADOS DESCRIPTIVOS DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA ORAL DE DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO AL 70% DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen(Botoncillo).....	83
CUADRO 4.10: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA ORAL DEL EXTRACTO ETANÓLICO 70% DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen.....	84
CUADRO 4.11: COMPARACIONES MÚLTIPLES DE DUNCAN PARA EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO EXTRACTO ETANÓLICO SECO AL 70% DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen ADMINISTRADO VIA ORAL.....	85
CUADRO 4.12: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen APLICADO VIA ORAL.....	86
CUADRO 4.13: EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO AL 70% DE <i>ACMELLA OLERACEA</i> (L.) R.K. Jansen ADMINISTRADO VÍA TÓPICA SOBRE EL EDEMA AURICULAR INDUCIDO POR TPA.....	89

CUADRO 4.14: RESULTADOS DESCRIPTIVOS DEL EDEMA OCASIONADO DE DIFERENTES DOSIS DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO AL 70% DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen.....	90
CUADRO 4.15: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO AL 70% DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen TRAS LA ADMINISTRACIÓN VÍA TÓPICA.....	91
CUADRO 4.16: PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES DE DUNCAN PARA EDEMA PRODUCIDO TRAS LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO AL 70% DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen.....	92
CUADRO 4.17: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (BOTONCILLO) APLICADO VÍA TÓPICA.....	93
CUADRO 4.18: RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE LAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN ORAL Y TÓPICA UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (BOTONCILLO).....	95
CUADRO 4.19: ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN ORAL Y TÓPICA UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (BOTONCILLO).....	96
CUADRO 4.20: COMPARACIONES MÚLTIPLES DE DUNCAN PARA LAS VÍAS DE ADMINISTRACIÓN ORAL Y TÓPICA UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (BOTONCILLO).....	97

INDICE DE ECUACIONES

ECUACION 1: PORCENTAJE DE HUMEDAD.....	64
ECUACION 2: PORCENTAJE DE EXTRACCION DEL EXTRACTO.....	64
ECUACION 3: EDEMA.....	71
ECUACION 4: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN.....	71

INDICE DE FLUJOGRAMAS

FLUJOGRAMA 3.1: OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VIA ORAL Y VIA TÓPICA.....	62
FLUJOGRAMA 3.2: METODOLOGIA PARA LA EVALUACION DEL EFECTO	

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1. ESTRUCTURA QUÍMICA SPILANTOL.....21

FIGURA 2.2. ESTRUCTURA QUÍMICA INDOMETACINA.....36

INDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO 2.1: A) ACONTECIMIENTOS EN LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN Y B) MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN.....29

GRÁFICO 2.2: A) RELACIÓN ENTRE LOS CUATRO SISTEMAS MEDIADORES PLASMÁTICOS EN LA INFLAMACION, Y B) GENERACIÓN DE METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO Y SUS FUNCIONES EN LA INFLAMACIÓN.....30

GRÁFICO 4.1: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN EN RELACIÓN A LAS DOSIS ADMINISTRADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen APLICADO VIA ORAL.....88

GRAFICO 4.2: PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN EN RELACIÓN A LAS DOSIS ADMINISTRADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) APLICADO VIA TOPICA.....94

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AA	Ácido araquidónico
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
CI	Intervalo de confianza
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
COX	Ciclooxigenasa
C3a	Complemento 3 activado
C5a	Complemento 5 activado
DAG	Diacilglicerol
DL50	Dosis letal media
FNT	Factor de necrosis tumoral
g	gramos
HETE	Ácido hidroperoxieicosatrienoico
IL-1	Interleucina - 1
IP ₃	Inositol trifosfato
Kg	Kilogramos
KCN	Cianuro de potasio
L	Litros
LOX	Lipoxigenasa
LTB	Leucotrieno
NO	Oxido nítrico
PAF	Factor activador de plaquetas
SNC	Sistema nervioso central
TPA	12- O-tetradecanoil forbol-13 -acetato

RESUMEN

La especie vegetal *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) es utilizada en la medicina popular por sus propiedades antiinflamatorias, anestésica dental, antiespasmódicas, también empleada para tratar diabetes y afecciones hepáticas.

Los objetivos de la investigación fueron evaluar el efecto antiinflamatorio vía oral y vía tópica además de la toxicidad aguda vía oral del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) en ratones albinos.

Las partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo), fueron extraídos por maceración en etanol al 70%. El efecto antiinflamatorio del extracto etanólico se evaluó utilizando el modelo de edema auricular inducido por TPA (13-acetato de 12- tetradecanoilforbol). La determinación de la toxicidad aguda se realizó por vía oral, bajo el método de Lorke.

Para la determinación del efecto antiinflamatorio vía oral, se evaluaron dosis crecientes del extracto etanólico 300mg/Kg, 600mg/Kg, 900mg/Kg, 1200mg/Kg y para la vía tópica 0.5mg/oreja, 2.5 mg/oreja y 5 mg/oreja; las cuales fueron evaluados en el modelo inflamatorio. Los resultados mostraron que las dosis de extracto administrado por vía oral y tópica redujeron la inflamación de las orejas tratadas de los ratones albinos, con un porcentaje de inhibición de 35.21%, 48.09% para las dosis de 900 mg/Kg y 1200 mg/Kg respectivamente, administrados vía oral y para la vía tópica se tuvieron porcentajes de inhibición del 38.28% y 70.71% para las dosis de 2.5mg/Oreja y 5mg/Oreja respectivamente; comparando con el fármaco patrón Indometacina solo la dosis de 5mg/Oreja de extracto aplicado vía tópica superó el porcentaje de inhibición de inflamación. El extracto tuvo una respuesta dosis dependiente frente a la inflamación inducida por TPA.

La determinación de la toxicidad aguda se realizó en dos fases por vía oral en ratones albinos de acuerdo al método de Lorke, obteniéndose una DL50 de 3800 mg/Kg de peso.

En conclusión este estudio confirma el efecto antiinflamatorio atribuido a la planta *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) y también valida su uso en la medicina popular y respecto a la toxicidad aguda la especie vegetal es ligeramente tóxica.

Palabras clave:

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

Efecto antiinflamatorio

Toxicidad aguda

Aceite de crotón (TPA)

ABSTRACT

The plant species *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) is used in folk medicine for its anti-inflammatory, dental anesthetic, antispasmodic, also used to treat diabetes and liver disease.

The research objectives were to evaluate the anti-inflammatory oral and topical plus oral acute toxicity of ethanol extract of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Botoncillo) in albino mice.

The aerial parts of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) were extracted by maceration in ethanol 70%. The anti-inflammatory effect of the ethanol extract was evaluated using the model of ear edema induced by TPA (13 - acetate 12 - tetradecanoylphorbol). The determination of acute toxicity was performed orally, under the method of Lorke.

To determine the oral anti-inflammatory effect, we evaluated increasing doses of ethanol extract 300 mg/Kg, 600 mg/Kg, 900 mg/Kg, 1200 mg/Kg and the topical 0.5mg/ear, 2.5 mg/ear and 5 mg/ear, which were evaluated in the inflammatory model. The results showed that doses of extract administered orally and topically reduced the swelling of the treated ears of albino mice with an inhibition rate of 35.21%, 48.09% for doses of 900 mg/kg and 1200 mg/Kg respectively, administered orally and topically took the percentages of inhibition of 38.28% and 70.71% for doses of 2.5 mg/ear and 5 mg/ear respectively, compared to the standard drug indomethacin 5mg/ear single dose of extract topically applied exceeded the percentage inhibition of inflammation. The extract had a dose-dependent response to inflammation induced by TPA.

The determination of acute toxicity was conducted in two phases orally in albino mice according to the method of Lorke, obtaining an LD50 of 3800 mg / kg.

In conclusion, this study confirms the anti-inflammatory effect attributed to the plant *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Botoncillo) and validates its use in folk medicine and the acute toxicity on the plant species is slightly toxic.

Keywords:

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

Anti-inflammatory

Acute toxicity

Croton oil

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales con fines terapéuticos se remonta hasta la aparición del hombre. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales fueron el principal e incluso único recurso de que disponían los hombres para curarse. Esta necesidad hizo que se profundizara los conocimientos de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales.

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es librar al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias de la misma. Si no existiera el proceso de inflamación, las infecciones se propagarían de forma incontrolada, las heridas no se curarían nunca y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente. No obstante, los procesos de inflamación y reparación pueden ser perjudiciales. La reparación mediante fibrosis puede dar lugar a la aparición de cicatrices con desfiguración, y también a bandas de fibrosis que producen obstrucción intestinal o limitación de la movilidad articular. Ésta es la razón de que en las farmacias abunden los medicamentos antiinflamatorios, cuyo efecto ideal es potenciar los efectos saludables de la inflamación controlando al mismo tiempo sus secuelas nocivas (52).

El Perú posee recursos naturales con actividad terapéutica, los cuales existen en los reportes etnobotánicas de plantas medicinales usados en procesos inflamatorios; este es el caso de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) conocida como botoncillo planta nativa de los trópicos de Brasil y Perú, el cual en la medicina tradicional es utilizada en afecciones hepáticas, como anestésico dental, para tratar diabetes, como antiinflamatorio, hipoglicemiante, en casos de gripe, tuberculosis, dolor de la faringe entre otros usos. Su empleo es en diversas formas ya sea en extracto, infusiones, jarabe, emplasto, etc. (1) (39) (50) (59)

En el presente estudio se evalúa el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) de los tallos, hojas y flores y se realizó la prueba de toxicidad aguda; por lo tanto tiene el objeto de validar científicamente el uso terapéutico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

(Botoncillo) sobre la inflamación y así formar parte, como alternativa para el tratamiento de la inflamación aguda.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Medicina Alternativa constituye una valiosa contribución en la solución de problemas en la Salud Pública, los cuales son tan críticos como la falta de medicamentos, además de los altos precios de estos, en el mercado nacional e internacional que los hace inalcanzables para aquellas personas de menores recursos económicos, así como la gran diversidad de manifestaciones adversas y el incremento de interacciones medicamentosas (8).

En los últimos años las plantas medicinales han tomado un notable auge, lo que ha representado un resurgimiento en la medicina natural y tradicional, esto se debe en gran parte a la necesidad de buscar nuevos medicamentos que posean el efecto terapéutico deseado. (16)

La inflamación es una respuesta inespecífica que ocasiona efectos sistémicos en la fase aguda como fiebre, disminución de apetito, hipotensión y otras alteraciones hemodinámicas los cuales indisponen al ser humano para el desarrollo normal de sus actividades y cuando la inflamación no es tratada a tiempo pasa a ser crónica dando lugar a diversas patologías como la artritis reumatoide, la aterosclerosis, la tuberculosis y las neumopatías crónicas que se caracterizan por signos de inflamación activa, de destrucción tisular entre otras. (26)

El proceso inflamatorio es una respuesta del organismo ante un estímulo. La misma tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica cambios vasculares, eventos celulares, y la producción de mediadores químicos de la inflamación (13).

En el tratamiento del proceso inflamatorio, no solo tiene importancia conseguir una buena analgesia, sino poder controlar otros aspectos derivados de este proceso, como por ejemplo, la formación de edema, la extravasación plasmática y la migración leucocitaria que caracterizan la zona inflamada. (52)

La especie vegetal *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) es una planta y que en el departamento del Cusco se la encuentra en los valles de La Convención y aledaños utilizada tradicionalmente por sus propiedades curativas en inflamaciones de la piel, como anestésico dental aplicando directamente los capítulos florales en el diente adolorido.

Con la finalidad de estudiar el efecto antiinflamatorio de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) que se emplea en inflamaciones tradicionalmente reportadas en la medicina folklórica del Perú, es que se propone demostrar la actividad en ratones albinos con el fin de contribuir no solo al conocimiento científico de nuestros recursos, sino de revalorar una planta medicinal utilizada popularmente.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentará el extracto seco etanólico al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) efecto antiinflamatorio y toxicidad aguda en ratones albinos?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antiinflamatorio vía oral y vía tópica del extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) sobre el edema auricular inducido por aceite de crotón y su posible toxicidad aguda vía oral en ratones albinos.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto seco etanólico al 70% a partir de las parte aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) y realizar las pruebas preliminares (porcentaje de humedad, porcentaje de rendimiento, solubilidad y estudio fitoquímico).
2. Evaluar la toxicidad aguda del extracto seco etanólico al 70% a partir de las partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) por el método de Lorke, para encontrar la dosis a emplear en el efecto antiinflamatorio.
3. Determinar la dosis letal media (DL50) del extracto seco etanólico al 70% a partir de las partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo).
4. Realizar la evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto seco etanólico al 70% a partir de las partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo); por vía oral y vía tópica; en el edema auricular inducida por aceite de croton en ratones albinos; en base a los datos obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda.
5. Valorar el edema por diferencia de pesos de las secciones circulares de las orejas (tratadas y no tratadas).
6. Calcular el porcentaje de inhibición de inflamación (edema) producido en la oreja de los ratones albinos administrados con el extracto vía oral.
7. Calcular el porcentaje de inhibición de inflamación (edema) producido en la oreja de los ratones albinos administrados con el extracto vía tópica.
8. Comparar los efectos antiinflamatorios administrados por vía oral y vía tópica del extracto seco etanólico al 70% a partir de las partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo).

1.4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la fitoterapia proporciona tratamientos alternativos para muchas patologías, lo que incrementa la calidad de vida de las personas, las cuales pueden dar soluciones a sus problemas de salud minimizando costos, ya que se trata de una alternativa que está al alcance de la mayoría de la población y son mejor tolerados y aceptados que los tratamientos convencionales.

Las plantas medicinales están constituyendo un recurso terapéutico válido por consiguiente, este trabajo, brindará las bases científicas que otorgarán la solidez sobre los conocimientos etnobotánicos de esta planta en estudio.

En nuestro medio, surge el botoncillo, como un recurso vegetal utilizado en diversas formas y del cual aún no se han realizado investigaciones referentes a los planteados, por lo que el presente estudio constituye un aporte en el conocimiento de la planta en la búsqueda de nuevos recursos con actividad antiinflamatoria.

1.5. HIPÓTESIS

El extracto seco etanólico al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) presenta efecto antiinflamatorio y es poco tóxica en ratones albinos.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. ANTECEDENTES SOBRE METODOLOGÍA

➤ **Yueqin Zeng. Tesis Doctoral. Identificación y Actividad Farmacológica de Principios de Especies Antiinflamatorias. Universidad de Valencia. España.2007.** El estudio comprendió una selección de especies utilizadas en medicina popular como antiinflamatoria, cicatrizante. Se utilizaron las especies *Schinus molle*, *Lysimachia foenum-graecum*, *Lithospermum erythrorhizon*, *Forsythia suspensa* y *Isodon xerophilus*; el fraccionamiento de los extractos activos para obtener los potenciales principios para su posterior estudio farmacológico la identificación de los compuestos aislados, fue por medios espectroscópicos. Como métodos experimentales *in vivo* fueron seleccionados los clásicos modelos de inflamación aguda y crónica en oreja de ratón inducida por el 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) y los modelos de edema agudo en pata de ratón inducido por carragenina y fosfolipasa A2 (PLA2), por lo que en algunos casos se han utilizado técnicas *in vitro* con el fin de establecer en algunos casos el nivel de actuación y cuantificar los efectos farmacológicos. En conclusión: La especie *Schinus molle* posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. De la fracción activa se aislaron dos triterpenos tetracíclicos, los ácidos 3-*epi*-isomasticadienolálico e isomasticadienonálico, una biflavanona, chamejasmina, siendo activos los tres principios en diferentes protocolos experimentales. Se demostró por vez primera la actividad antiinflamatoria de un triterpeno con estructura tipo eufano. El compuesto identificado como ácido isomasticadienonálico o ácido (13a, 14b, 17a, 20R, 24Z)-3,21- dioxolanostan- 8,24-dien-26-oico. Se aislaron cinco nuevos saponósidos a partir de la especie *Lysimachia foenum-graecum*, de los cuales, el compuesto identificado como 3-O-{ α -L-ramnopiranosil-b-D-glucopiranosil(1-[β -D-glucopiranosil]- α -L-arabinopiranosil) 21,22-O-diangeloil barringtogenol C 28-O-glucopiranosido, denominado foenumósido E, inhibió la producción de

LTB4 en leucocitos peritoneales de rata y 12- HETE(Ácido hidroxieicosatetraenoico) en plaquetas humanas, afectando solo ligeramente la actividad ciclooxigenasa. La fracción diclorometánica de *Lithospermum erythrorhizon* reduce el edema auricular inducido por TPA en oreja de ratón y el edema inducido por carragenina en pata de ratón. Los principios responsables de la actividad antiinflamatoria han sido identificados como los principios naftoquinónicos shikonina y sus derivados.

➤ **Franco Luis A., Matiz Germán E., Calle Jairo, Pinzón Roberto; Ospina Luis F. Artículo .Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L.Colombia.2007.** En este artículo evalúan la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones en un modelo de inflamación aguda en ratón, procurando identificar las fracciones responsables de dicha actividad. Los cálices de *Physalis peruviana* L. fueron extraídos por percolación con solventes orgánicos .La fracción primaria hidroalcohólica se purificó mediante cromatografía en columna. La actividad antiinflamatoria de los extractos y fracciones se evaluó utilizando el modelo de edema auricular inducido por 3 -acetato de 12 -tetradecanoilforbol. En cuanto a los resultados se obtuvieron 38 fracciones de las cuales la fracción hidroalcohólica mostró actividad significativa ($p < 0.05$) presentando respuesta dosis dependiente con significativa inhibición del edema en dosis superiores a 250µg/oreja. A las conclusiones que llegaron fueron que el estudio realizado confirma la actividad antiinflamatoria atribuida a los cálices de *Physalis peruviana* L. que valida su uso en la medicina popular; además que se identificaron las principales fracciones responsables de la actividad antiinflamatoria.

➤ **Núñez Figueredo Yanier, Montero Alarcón Claudia, Agüero Fernández Sara, Muñoz Cernuda Adriana. Efecto Antiinflamatorio Preclínico del Polvo Seco de *Caléndula officinalis*. La Habana, Cuba 2007.** Se evaluó la actividad antiinflamatoria del polvo seco *Caléndula*

officinalis secado por atomización se emplearon dosis de 50, 150 y 450 mg/Kg y se evaluó el efecto sobre la inflamación aguda provocada por carragenina, dextrán, histamina y serotonina y granuloma inducido por discos de algodón en ratas y edema auricular inducido por aceite de croton en ratones. El polvo seco mostró efecto inhibitorio sobre los diferentes modelos empleados sin afectar el peso del timo y las glándulas suprarrenales. Estos resultados muestran que el método de secado por atomización permite la obtención de una materia prima de *Caléndula officinalis* activa frente a procesos inflamatorios de naturaleza diversa.

➤ **Manzano Santana Patricia, Miranda Migdalia, Gutiérrez Yamilet, García Gastón, Orellana Tulio, Orellana Andrea. Artículo. Efecto antiinflamatorio y composición química del aceite de ramas de *Bursera graveolens* Triana & Planch (palo santo). Ecuador.2009.** En este artículo se evalúan el efecto antiinflamatorio de la especie *Bursera graveolens* Triana & Planch, comúnmente llamada palo santo, es una planta nativa de las costas ecuatorianas y peruanas. Los objetivos fueron contribuir al estudio fitoquímico y farmacológico de la especie *B. graveolens*, nativa de San José de Ancón, provincia de Santa Elena, Ecuador. Se empleó el extracto hidroalcohólico 50 % de ramas secas. Se realizó un estudio fitoquímico a través del sistema acoplado de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas y se determinó el efecto antiinflamatorio en el modelo de edema de la oreja inducido por aceite de Croton en ratones albinos de la línea OF1. En cuanto a los resultados del tamizaje fitoquímico mostró presencia de aceites esenciales, triterpenos-esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antocianidinas, saponinas y compuestos reductores. Se determinó las estructuras de 11 componentes del aceite esencial extraído de las ramas y el sesquiterpeno denominado viridiflorol resultando el componente mayoritario con 70,82 %, este compuesto se informa por primera vez en esta especie. El extracto hidroalcohólico (25 ml a cada lado de las orejas tratadas) inhibió significativamente la inflamación comparado

con la bencidamina. A las conclusiones a las que se llegaron fue que los extractos hidroalcohólicos mostraron un efecto antiinflamatorio en las condiciones experimentales del estudio y se determinó la composición química del aceite de ramas de *B. graveolens* de Ecuador.

2.1.2. ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS

2.1.3.1. DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.

➤ **Delgado Sumar Hugo E., (1990).** En el Inventario de Recursos Curativos en Centros de Expendio Formales e Informales de Tumbes, denominado apuntes de Medicina Tradicional, utilizando el método de recojo de información por entrevistas en profundidad y la verificación de muestras de los recursos curativos por el Herbario Institucional en la que menciona los usos tradicionales de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen con nombre común Botoncillo para tratar la diabetes dolor de la faringe, dolor de muelas e Inflamación del hígado.

➤ **Voto Bernales Jorge (1994).** En una edición denominada Etnobotánica de la Amazonia Peruana. Indica que en Perú se conoce con el nombre de "desflemadera" a una especie de *Spilanthes* cuya raíz al ser masticada produce mucha salivación, empleándose habitualmente en la curación del escorbuto; el té de las hojas de *Spilanthes oleracea* o jambú se aconseja en los malestares estomacales y el jarabe de las hojas en la gripe y la tuberculosis; igualmente se le asigna valor en el asma.

➤ **Agapito F. Teodoro; Sung Isabel De Agapito (2004).** En el libro intitulado Fitomedicina reporta a *Acmella oleracea* (L.) Jansen o también denominada *Spilanthes oleracea* L. con propiedades medicinales analgésicas y antiinflamatorias, además de ser útil para tratar afecciones hepáticas, diabetes e infecciones.

2.1.3.2. DEL GÉNERO ACMELLA

- **Didier Lacaze, Miguel Alexiades (1995).**En el libro Salud para todos en la que se menciona las Plantas Medicinales y Salud Indígena en la Cuenca del Rio Madre de Dios; refieren a la especie *Acmella ciliata* (Botoncillo) útil para fortalecer los dientes y evitar la caries, también para calmar el dolor de muelas; así como para los cólicos del hígado, granos y comezón, quemaduras y picaduras de insectos.

- **Agapito F. Teodoro; Sung Isabel De Agapito (2004).**En el libro publicado denominado Fitomedicina en la que reportan las propiedades medicinales de 1100 plantas indica que *Acmella oppositifolia* (Lam.) Jansen, posee propiedades medicinales para tratar las manchas de la piel para la cual se utilizando la decocción de la planta entera y se bebe un vaso por diez días; para el dolor de muelas se hace buches con la infusión de las flores, también posee propiedades como antiespasmódico, para tratar la diabetes y antiinfeccioso. Las hojas son comestibles, es bueno para tratar las enfermedades del hígado, con las flores se fabrica licor odontálgico.

- **Quijandria Acosta Gabriel, Dueñas Corrido Gloria (2005).**En el Proyecto "Estudio Etnobotánico en las Cuencas Altas de los Ríos Tambopata e Inambari". Indican a la especie *Acmella ciliata* (Botón de oro), utilizada en los dolores de muela, inflamaciones y en el tratamiento de la Uta (Leishmaniasis).Algunos pobladores colocan directamente las flores en el diente adolorido, también preparan un macerado en alcohol que lo colocan en los dientes afectados con ayuda de un algodón.

2.1.4. ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS

2.1.4.1. DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

➤ **Santos Mendes Cavalcanti Vanessa.** En un estudio realizado denominado extracción de spilanthol de *Spilanthus Acmella oleracea* var. con dióxido de carbono supercrítico. El objetivo de esta tesis fue evaluar la factibilidad técnica y viabilidad financiera para la extracción de spilanthol *Spilanthus Acmella oleracea* var. como solvente utilizando dióxido de carbono supercrítico a temperaturas entre 40° y 60° y las presiones entre 76 y 352 bar. Se encontró un buen equilibrio entre la recuperación de spilanthol (en volumen de 70 a 80%). Se obtuvieron spilanthol contenidos en los extractos (13 a 30%) y el aspecto de la extracción (de color que fueron del amarillo pálido al amarillo) se obtuvieron densidades de solvente supercrítico (400 a 700 kg/m³). La RMN y análisis cromatográfico indicaron el predominio de spilanthol y alto peso molecular en los extractos. La pre-factibilidad del estudio llevado a cabo mediante el cálculo del costo de fabricación del extracto y los indicadores económicos, tales como la tasa interna de retorno, el tiempo de retorno y el valor presente neto, indicó que el precio de mercado del extracto de berro puede absorber los costos de la extracción de fluidos supercríticos con la rentabilidad, seguridad y liquidez.

2.1.4.2. DEL GÉNERO *Acmella*

➤ **Sarnaglia Vulpi Thaila, Moret Moráis Camila Pio, Félix Trindade Ana Paula, de Holanda Pereira Lima Maria Cristina, Salazar Marques Velozo Leosvaldo e C. Kaplan Maria Auxiliadora. (2007).** En el Análisis del Aceite Esencial de los Diferentes Órganos de *Acmella ciliata* Kunth (Asteraceae). Revista Brasileña de Biociencias. La extracción del aceite esencial se hizo por hidrodestilación. El aceite esencial fue analizado por cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectroscopia de masas. Del aceite esencial de los tallos se

identificaron: hidrocarbonetos, monoterpenos, sesquiterpenos y arilpropanoides. Los componentes mayoritarios fueron: 3-trideceno (45,89%), isoeugenol (14,85%) e germacreno D (11,69%) Para las hojas los componentes mayoritarios se encontraron germacreno-D (37,51%), β -farneseno (36,04%) e 3-trideceno (2,97%). La fracción volátil obtenida de las influorescencias de *A. ciliata* fueron identificadas: 3-7- dimetil-1, 3,6-octatrieno (15,38%), espilantol (15,16%) e β -farneseno (15,02%).

➤ **Keipert Ronald Und Matthias F. Melzig. (2009).** En un estudio Fitoquímico y Enzimático de Preformulados farmacéuticos, sobre *Acmella ciliata* (HBK) Cass. realizado en Alemania. En las investigaciones fitoquímicas se hallaron un par de alquilamidas (isobutilo, metilbutil y phenylethylamides de dobles y triples-mono-insaturados y ácidos dicarboxílicos con nueve a trece carbonos. Una serie de sustancias fenólicas (fenoles simples y fenolcarboxílicos ácidos y ésteres, flavonoides, un hydroxycumarine y lignane) detectado por medio de métodos cromatográficos (CC, TLC, HPLC, (HP), LC-MS) y espectroscópicos (UV, RMN, EM, (HP), LC-MS

2.1.5. ANTECEDENTES FARMACOLÓGICOS

2.1.5.1. DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

➤ **Moreira, VMT S, Mala, JG S, Souza, JM de Zuner Assis, Cavalheiro, Esper Abrao.(1989).** Realizaron la Caracterización de las convulsiones provocadas por un extracto hexánico de *Spilanthes Acmella var. oleracea* en ratas. Se realizó la caracterización de las convulsiones inducidas por un extracto hexánico *Spilanthes Acmella var. oleracea* en ratas Wistar macho, el extracto fue administrado por vía intraperitoneal con 50 a 150 mg/Kg y mediante el EEG fueron observados por un período de 2 horas .Después de la dosis mas

bajas(50 y 75 mg/Kg) se observó pequeños cambios de comportamiento tales como el aseo .Con las dosis mas altas (100 a 150 mg/Kg) se observaron convulsiones tónico-clónicas de forma dosis-dependiente, que fueron acompañados por las típicas crisis electroencefalograficas en el EEG.Llegando a la conclusión que extracto hexánico de *Spilanthes Acmella var. oleracea* es capaz de inducir convulsiones generalizadas en ratas y puede ser utilizado como una herramienta en el desarrollo de nuevos modelos de epilepsia.

2.1.5.2. DEL GÉNERO *Acmella*

➤ **Ospina de Nigrinis Luz Stella, Olarte Jorge, Nuñez Olarte Enrique. (1987).**En el estudio fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las Flores de *Acmella americana* (Mutis) Hieron , se aisló N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans amida con el cual iniciaron la evaluación de la acción anestésica local por los métodos de anestesia de superficie, de infiltración y de conducción.También se evaluó la acción cicatrizante, microscópica y macroscópicamente. Comprobándose la acción anestésica local de la N-isobutil-deca-5-ino-8-eno-trans amida, en condiciones experimentales resultó ser más eficaz cuando es utilizado como anestésico de infiltración, siendo tan eficaz como el clorhidrato de lidocaína a las mismas condiciones porcentuales; asimismo facilitó significativamente el proceso de cicatrización, sin causar edema.

➤ **Hocsman M. E. Maggi, S. M. Palacios,C. G. Ferrayoli, L. Petryma, C. Núñez y J. J. Cantero. (2000).** Se realizó un estudio sobre la determinación de metabolitos secundarios de *Acmella decumbes* con actividad antialimentaria en insectos. Dpto. Biología Agrícola, Facultad de Agronomía y Veterinaria. UNRC. Córdoba Argentina.Los ensayos antialimentarios se realizaron en los insectos *Epilachna paenulata* y *Spodoptera eridania* utilizando técnicas de elección. Se efectuaron extractos hexánicos y metanólicos a partir de distintos órganos de la

planta. El extracto hexánico de raíz alcanzó un índice antialimentario porcentual (IA) de 100% a 400 mg/cm². Se realizó un aislamiento bioguiado con el objeto de encontrar los compuestos responsables de dicha actividad. Mediante técnicas cromatográficas se obtuvieron diversas fracciones que fueron analizadas por CCD y HPLC. Se purificaron diversos compuestos, los que fueron dilucidados por técnicas espectroscópicas. El que arrojó mayor IA (86% a 10 mg/cm²) resultó ser N-isobutil-(2E, 6Z, 8E)-decatrienamida, conocido como Spilanthol.

➤ **Neto Xavier, G.S; Braga, F.C.O; Silva, R.M.G., (2003).** Evaluaron el potencial anestésico del extracto de *Acmella ciliata*, Asteraceae en ratones albinos. Centro Universitario de Patos de Minas. Brasil. El objetivo fue investigar el potencial anestésico del extracto bruto de *Acmella ciliata* en ratones albinos hembras en la que se emplearon tres grupos experimentales tratados con extracto bruto de *A. ciliata* por vía subcutánea en diferentes concentraciones (GAc5=1.25; GAc10=2.5 y GAc 20=5mg/ml) en volumen constante para cada animal de 0.4ml/animal, dos grupos controles positivos que recibieron lidocaína al 2% con y sin vasoconstrictor, respectivamente y un grupo control negativo que recibió solamente solución de tween 80 al 2% como fue diluido el extracto. Los resultados demostraron que el extracto de *A.ciliata* presenta una acción anestésica eficaz como los presentados con lidocaína con y sin vasoconstrictor.

➤ **Toso, R.E; Toribio, M.S.; Mengelle, P.; Boeris, M.A. (2007).** Plantas de la provincia de La Pampa, Argentina, con actividad gastroprotectora y antiespasmódica Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. En este trabajo se evaluaron el efecto gastroprotector y el grado de actividad inhibitoria de la motilidad gastrointestinal de extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de partes aéreas de *Marrubium vulgare*, *Acmella decumbens*, *Lippia turbinata*, *Tribulus terrestres* y *Ruta chalepensis*. Se administraron per

os grupos de 5 animales cada uno con extractos de *Marrubium vulgare* (MV), *Acmella decumbens* (AD), *Lippia turbinata* (LT), *Tribulus terrestres* (TT) y *Ruta chalepensis* (RC) inmediatamente antes de comenzar el ensayo. El grupo control fue administrado *per os* con 0,5 ml de Ex. Otros dos grupos usados como testigos fueron administrados intraperitonealmente con 1 mg/ Kg de atropina y con 50 mg/Kg de ranitidina respectivamente 30 minutos antes de someter los animales a estrés y con una dosis de 0,5ml del Ex *per os*. Finalizado el ensayo, los ratones fueron sacrificados por sobredosis de éter y los estómagos fueron retirados, insuflados con agua destilada y fijados con formol. Se abrieron por la curvatura mayor y fueron fotografiados para medir con ayuda de un analizador de imágenes la superficie dañada de cada estómago. Utilizando como área de úlcera (AU) el total de la superficie dañada expresada en mm², se calculó el porcentaje de inhibición producido por los extractos en los distintos grupos tratados con relación al Grupo control utilizando la fórmula [(AUGrupo control - AUGrupo tratado / AUGrupo control) x 100)]. Las diferencias entre las áreas ulceradas de los estómagos pertenecientes a los animales de los grupos testigos administrados con las drogas de referencia y las de los grupos tratados con los extractos fueron comparadas con respecto a las del grupo control utilizando el Test "t" de Student. Llegando a las conclusiones que los extractos hidroalcohólicos de *Marrubium vulgare*, *Acmella decumbens*, *Lippia turbinata*, *Tribulus terrestres* y *Ruta chalepensis* previenen las úlceras gástricas producidas por estrés en ratones y retrasan el tránsito gastrointestinal evidenciando un efecto inhibitorio sobre la motilidad.

➤ **Ríos-Chávez P., Cortez-Espinosa N, Ramírez-Chávez E. y Molina-Torres.** (2006). Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Síntesis de las Alcamidas a lo largo del desarrollo de *Acmella radicans*. Entre las alcamidas varias isobutilamidas olefínicas demostraron tener mayor actividad insecticida que las piretrinas, también presentan actividades contra bacterias,

hongos y anti-inflamatoria. *Acmella radicans*, contiene alcanidas en las raíces, tejido verde, así como en las cabezuelas florales. Las rutas de los metabolitos secundarios son activadas durante etapas particulares de crecimiento y desarrolladas por factores ambientales o durante periodos de estrés. El trabajo consintió en establecer el patrón de síntesis de las alcanidas desde la germinación de la planta *Acmella radicans* hasta la floración y ver si existen una etapa del desarrollo donde se incrementa los niveles de las alcanidas. Lo que permitió entender el posible papel de las alcanidas como promotoras del crecimiento. La cuantificación se hizo por CG/MS. La síntesis de *N*-isobutil-2*E*, 6*Z*, 8*E*-decatrienamida (afinina) se inició desde el momento de la germinación. La *N*-(2-metilbutil)-2*E*, 6*Z*, 8*E*-decatrienamida, inicia hasta la tercer semana de germinación. Y la *N*-(2-feniletil)-2*E*, 4*Z*-octadienamida, la *N*-(2-feniletil)-nona-2*E*-ene-6,8-diinamida, la *N*-(2-metilbutil)-2*E*, 4*Z*, 8*EZ*, 10*E*-dodecatrienamida y la 3-fenil-*N*-(2-feniletil)-2-propenamida, su síntesis se dan en la quinta semana. Se encontró una alcanida que se presentó desde el momento de la germinación y que cuando la planta pasa de 3 a 4 meses los niveles de ciertas alcanidas disminuyen para incrementarse otras. Con relación a las cabezuelas florales se encontró que la alcanida mayoritaria es la 3-fenil-*N*-(2-feniletil)-2-propenamida, seguida por la *N*-isobutil-2*E*, 6*Z*, 8*E*-decatrienamida (afinina) y la *N*-(2-feniletil)-2*E*, 4*Z*-octadienamida esta última en menor concentración.

2.2. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

2.2.1. Aspectos Botánicos de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

2.2.1.1. Sinonimia del nombre científico: *Sphilantes oleracea* (L.) R.K. Jansen.(1)

2.2.1.2. Nombres comunes: Botoncillo, botón de oro, coribiqui, jambu, yuyo quemado, desflemadera.(1) (39)(59)

2.2.1. Identificación Botánica

La posición taxonómica, de la especie en estudio fue realizado de acuerdo al sistema de clasificación Arthur Cronquist (1981) por el Herbario Cuz de la UNSAAC.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Acmella*

Especie: *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

Fotografía N°1

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)



Fuente: M.N.G. Quillabamba – Cusco. 2010.

2.2.2. Ecología de la especie

Esta especie es nativa de Perú y Brasil (36). Se distribuye en los trópicos y subtrópicos cultivada y naturalizada en muchos lugares.

2.2.3. Descripción Botánica

Es una planta herbácea de tallos rastreros y ramosos, las flores en cabezuelas, inicialmente amarillentas y después se vuelven parduscas. El fruto en aquenios largos y ciliados, su sabor es agrio y produce salivación cuando se le mastica (1).

2.2.4. Usos

Se sabe que los indios del Amazonas emplean al botoncillo o también denominado Jambú la utilizan como parte de su dieta, así también para curar enfermedades y como un agente anestésico. La planta ha tenido un amplio uso en farmacéutica ya que es utilizada en la preparación de pasta de dientes, goma de mascar; además de muchos otros usos. (38)

Las hojas de la especie en estudio se comen crudas en ensaladas de forma muy parecida a los berros o hervidas. (1) (55)

Para el dolor faríngeo se mastica las inflorescencias de igual manera par el dolor de muelas.

Para tratar el hígado, diabetes e infecciones se utiliza la planta en decocción. (1)

En caso del bocio se hace una infusión de 20 g de inflorescencias en 1 litro de agua hirviendo y se debe beber 5 tacitas al día. (1)

La maceración de 25 g de brotes en 100 gramos de alcohol (70°) durante 8 días. Se usa diluido en agua para hacer gárgaras en caso de gingivitis. Se prepara en 1 litro de agua hirviendo 50 g de las inflorescencias y se hacen gárgaras para el dolor de dientes. (1)

Cuadro 2.1. Modo de Utilización de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen

Parte de la planta	Forma de utilización	Utilización
Tallos	Extracto	Analgésico, anti-inflamatorio, anti-infeccioso. Para problemas de estómago, hígado, constipación intestinal y cálculo de vejiga.
	Infusión	Analgésico, antiinflamatorio antiinfeccioso; para el hígado. Acción antiescorbútica, combate anemia, dispepsia, afecciones de la boca y garganta.
Hojas	Extracto	Analgésico, anti-inflamatorio, anti-infeccioso; para el hígado. Para problemas del estómago, tos, constipación intestinal y cálculo de vejiga.
Flores	Infusión	Analgésico, anti-inflamatorio, anti-infeccioso; sialagogo; estimulante estomático; anti-escorbútico; usada para problemas de hígado, para combatir anemia, dispepsia, infecciones de la boca e garganta. Para problemas del estómago,
Planta entera	Infusión	Anti-inflamatorio, anti-infeccioso; para el hígado.

Fuente: REVILLA, J. Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. Manaus. 2001. Apontamentos para a cosmética amazônica. Manaus. 2002. Brasil. DE ARAUJO MARGARIDA MARIA. Estudo Etnobotânico das plantas utilizadas como Medicinais no Assentamento Santo Antonio, Cajazeiras. Brazil.2009 *Acmella oleracea* .Artículo. 2009

2.2.5. Forma de Cultivo. El botoncillo requiere de climas cálidos, así como suelos bien drenados con humedad y a media sombra. Se multiplica por semillas y por división. (54)

2.2.6. Hábitat : Costa y Amazonia , hasta los 500 m.s.n.m.(1)

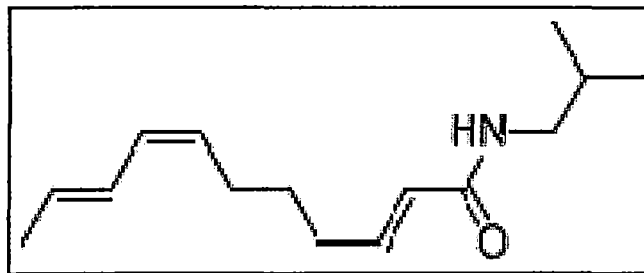
2.2.7. Composición química

Han sido reportados en varias especies de *Spilanthes* la presencia de amidas acetilénicas, lactonas sesquiterpénicas, ésteres amirínicos, esteroides y flavonoides .La especie *Spilanthes oleracea* contiene una materia picante, aceite, spilanthina, spilanthol, fitosterina, cholina. Al

masticar las hojas y los tallos se nota rápidamente la presencia de una sustancia picante, acre, muy fuerte; igualmente se pueden observar estos efectos al saborear el agua que queda después de cocer la hierba; este sabor es producido por el spilantol, que es una amida del ácido no saturado. Es un principio químico muy apreciado para la elaboración de pastas dentales.

En un análisis de las partes aéreas de la planta se identificó la presencia de apigenina-7-glucósido, apigenina-7-neohesperidósido, quercitina-3-glucósido, y rutina. (1) (59)

Figura 2.1. Estructura química Spilantol



Fuente: Voto Bernales Jorge. Etnobotánica de la Amazonia peruana. Perú. 1994

2.3. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA ASTERACEAE

La familia Asteraceae son plantas herbáceas anuales o perennes, más raramente arbustos o árboles. Se caracterizan por presentar las flores agrupadas en capítulos, inflorescencia que funcionalmente se comporta como una flor.

Hojas sin estípulas, generalmente alternas, en ocasiones en roseta basal; pueden presentar espinas.

La **inflorescencia** es un capítulo, que consiste en una estructura ensanchada (receptáculo) donde se sitúan desde una a cientos de flores, rodeadas por las brácteas del involucre. El receptáculo puede ser plano, cóncavo o convexo y tener escamas o pelos entre las flores.

Flores hermafroditas, unisexuales o estériles. Sin cáliz o con éste reemplazado por vilano de pelos o escamas; los pelos pueden ser lisos, escábridos o plumosos. Corola formada por 5 pétalos soldados; puede ser tubulosa, con forma de tubo (flósculos o flores flosculosas) o de lengüeta con 3 o 5 dientes (lígulas o flores liguladas).

En un mismo capítulo todas las flores pueden ser flosculosas (*Cirsium*), todas liguladas (*Taraxacum*) o una combinación de flosculosas y liguladas (*Anthemis*). Androceo formado por 5 estambres epipétalos soldados por sus anteras (singénésicos). Son plantas entomógamas. El gineceo es ínfero y unilocular.

Fruto tipo aquenio o cipsela. Pueden almacenar inulina, un polisacárido, como sustancia de reserva en órganos subterráneos. (2)

Distribución: cosmopolita; diversidad: es la familia más numerosa de las plantas con flores, con unos 1100 géneros y 20.000 especies. (33)

Usos: se pueden emplear como oleaginosas (girasol: *Helianthus annuus*; cártamo: *Carthamus tinctorius*), hortícolas (lechuga: *Lactuca sativa*; endivia: *Cichorium intybus*), insecticidas (pelitre: *Chrysanthemum cinerariifolium*), ornamentales (calendula: *Caléndula arvensis*; dalias: *Dahlia*; *Chrysanthemum* sp.pl), condimentarias (estragón: *Artemisia dracunculus*), aromáticas (abrotano: *Artemisia abrotanum*), para la elaboración de licores (absenta: *A. absinthium*) y medicinales (manzanilla: *Chamaemelum nobile*; árnica: *Arnica montana*; *Spilanthes oleracea* contra las afecciones gingivales y odontálgicas; *Ambrosia peruviana* para el reumatismo y neuralgias).(2)

2.4. INFLAMACIÓN

2.4.1. Concepto

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es librar, al organismo de la causa inicial de la lesión celular y de las consecuencias de la misma. (24)

Las manifestaciones clínicas (cuadro 2.2) de la reacción inflamatoria se caracterizan por dolor, calor, enrojecimiento, edema fiebre y finalmente la pérdida de la función. (10)

Lo que caracteriza al proceso inflamatorio en los seres vivos superiores es la reacción de los vasos sanguíneos, que da lugar a la acumulación de fluido y leucocitos en los tejidos extravasculares. Además que la inflamación es útil para destruir, diluir y localizar al agente patógeno y, al mismo tiempo, inicia una cadena de acontecimientos que, dentro de lo posible curan y reconstruyen el tejido lesionado. (24)

La respuesta vascular y celular de las formas aguda y crónica de la inflamación están mediados por factores químicos procedentes del plasma o de las células y que son activadas por el propio estímulo inflamatorio.(24)

El proceso de reparación después de la reacción inflamatoria incluye primero la supresión de fibrina, células de pus, material extraño, etc., por los macrófagos .Si este proceso se retrasa, se establece una reacción de granulación, de manera que la región lesionada es invadida por tejido conectivo de nuevo crecimiento. Finalmente el proceso reparador logra la resolución (recuperación de la organización anterior del tejido y de sus funciones) o la formación de cicatriz (consolidación de tejido conectivo fibroso). (24)

Cuadro 2.2. Manifestaciones Clínicas de la Reacción Inflamatoria y su posible Mecanismo

SÍNTOMA CLINICO	MECANISMO CAUSANTE
Dolor	La presión del líquido que acompaña al desarrollo de edema, parece ser la principal causa de estimulación subsecuente de impulsos dolorosos desde el sitio de la lesión hacia el SNC
Calor	La vasodilatación fomenta el transporte de sangre hacia la región inflamada. El incremento del metabolismo celular en el sitio lesionado se acompaña del flujo de sangre.
Enrojecimiento	La dilatación vascular favorece el flujo de sangre hacia el sitio inflamado.
Edema	El aumento de la permeabilidad vascular hace que líquidos y proteínas pasen desde el plasma hacia el compartimiento intersticial.
Fiebre	La agresión celular por agentes exógenos y/o endógenos, fomenta la producción de interleukina -1, estímulo para que el sistema termorregulador incremente la producción de calor
Pérdida de la función	En relación con edema, dolor y destrucción celular.

Fuente: Información recopilada de Contreras Santos Freddy O, Blanco García Mario R. Fisiopatología. 1997.

2.4.2. INFLAMACIÓN AGUDA

Es la respuesta inmediata que se produce frente al agente lesivo. La inflamación aguda tiene una evolución relativamente breve (minutos, horas y pocos días). Presenta tres componentes principales:

1. Modificaciones en el calibre de los vasos que dan lugar al aumento en el flujo de sangre.
2. Alteraciones en la estructura de la microvasculatura que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y de los leucocitos.

3. Emigración de los leucocitos desde el punto en el que abandonan la microcirculación hasta el foco de lesión en el que se acumulan.

La salida de líquido, proteínas y células de la sangre hasta el tejido intersticial a las cavidades del organismo se denomina exudación. Un exudado es un líquido extravascular de carácter inflamatorio que presenta una concentración elevada de proteínas, abundantes restos celulares. Lo cual indica que hubo una alteración en la permeabilidad normal de los vasos de pequeño calibre de la zona de lesión.

El transudado es un líquido con bajo contenido de proteínas. Esencialmente un ultrafiltrado del plasma sanguíneo y secundario al desequilibrio hidrostático a través del endotelio vascular, la permeabilidad del endotelio es normal. (10)

El edema es el exceso de líquido en el tejido intersticial o en las cavidades serosas. Este fluido puede ser un exudado o un transudado. El pus o transudado purulento es un exudado de origen inflamatorio rico en leucocitos, la mayor parte neutrófilos y el resto de células parenquimatosas. (24)

a) ALTERACIONES VASCULARES

- **Modificaciones en el calibre de los vasos que dan lugar al aumento en el flujo de sangre.** Se inician de forma muy rápida tras la lesión y evolucionan a un ritmo que depende de la intensidad de la misma.

Después de un período inconstante y transitorio (unos pocos segundos) de vasoconstricción arteriolar, se produce vasodilatación que afecta inicialmente a las arteriolas y que posteriormente da lugar a la apertura de nuevos lechos capilares en la zona de lesión esta es la causa del aumento en el flujo de sangre que a su vez es el motivo del enrojecimiento por lo tanto del incremento del color en la zona de lesión, después sigue el siguiente acontecimiento.

Lentitud o retraso de la circulación; se debe al aumento de la permeabilidad de la microvasculatura con salida de fluido rico en

proteínas hacia los tejidos extravasculares .La disminución de líquido en el compartimiento intravascular da lugar da lugar a la concentración de los hematíes en los vasos de pequeño calibre y al aumento de la viscosidad sanguínea, lo que se refleja en la presencia de pequeños vasos dilatados y repletos de hematíes, es decir, la estasis. (10)

➤ **Aumento de la permeabilidad vascular (filtración vascular).**Característica principal y de mayor especificidad de la inflamación aguda. Este acontecimiento da lugar a la salida de un fluido rico en proteínas (exudado) hacia el intersticio. La pérdida de fluido rico en proteínas del plasma reduce la presión osmótica del fluido intersticial .se conocen cinco mecanismos en la que el endotelio es atravesado.

b) ACONTECIMIENTOS CELULARES

➤ **Extravasación y función de fagocitosis de los leucocitos.** Una de las funciones más importantes de la inflamación es el aporte de leucocitos. Los leucocitos fagocitan los agentes patógenos, destruyendo las bacterias y otros microorganismos, y degradan el tejido necrótico y los antígenos extraños. Por otro lado los leucocitos pueden prolongar e inducir lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y radicales tóxicos del oxígeno.

La secuencia de acontecimientos que se produce desde que los leucocitos salen de la luz vascular hasta que alcanzan el tejido intersticial –y que se denomina extravasación –se puede en los siguientes pasos.

- a) En la luz vascular: marginación, rodamiento y adhesión.
- b) Transmigración a través del endotelio (también denominada diapédesis), y

- c) Emigración en los tejidos intersticiales hacia un estímulo quimiotáctico.

2.4.3. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN

Los mediadores químicos de la inflamación son la causa de los acontecimientos producidos en la inflamación. Hasta el momento se ha identificado varios mediadores. Aunque la mayoría de ellas son útiles para la supervivencia del organismo y también para los investigadores que trabajan en esta área y las compañías farmacéuticas que investigan nuevos fármacos.

- Los mediadores se originan del plasma o de las células. Los del plasma (p.ej., el complemento) están presentes en el plasma en formas precursoras deben ser activadas para adquirir sus propiedades biológicas. Los mediadores derivados de las células permanecen normalmente secuestrados en gránulos intracelulares (p.ej., la histamina en gránulos dentro de las células cebadas) de manera que deben ser secretados o sintetizados de novo (p.ej., las prostaglandinas) en respuesta a un estímulo. Las principales células que secretan o sintetizan mediadores son las plaquetas, neutrófilos monocitos y macrófagos, y células cebadas.
- La mayor parte de las células cebadas realizan su actividad biológica uniéndose inicialmente a receptores específicos situados en las células diana. Algunas de las células cebadas presentan actividad enzimática directa (p.ej., proteasas lisosomales) o producen una lesión de tipo oxidativo (p.ej., los metabolitos del oxígeno).
- Un mediador químico puede estimular la liberación de mediadores por parte de las propias células diana. Llamándose segundos mediadores que pueden ser idénticos o similares a los iniciales, aunque también pueden dar lugar a efectos opuestos a estos. Su acción es la de amplificar –o contrarrestar en ciertas circunstancias – la acción del mediador inicial. (13)

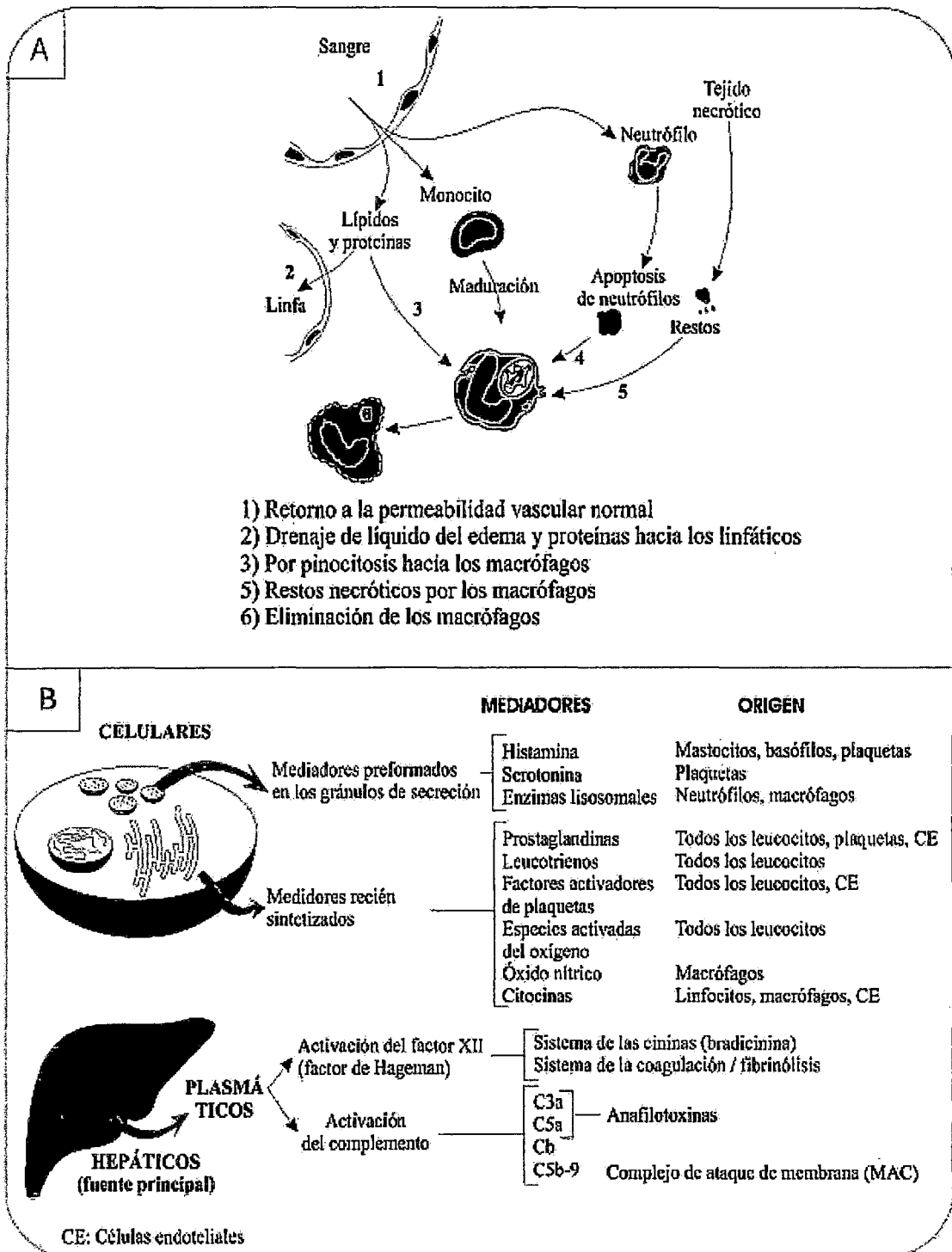
- Un mediador químico puede actuar sobre uno o múltiples tipos de células dianas, la duración de su acción es corta y la mayor parte de ellos pueden producir efectos perjudiciales.(13)

Cuadro 2.3. Mediadores de la Inflamación

MEDIADOR	ORIGEN	ACCION		
		Permeabilidad vascular	Quimiotaxis	Otras
Histamina y serotonina	Células cebadas plaquetas	+	-	
Bradicinina	Sustrato plasmático	+	-	Dolor
C3a	Proteínas plasmáticas, a través del hígado; macrófagos	+	-	Fragmento opsonico (C3b)
C5a		+	+	Adhesión y activación de leucotrienos
Prostaglandinas	Células, de los fosfolipidos de membrana	Potencia a otros mediadores	-	Vasodilatación, dolor, fiebre
Leucotrienos B4	Leucocitos	-	+	Adhesión y activación leucocitarias
Leucotrienos C4,D4,E4	Leucocitos, células cebadas	+	-	Broncoconstricción, vasoconstricción
Metabolitos del oxígeno	Leucocitos	+	±	Lesión endotelial, lesión tisular
FAP	Leucocitos, células cebadas	+	+	Broncoconstricción
IL-1 y FNT	Macrófagos; otros	-	+	Reacciones de fase aguda, activación endotelial
IL-8	Macrófagos, endotelio	-	+	Activación leucocitaria
Oxido nítrico	Macrófagos, endotelio			Vasodilatación, citotoxicidad

Fuente: Robbins Stanley, Cotran Ramzi, Kumar Vinay. Patología Estructural y Funcional .1997.

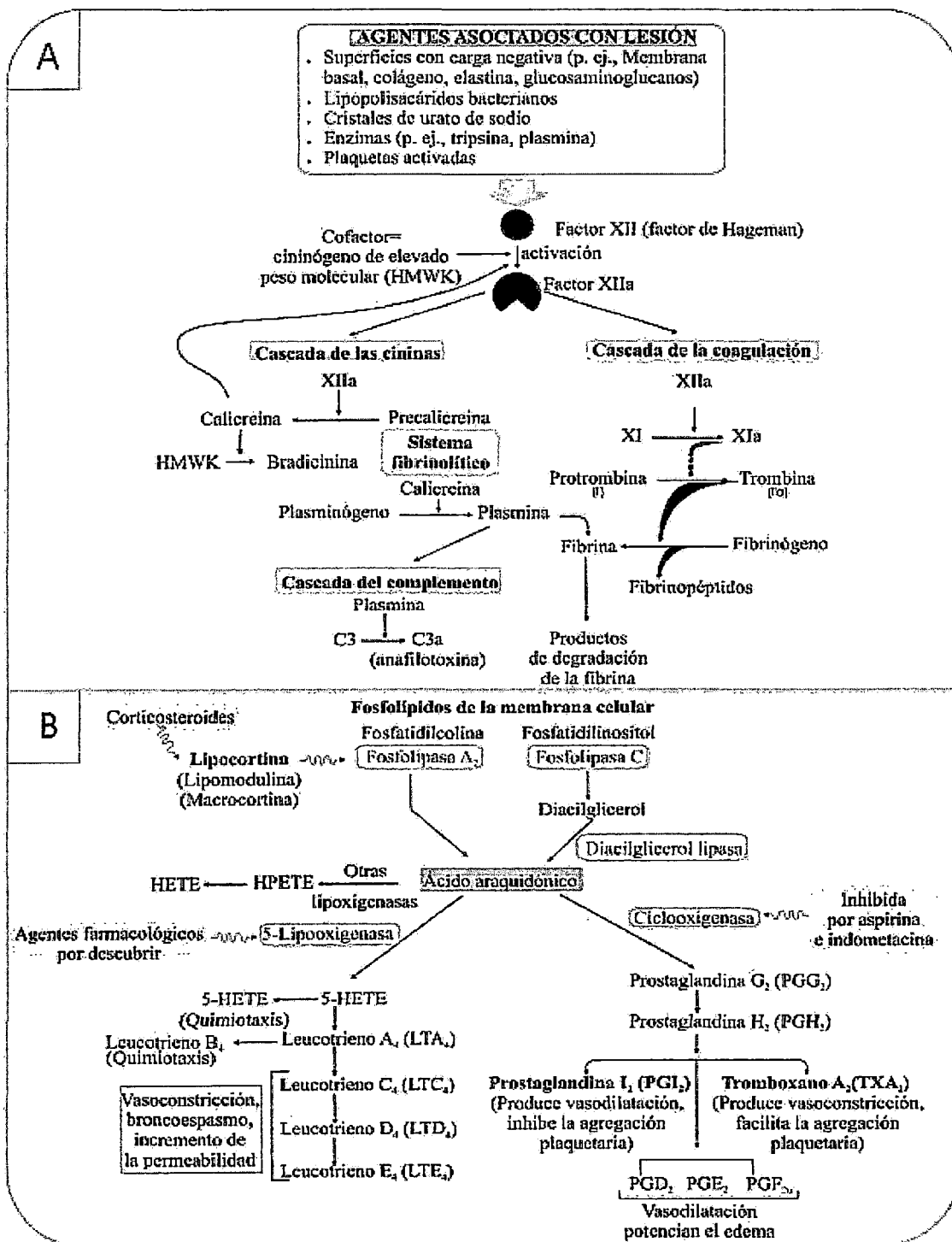
Gráfico 2.1. a) Acontecimientos en la Resolución de la Inflamación y b) Mediadores Químicos de la Inflamación



Fuente: Robbins Stanley, Cotran Ramzi, Kumar Vinay. Patología Estructural y Funcional .1997.

Gráfico 2.2

a) Relación entre los cuatro Sistemas Mediadores Plasmáticos en la Inflamación, y b) Generación de Metabolitos del Ácido Araquidónico y sus Funciones en la Inflamación.



Fuente: Robbins Stanley, Cotran Ramzi, Kumar Vinay. Patología Estructural y Funcional .1997.

2.4.4. INFLAMACIÓN CRÓNICA

La inflamación crónica se considera que es una inflamación de duración prolongada (semanas o meses) en la que se pueden observar simultáneamente signos de inflamación activa, de destrucción tisular y de intentos de curación.

En la inflamación crónica se identifican tres grupos de agentes que ocasionan la respuesta.

- Infecciones persistentes por ciertos microorganismos, intracelulares, como el bacilo tuberculoso, el *Treponema pallidum* (microorganismo que ocasiona la sífilis) y algunos hongos.
- Exposición prolongada a material inerte no degradable, por ejemplo la inhalación de sílice durante un período prolongado da lugar a una respuesta inflamatoria en los pulmones llamada silicosis.
- Enfermedades inmunitarias. En estas enfermedades, los autoantígenos causan una reacción inmunitaria, por ejemplo artritis reumatoide.(14)

La inflamación crónica se caracteriza por:

- ❖ Infiltración por células mononucleares como macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, lo que refleja una reacción persistente a la lesión.
- ❖ Destrucción tisular inducida principalmente por las células inflamatorias.
- ❖ Intentos de reparación mediante sustitución por tejido conjuntivo, es decir, con proliferación de vasos de pequeños calibres (angiogénesis) y en especial fibrosis.

En la inflamación crónica persiste la acumulación de macrófagos, mediada por mecanismos diferentes en relación con el tipo de reacción.

1. Refuerzo continuado de monocitos procedentes de la circulación, lo que se debe a la expresión sostenida de las moléculas de adhesión y de los factores quimiotácticos en las que se incluyen C5a; las

- citocinas de la familia IL-8 producidas por los macrófagos y linfocitos activados, ciertos factores de crecimiento, fragmentos del metabolismo del colágeno y la fibronectina y fibrinopéptidos.
2. Proliferación local de macrófagos.
 3. Inmovilización de los macrófagos en la zona de la inflamación ciertas citocinas (factor inhibidor de los macrófagos) y lípidos oxidados pueden producir esta inmovilización .los componentes celulares primarios de la respuesta inflamatoria crónica son macrófagos, linfocitos y eosinófilos en ciertos casos. La inflamación crónica es mediada por mecanismos inmunológicos y no inmunológicos y muchas veces se observa con el tejido de granulación.

El macrófago es la célula crucial en la regulación de estas reacciones, porque funciona como fuente de mediadores inflamatorios e inmunológicos. La acumulación de macrófagos ocurre principalmente como consecuencia del reclutamiento de monocitos circulantes por estímulos quimiotácticos y su diferenciación en los tejidos, además de generar mediadores de la inflamación, los macrófagos regulan las respuestas de los linfocitos a los Ag y secretan mediadores que modulan la proliferación y función de los fibroblastos y células endoteliales. (10)

2.5. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA

Se pueden evaluar mediante sistemas celulares *in vitro* y así estudiar el metabolismo del ácido araquidónico (AA) en la que se puede trabajar con sangre entera o con células aisladas (plaquetas, polimorfonucleares, queratinocitos, macrófagos, linfocitos y células del endotelio vascular) que permiten una fácil estandarización del ensayo y pueden ser contadas o determinar su contenido proteico y exponer directamente un número conocido de células con una viabilidad adecuada frente a una concentración exacta de compuesto.(56)

Otro método utilizado es la cuantificación de eicosanoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), una técnica que puede cuantificar más de 10 eicosanoides distintos en un solo análisis. Desde el punto de vista farmacológico, existen tres enzimas principales cuya actividad es importante en el fenómeno inflamatorio y que se pueden cuantificar mediante CLAR: PLA2, LOX y la COX. Como la actividad 5-LOX es medida por la producción de ácido 5-HETE, TB y sus isómeros o productos de oxidación marcadores válidos para el hallazgo de inhibidores de la 5-LOX. Como estos poseen grupos cromóforos que absorben a una determinada longitud de onda; por tanto, son fácilmente detectables y cuantificables, presentando correlación entre su absorbancia y su concentración. (56)

También están los modelos en las que emplean sustancias inductoras de inflamación aguda como con carragenina, dextrán, aceite de croton levadura o formalina. (12)

Pueden causarse reacciones inflamatorias crónicas implantando pequeñas bolitas de algodón debajo de la piel. Estas pueden extraerse más tarde y pesarse, para determinar la intensidad de la granulación. (12)

Los modelos experimentales de inflamación permiten estimar el potencial de drogas antiinflamatorias para empleo en el hombre, y brindan una capacidad predictiva. Siempre que las concentraciones plasmáticas no sean demasiado desiguales por diferencias del ritmo metabólico entre el hombre y especie animal utilizado para la prueba. (28)

2.6. FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS

Clásicamente los fármacos antiinflamatorios se agrupan en dos grandes grupos los glucocorticoides y los antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

2.6.1. GLUCOCORTICOIDES

Son hormonas sintetizadas en la corteza suprarrenal (cortisol, cortisona y corticosterona), implicados en el metabolismo de los carbohidratos, los

lípidos y las proteínas. A dosis supra fisiológicas muestran una potente acción antiinflamatoria, lo que ha llevado al desarrollo de compuestos sintéticos con mayor poder antiinflamatorio que las hormonas naturales y con una reducida capacidad mineralcorticoide. (60)

Los glucocorticoides actúan a través de receptores específicos citoplasmáticos, los cuales una vez activados migran al núcleo induciendo cambios en la transcripción de determinados genes implicados en la respuesta antiinflamatoria. Los efectos antiinflamatorios de estas hormonas son el resultado de la inhibición de expresión de citocinas pro inflamatorias, como IL 12 y TNF α y la producción de prostaglandinas. De esta manera se disminuyen las manifestaciones inmediatas de la inflamación como son rubor, dolor, etc., así como las tardías, entendiendo como tales los procesos de cicatrización y proliferación celular. También inhiben la vasodilatación y disminuyen el trasudado plasmático reduciendo la formación de edema. Modifican las interacciones entre los leucocitos y las células endoteliales alterándose la transmigración de los primeros hacia la zona lesionada. Reducen la liberación de enzimas lisosomales así como de mediadores proinflamatorios y bloquean la recaptación extraneuronal de catecolaminas, potenciándose la vasoconstricción inducida por catecolaminas endógenas. (52)

2.6.2. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)

Las acciones antiinflamatorias de los AINE se deben a la capacidad de inhibir la enzima COX. De esta manera se disminuye la producción de prostaglandinas y otros eicosanoides. La existencia de dos isoformas de la enzima COX; la COX-1 que se expresa de manera constitutiva en prácticamente todos los tejidos y media respuestas fisiológicas (citoprotección del estomago, agregación plaquetaria, etc.), y la COX-2, expresada por células implicadas en la respuesta inflamatoria (macrófagos, monocitos y sinoviocitos) y regulada por un amplio espectro de mediadores específicos de la inflamación destacando las prostaglandinas. Los efectos indeseables derivados de la administración de AINE como la

úlceras gastrointestinales, la hemorragia gástrica y las disfunciones plaquetarias se atribuyen a la supresión de la COX-1. Los efectos analgésicos y antipiréticos de los AINE se explican por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas dependientes de la COX-2. (52)

2.6.2.1. Clasificación de los AINES

- ***Inhibidores no selectivos de la COX***
 - a. **Derivados del ácido salicílico:** aspirina, salicilato de sodio, diflunisal.
 - b. **Derivados del paraaminofenol:** paracetamol
 - c. **Derivados de las pirazolonas:** metamizol, propifenazona, fenilbutazona.
 - d. **Derivados del ácido propiónico:** ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, oxaprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno.
 - e. **Derivados del ácido acético:**
 - Indolacéticos: indometacina, oximetacina, acemetacina, glucametacina.
 - Pirrolacéticos: tolmetina, ketorolaco, sulindaco.
 - Fenilacéticos: diclofenaco, alclofenaco, fentiazaco.
 - Naftilacético: nabumetona.
 - f. **Derivados del ácido enólico:** piroxicam, tenoxicam.
 - g. **Derivados del ácido antranílico (fenamatos):** ácido mefenamico, ácido meclofenamico.
- ***Inhibidores selectivos de la COX-2:*** Meloxicam, nimesulida, etodolaco, celecoxib, rofecoxib.
- ***AINE liberadores del ácido nítrico:*** Nitroxibutilesteres: flurbiprofeno ONO₂, ketoprofeno ONO₂, diclofenaco ONO₂, nitroaspirina.

2.6.2.2. Las acciones farmacológicas de los AINEs son:

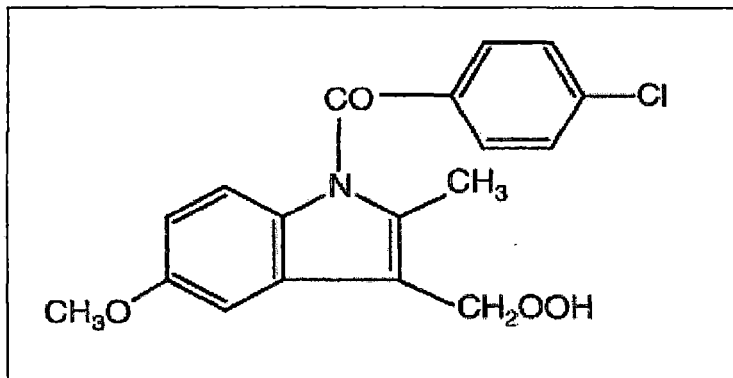
- Efecto analgésico y antipirético.
- Efecto sobre la función plaquetaria
- Efectos antiinflamatorios y antirreumáticos. (26)

2.7. AGENTE INFLAMATORIO:

ACEITE DE CROTÓN. Aceite extraído de las semillas del *Crotón tiglium*. Purgante extremadamente irritante. Aplicado sobre la piel, provoca un fuerte eritema. (4)

2.8. DESCRIPCIÓN DEL ANTIINFLAMATORIO PATRON INDOMETACINA

FIGURA 2.2. Estructura química INDOMETACINA



Fuente: Velázquez P. Lorenzo. Farmacología básica y clínica.
17ª Edición. Editorial Médica Panamericana. España.2004.

➤ **Propiedades Químicas y Farmacológicas.** La indometacina es un derivado indólico metilado, cuya fórmula química es: ácido-(p-clorabenzol) - metoxi -2-metil -indol- 3- acético. Posee notables propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. La indometacina constituye un potente inhibidor de la ciclooxigenasa que forma prostaglandinas, y también anula la movilidad de polimorfonucleares. A semejanza de otros antiinflamatorios no esteroideos desacopla la fosforilación oxidativa a concentraciones subterapéuticas y deprime la biosíntesis de los mucopolisacaridos. (17)

➤ **Farmacocinética.** Después de ingerida, la indometacina se absorbe en forma rápida y casi completa por vías gastrointestinales. La concentración máxima en plasma se alcanza en término de dos horas en sujeto en ayunas, pero puede tardar un poco mas si el medicamento se ingiere después de las comidas. La indometacina se liga 90% a las proteínas plasmáticas y también lo hace en forma extensa a los tejidos. La indometacina es convertida primordialmente en metabolitos

inactivos por desmetilación 50%, conjugación 10% y deacilación; que se eliminan por la orina, bilis, heces. Se sabe que 10% a 20% del fármaco se excreta sin modificaciones en orina. La vida media en plasma es variable, quizá por la recirculación enterohepática, pero es de 3 horas promedio. (17)

➤ **Indicaciones.** En enfermedades reumáticas de tipo agudo o crónico: espondilitis anquilosante, gota aguda; en desórdenes musculoesqueléticos agudos como: tendinitis, bursitis y síndrome agudo de hombro doloroso. La indometacina se puede utilizar como tocolítico para suprimir las contracciones uterinas en trabajo de parto pretérmino, además es posible controlar la insuficiencia cardíaca en neonatos causada por persistencia del conducto arterioso. (17)

➤ **Dosificación y Administración.** Indometacina es usualmente administrada en dosis de 50mg a 150mg diarios divididos en dos o tres dosis, por vía oral, según la respuesta y tolerancia de cada paciente.(17)

➤ **Reacciones adversas.** Trastornos gastrointestinales: anorexia, náusea y dolor abdominal, úlceras a veces perforaciones y hemorragia. Es posible la aparición de diarrea. El efecto más frecuente en sistema nervioso central es la cefalea frontal intensa, mareos, vértigo, obnubilación y confusión mental. Reacciones de hipersensibilidad que se manifiestan en forma de erupciones, prurito y urticaria. (20)

➤ **Interacciones Medicamentosas**

Diflusal: Reduce los niveles plasmáticos de Indometacina, por disminución de la depuración renal; además, el uso combinado de Indometacina y diflusal se ha asociado con hemorragia gastrointestinal fatal, por lo que no se deberán administrar conjuntamente Indometacina y diflusal.

Ácido acetilsalicílico: La administración concomitante de Indometacina y ácido acetilsalicílico disminuye aproximadamente 20% los niveles sanguíneos de Indometacina.

AINE: La combinación de Indometacina con otros AINEs no es recomendable, ya que se incrementa el riesgo de toxicidad gastrointestinal, con poco o ningún aumento en la eficacia.

Anticoagulantes: Pacientes que reciben terapia anticoagulante deben ser vigilados para detectar alteraciones en el tiempo de protrombina.

Probenecid: En pacientes que reciben probenecid es probable que los niveles plasmáticos de Indometacina estén aumentados, por lo que una dosis diaria total menor de Indometacina puede producir un efecto terapéutico satisfactorio.

Metotrexato: Indometacina al igual que otros AINEs, disminuyen la secreción tubular del metotrexato y potencian su toxicidad.

Ciclosporina: Administración de AINE concomitantemente con ciclosporina ha sido asociado con un incremento en la toxicidad inducida por las ciclosporinas, asociada posiblemente a la disminución de la síntesis de prostaciclina renales.

Digoxina: La administración conjunta de Indometacina con digoxina aumenta su concentración en suero y prolonga su vida media, por lo que cuando Indometacina y digoxina se administren concomitantemente se deben monitorear estrechamente los niveles de digoxina en suero.

Diuréticos: En algunas ocasiones la administración de Indometacina puede reducir el efecto diurético, natriurético y antihipertensivo de los diuréticos del asa, ahorradores de potasio y diuréticos de tiazida. (26)

2.9. DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA

2.9.1. TOXICIDAD

El objetivo de los estudios de toxicidad es evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas. Podría definirse la evaluación de la toxicidad como el estudio cualitativo y cuantitativo de los efectos deletéreos ocasionados por agentes químicos o físicos sobre la estructura y función de los sistemas vivos y la aplicación de estos estudios para la evaluación de la seguridad y la prevención de daños al hombre. Uno de los requisitos que se exige en la investigación de productos naturales, es el comprobar el grado de toxicidad que el producto pudiera producir. (7) (11)

2.9.2. PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

2.9.2.1. VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Las sustancias químicas pueden ser introducidas en el complejo organismo biológico por varias vías, las propiedades químicas y físicas de cada compuesto determinan sustancialmente la vía por la que tiene lugar la exposición intencional o accidental, un agente sólido, en contraste con un agente muy volátil, requeriría especiales procedimientos para ser administrado a un animal por vía distinta a la oral.

Particularmente las vías oral y/o respiratoria, son las vías más adecuadas y más comunes para la exposición no intencional a sustancias químicas, mientras que el uso de técnicas de inyección puede ser la vía más conveniente para la administración intencional de compuestos a animales "que no cooperan". (16)

2.9.2.2. VÍA ORAL

La vía oral es una de las vías más importantes por las que ingresan las sustancias químicas al organismo. En el tracto gastrointestinal de los animales las sustancias químicas solo pueden producir un efecto en la superficie de las células mucosas que revisten dicho tracto a menos que tenga lugar la absorción desde el mismo. (21)

La toxicidad de las sustancias químicas administradas por vía oral puede variar según la frecuencia con que lo son y según en qué condiciones se hace, es decir, si son mezclas con alimentos o administradas a un estómago vacío. (21)

Existen experimentos los cuales reportan que la toxicidad de un medicamento administrado por sonda oral puede ser considerablemente diferente del mismo medicamento administrado mezclado con la ración, así como que la toxicidad aguda es mayor en las ratas en ayunas que en las que no las estaban.(21)

La administración oral de sustancias químicas que son rápidamente absorbidas en el tracto gastrointestinal deberá teóricamente exponer el hígado a concentraciones del agente que no puedan obtenerse por otras vías de administración. Además, si un compuesto entra en el ciclo entero hepático, por lo menos una parte del mismo deberá localizarse en los órganos implicados en este ciclo. (21)

2.9.2.3. SELECCIÓN DE DOSIS

La dosis inicial se determina mediante experimentación, tomando primero una dosis que no manifiesta efecto alguno en los animales. En los siguientes grupos de animales la dosis deberá aumentarse a razón de un múltiplo constante hasta que la dosis administrada alcance un

nivel suficiente elevado para producir severos signos de intoxicación o muerte en los animales. (21)

2.9.2.4. RELACIÓN DOSIS – TOXICIDAD

El único factor que determina el grado de toxicidad de una sustancia es su dosis; si una dosis suficiente se introduce en el organismo o entra en contacto con un mecanismo biológico, un efecto tóxico será la consecuencia de que la capacidad de este mecanismo biológico para llevar a cabo una función, resulte destruida o seriamente dañada y provoque una enfermedad o la muerte en dicho organismo. Para poder afirmar que una sustancia es más tóxica que otra es necesario establecer una comparación cuantitativa solo tendrá valor si es efectuada en el organismo considerando en idénticas condiciones de experimentación. (11,16)

2.9.2.5. TOXICIDAD AGUDA

La toxicidad aguda se refiere al desarrollo rápido de síntomas y efectos después de la aplicación de dosis única relativamente altas o daños inmediatos generados por dosis únicas suficientemente grandes. Las ratas y los ratones son animales bastante sensibles a sustancias tóxicas presentes en las plantas, la administración de los extractos en cantidades crecientes permite evaluar los límites de toxicidad, es decir permite determinar la cantidad (dosis) de droga que puede ser peligrosa o directamente mortal cuando se les administra en una o varias veces en 24 horas o menos, idealmente deben probarse dos vías , tres dosis y ambos sexos debiendo tomarse en cuenta factores como edad, sexo, peso, especie, condiciones ambientales ,acceso a la comida y al agua.(16)

Las observaciones que se efectúan incluyen:

- Relación dosis respuesta

- Síntomas y signos tóxicos
- Conducta del animal durante el periodo de observación
- Tiempo de muerte y velocidad de recuperación

2.9.2.6. LA DOSIS LETAL COMO CONSTANTE BIOLÓGICA

La investigación de la toxicidad aguda es el primer paso en la investigación toxicológica de una sustancia desconocida. El índice de toxicidad aguda es la DL50. Sin embargo, la DL50 no debe ser considerada como una constante biológica, debido a que se obtienen resultados distintos al realizar repeticiones o cuando las determinaciones son llevadas a cabo en diferentes laboratorios. Este hecho ha sido ya claramente, mostrado en un estudio multi - centro llevado a cabo en la comunidad europea con cinco sustancias por Hunter y Ling en 1978 (22).en este estudio los valores de DL50 como se muestra en la siguiente tabla.

Cuadro 2.4. Estudio de valores de DL50

Compuesto	DL50	Radio del valor más alto al más pequeño
I	46 – 522	11.3
II	800-4,150	5.2
III	350-1280	3.7
IV	805-5420	6.7
V	70-513	7.3

Fuente: Lorke, 1983

Otros ejemplos que muestran que los valores de DL50 no pueden ser considerados como constantes biológicas, han sido investigas por Zbinden y Fluir – Roversi en 1981 .L a conclusión que debemos mencionar en estos resultados es que es imposible en principio especificar un valor de DL50 para una sustancia el cual es al mismo tiempo sea válido y exacto. (22) de lo anterior es que se desprende la siguiente pregunta: ¿Por qué son tantos animales sacrificados por el

único propósito de determinar el valor de DL50 con alta precisión , si es imposible en principio determinar una DL50 valida y reproducible.

2.9.2.7. EL MÉTODO DE LORKE PARA LA DETERMINACIÓN DE DL50

El método de Lorke describe un método para la investigación de la toxicidad aguda de una sustancia desconocida, con la determinación de la DL50. Usando este método, es posible obtener con tres animales de experimentación información adecuada de la toxicidad aguda y de la DL50. Este método no presenta limitaciones y es aplicable a fármacos y sustancias de la agricultura e industria. Este método también puede usarse por todas las vías de administración. (22)

Este método propone la determinación de toxicidad aguda en dos pasos. Además está basada en la suposición de que la sustancia química a ser investigada es completamente desconocida y que la investigación será llevada con número mínimo de animales experimentales (22).

Inicialmente es necesario determinar el rango aproximado de toxicidad aguda. Esto se logra administrando dosis diferentes al animal, por ejemplo 10, 100 y 1000 mg/Kg por vía oral. Los resultados muestran si una sustancia es muy toxica, toxica, poco toxica, o débilmente toxica. Para esta primera fase se deben utilizar tres animales por cada nivel de dosis.

El resultado de esta primera etapa es utilizado para determinar las dosis subsecuentes experimentales. (22)

Los siguientes postulados son hechos con respecto a los programas de administración subsecuentes:

1. Las sustancias más toxicas que 1 mg/Kg son altamente tóxicas de tal modo que no es importante determinar la DL50 exactamente.
2. Los valores de DL50 mayores a 5000 mg/Kg no son de interés practico

3. Un valor aproximado de DI50 es usualmente adecuado para estimar el riesgo de intoxicación aguda

Basado en estas consideraciones y en experiencias prácticas se tiene la siguiente tabla, utilizada para determinar las nuevas dosis en el segundo test en el cada grupo está formado por un único ratón.

Cuadro 2.5. Modelo para determinar las nuevas dosis en el segundo Test de Lorke

Dosis en mg/Kg Resultados de la investigación inicial			Dosis escogidas para el segundo test			
10	100	1000				
0/3*	0/3	0/3		1,600	2,900	5,000
0/3	0/3	1/3	600	1,000**	1,600	2,900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1,600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100**	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10**	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

* Número de animales que mueren / número de animales usados,

** Los resultados del primer test son considerados para estas dosis.

Fuente: Lorke 1983

La DL50 se determina de la siguiente manera: se obtiene el promedio geométrico de las dosis para las cuales se encuentren 0/1 y 1/1 muertes de manera subsecuentes en la segunda prueba. Ejemplo:

Determinación de la DL50 del Kcn en ratas según el método de Lorke.

Cuadro 2.6. Ejemplo para determinar las nuevas dosis en el Segundo Test de Lorke

Sustancia	Primera Fase		Segunda Fase	
	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
KCN	10	3/3	1	0/1
	100	3/3	2	0/1
	1000	3/3	4	0/1
			8	1/1
DL50 para el Kcn = $(4+8)/2 = 6\text{mg/Kg}$				

Fuente: Lorke, 1983

2.9.2.7. PRUEBAS DESCRIPTIVAS DE TOXICIDAD EN ANIMALES

Las pruebas descriptivas de toxicidad que se realizan en animales se basan en dos principios:

- ❖ En primer lugar, los efectos de sustancias químicas producidos en animales de laboratorio, si son lo suficientemente fidedignos, pueden aplicarse a la toxicidad en seres humanos. Cuando se calcula con base en la dosis por unidad de superficie corporal, los efectos tóxicos para los humanos suelen surgir en la misma gamma de concentraciones que se observa en animales de experimentación. Con base en el peso corporal, los seres humanos suelen ser más vulnerables que los animales de experimentación. Esta información se utiliza para escoger dosis en estudios clínicos de "posibles" agentes terapéuticos, y para fijar límites de la exposición o contacto permisibles a tóxicos ambientales.
- ❖ En segundo principio es que la exposición de algunos animales de experimentación a dosis altas de agentes tóxicos es un método necesario y válido para identificar posibles riesgos para seres

humanos expuestos a dosis mucho menores. Este principio se basa en el concepto de dosis –respuesta del todo o nada. Por razones prácticas, el número de animales utilizados en experimentos con materiales tóxicos suele ser muy pequeño en comparación con la gran magnitud de las poblaciones humanas que pueden estar en peligro. (16)

2.10. GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **ANTIINFLAMATORIO:** Llamado también antiflogístico. Proviene del griego anti, contra, y phlogistikos, quemado. Droga que sirve para calmar la inflamación o congestión.(5)
- **CONTROL:** Experimento o norma que sirve para comprobar la exactitud de la observación obtenida en otro experimento. (4)
- **DOSIS:** Cantidad de una droga que debe ser administrada por vez para producir un efecto deseado. (4).
- **EDEMA:** Acumulación anormal de líquido en los espacios intercelulares del cuerpo.(30)
- **EFECTO:** Resultado de una acción. (4)
- **EXTRACCIÓN:** Acción de una droga vegetal producto de una extracción con un disolvente. (4).
- **SOLUBILIDAD:** Cualidad de una sustancia a ser disuelta o disolverse. (4)
- **TOXICIDAD:** Calidad de tóxico que afecta al organismo. (4)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y

MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. MUESTRA VEGETAL

Se utilizaron las partes aéreas de la especie vegetal *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo), siendo la zona de recolección de la muestra vegetal la localidad de Esmeralda a 1500 m.s.n.m, ubicada al este de la ciudad de Quillabamba, Provincia de La Convención, Departamento del cusco.

3.1.2. MUESTRA BIOLÓGICA

Se utilizaron 80 ratones albinos machos cepa Balb/c/CNPB de tres meses de edad y un peso promedio de 27 gramos.

3.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

3.2.1. Materiales de campo:

- Etiquetas autoadhesivas
- Cuchillo
- Tijeras
- Sacabocados

3.2.2. Materiales de laboratorio:

- Tubos de ensayo
- Pipetas de 5 mL y 10 mL
- Fiolas de 50 mL y 100mL
- Matraz de 100 mL
- Baguetas
- Placas petri
- Gradillas

- Vaso de precipitados de 200 y 500 mL
- Goteros
- Embudos
- Papel filtro
- Probetas de 10 y 100 mL
- Lunas de reloj
- Micropipeta 10 a 100 μ L
- Jeringas de 1 mL, 3 mL, 5 mL y 10 mL
- Sonda orogástrica

3.2.3. Instrumentos de laboratorio

- Balanza analítica sensible al 0.001 g
- Cronómetro
- Termómetro
- Baño maría
- Cocina eléctrica
- Estufa

3.2.4. Reactivos:

- Aceite de crotón .Laboratorio Sigma-Aldrich (Missouri, USA)
- Acetona
- Acetato de etilo
- Agua destilada
- Etanol 40%, 70%, 96%
- Benceno
- Cloroformo
- Éter
- Éter etílico
- Hexano
- Cloruro férrico

- Acido clorhídrico concentrado
- Limaduras de magnesio
- Acido sulfúrico concentrado
- Reactivo de Benedict
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Baljet
- Indometacina 25 mg en cápsulas Genfar
- Suero fisiológico

3.2.5. Otros materiales:

- Frascos color caramelo
- Jeringas descartable
- Jaulas
- Molino de granos

3.3. RECURSOS E INFRAESTRUCTURA

- ❖ Laboratorio de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- ❖ Laboratorio de Farmacología de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

3.4. DISEÑO METODOLÓGICO

3.4.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Con el propósito de evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) administrado por vía oral y vía tópica se realizó un estudio cuasiexperimental ya que se cuenta con un grupo control y sin pre prueba y además que los animales de

experimentación no se asignaron al azar; sino que dichos grupos ya estaban formados antes del experimento.

Para realizar el ensayo de toxicidad se utilizó el estudio cuasiexperimental con pre-prueba y post-prueba bajo el método de Lorke.

3.4.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.4.2.1. PARA DETERMINAR EL EFECTO ANTIINFLAMATORIO

- Vía de administración oral

G1	--	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3
G4	X4	O4
G5	X5	O5
G6	X6	O6

G1, G2, G3, G4: Grupos experimentales formados por cinco animales

G5: Grupo patrón de cinco animales

G6: Grupo control de cinco animales

X1: dosis 300 mg/kg de peso de extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

X2: dosis 600 mg/kg de peso de extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

X3: dosis 900 mg/kg de peso de extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

X4: dosis 1200 mg/kg de peso de extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

X5: dosis de indometacina 7 mg/Kg de peso corporal.

X6: dosis de suero fisiológico 0.4 ml

O1, O2, O3, O4, O5, O6: Grado de inhibición de la inflamación.

- : ausencia de estímulo (nivel "cero" en la variable independiente). Indica que se trata de un grupo control.

• **Vía de administración tópica**

G1	--	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3
G4	X4	O4
G5	X5	O5

G1, G2, G3: Grupos experimentales de cinco animales

G4: Grupo patrón de cinco animales

G5: Grupo control de cinco animales

X1: dosis 0.5 mg/oreja de peso de extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

X2: dosis 2.5 mg/oreja de peso de extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

X3: dosis 5 mg/oreja de peso de extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

X4: dosis de indometacina 1 mg/oreja de peso corporal.

X5: dosis de suero fisiológico 20µl /oreja

O1, O2, O3, O4, O5, O6: Grado de inhibición de la inflamación.

- : ausencia de estímulo (nivel "cero" en la variable independiente).Indica que se trata de un grupo control.

3.4.2.2. PARA DETERMINAR LA TOXICIDAD AGUDA

FASE I:

G1	X1	O1	O5	O9	O13	O17	O21	O25	O29	O33	O37	O41	O45	O49	O53
G2	X2	O2	O6	O10	O14	O18	O22	O26	O30	O34	O38	O42	O46	O50	O54
G3	X3	O3	O7	O11	O15	O19	O23	O27	O31	O35	O39	O43	O47	O51	O55
G4	X4	O4	O8	O12	O16	O20	O24	O28	O32	O36	O40	O44	O48	O52	O56

Donde:

G1: grupo control constituido por 3 ratones albinos.

G2, G3, G4: Grupos experimentales formados por 3 ratones albinos.

X1: Suero fisiológico 0.2ml

X2: Dosis de 10 mg /Kg del extracto seco

X3: Dosis de 100 mg /Kg del extracto seco

X4: Dosis de 1000 mg /Kg del extracto seco

O1, O2, O3, O4: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 5 minutos

O5, O6, O7, O8: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 10 minutos

O9, O10, O11, O12: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 15 minutos

O13, O14, O15, O16: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 30 minutos

O17, O18, O19, O20: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 60 minutos

O21, O22, O23, O24: observación de efecto tóxico agudo o muerte a la Hora

O25, O26, O27, O28: observación de efecto tóxico agudo o muerte a las 2 Horas

O29, O30, O31, O32: observación de efecto tóxico agudo o muerte a las 6 Horas

O37, O38, O39, O40: observación de efecto tóxico agudo o muerte a las 24 Horas

O41, O42, O43, O44: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 2 días

O45, O46, O47, O48: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 4 días

O49, O50, O51, O52: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 7 días

O53, O54, O55, O56: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 14 días.

FASE II: De acuerdo a los resultados que serán obtenidos de la fase I.

G1	X1	O1	O5	O9	O13	O17	O21	O25	O29	O33
G2	X2	O2	O6	O10	O14	O18	O22	O26	O30	O34
G3	X3	O3	O7	O11	O15	O19	O23	O27	O31	O35
G4	X4	O4	O8	O12	O16	O20	O24	O28	O32	O36

Donde:

G1 : Grupo control formado por un ratón .

G2, G3, G4: Grupos experimentales formados por un ratón albino.

X1: Dosis de suero fisiológico

X2: Dosis de 1000 mg /Kg del extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.)

R.K. Jansen

X3: Dosis de 1600mg /Kg del extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.)

R.K. Jansen

X4: Dosis de 2900mg /Kg del extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.)

R.K. Jansen

X5: Dosis de 5000 mg /Kg del extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.)

R.K. Jansen

O1, O2, O3, O4: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 5 minutos

O5, O6, O7, O8: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 10 minutos

O9, O10, O11, O12: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 15
minutos

O13, O14, O15, O16: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 30
minutos

O17, O18, O19, O20: observación de efecto tóxico agudo o muerte a los 60
minutos

O21, O22, O23, O24: observación de efecto tóxico agudo o muerte a la Hora

O25, O26, O27, O28: observación de efecto tóxico agudo o muerte a las 2
Horas.

O29, O30, O31, O32: observación de efecto tóxico agudo o muerte a las 6
Horas.

O33, O34, O35, O36: observación de efecto tóxico agudo o muerte a las 24
Horas

**CUADRO N°3.1
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES IMPLICADAS**

VARIABLES	NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADORES	EXPRESIÓN FINAL
INDEPENDIENTES					
a) Dosis de extracto seco de <i>Acmella oleracea</i> (L.)R.K. Jansen					
Vía oral	cuantitativa	Directa	Razón	-----	mg/Kg
Vía tópica	cuantitativa	Directa	Razón	-----	mg/Oreja
b) Dosis de Indometacina	cuantitativa	Directa	Razón	-----	mg/Kg
Vía oral	cuantitativa	Directa	Razón	-----	mg/Kg
Vía tópica	cuantitativa	Directa	Razón	-----	mg/Oreja
Dependientes :					
A. Efecto antiinflamatorio	Cuantitativa	Directa	Razón	Disminución del edema auricular	% Inhibición de Inflamación
B. Toxicidad Aguda Oral	Cuantitativa	Directa	Razón	Presencia de animales muertos	Número de animales muertos
➤ Sintomatología	Cualitativa	Directa	Nominal	Piloerección Somnolencia Diarrea Dolor abdominal Temblores	0:Nada 1: ligera 2: moderada 3:severa 4: muy severa
➤ Aspectos del comportamiento	Cualitativa	Directa	Nominal	Irritabilidad Agresividad Intranquilidad Depresión severa	0:Nada 1: ligera 2: moderada 3:severa 4: muy severa

**CUADRO N°3.2
OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

VARIABLES INTERVINIENTES		NATURALEZA	MEDICIÓN	ESCALA	INDICADORES	EXPRESIÓN FINAL
DE LOS RATONES	Raza	Cualitativa	Directa	Nominal	Especie/cepa	Mus musculus Balb/c/CNPB
	Edad	Cuantitativa	Directa	Razón	Días, meses.	2-3 meses
	Sexo	Cualitativa	Directa	Nominal	Macho o hembra	Machos
	Peso	Cuantitativa	Directa	Razón	Gramos	30-35 g.
	Alimentación	Cualitativa	Directa	Nominal	Proteínas, carbohidratos, grasas	Dieta balanceada
DE LA PLANTA	Estadio de crecimiento	Cualitativa	Directa	Nominal	Floreciendo	Planta en floración
	Altitud de recolección	Cuantitativa	Directa	Razón	m.s.n.m	700- 1000 m.s.n.m
	Temporada de recolección	Cuantitativa	Directa	Razón	Época de lluvias	Enero- marzo
	Tipo de extracción	Cuantitativa	Directa	Razón	Maceración	Extracto etanólico al 70%

Fuente: Elaboración propia

3.4.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.3.1. VARIABLES IMPLICADAS

3.4.3.1.1. VARIABLES INDEPENDIENTE

- a) **Dosis de extracto seco etanólico al 70% de las partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (botoncillo).**

❖ **Definición conceptual:**

Cantidad de extracto seco obtenido por maceración con etanol al 70% de las partes aéreas de de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (botoncillo). (29)

• **Definición operacional para la evaluación del efecto antiinflamatorio vía oral**

- Naturaleza: cuantitativa
- Medición: directa
- Escala: Razón.
- Instrumento: Balanza analítica
- Expresión final de la variable: mg/Kg
- Procedimiento de medición: Se procedió a evaporar a sequedad el extracto etanólico, una vez obtenido éste, se pesó la cantidad necesaria en mg. El cual fue disuelto en suero fisiológico para la la evaluación del efecto antiinflamatorio vía oral y en alcohol al 95% para la vía tópica.

• **Definición operacional para la evaluación del efecto antiinflamatorio vía tópica**

- Naturaleza: cuantitativa
- Medición: directa

- Escala: Razón.
- Instrumento: Balanza analítica
- Expresión final de la variable: mg/Oreja
- Procedimiento de medición: Se procedió a evaporar a sequedad el extracto etanólico, una vez obtenido éste, se pesó la cantidad necesaria en mg, el cual fue disuelto en alcohol al 95%.

b) Dosis de fármaco patrón Indometacina.

❖ **Definición conceptual:** Antiinflamatorio no esteroideo.

• ***Definición operacional para la vía oral***

- Naturaleza: cuantitativa
- Medición: directa
- Escala: Razón.
- Instrumento: Balanza analítica
- Expresión final de la variable: mg/Kg
- Procedimiento de medición: Se procedió a pesar en mg la cantidad necesaria de las cápsulas de indometacina. El cual fue disuelto en suero fisiológico tanto para la vía oral como tópica.

• ***Definición operacional para la vía tópica***

- Naturaleza: cuantitativa
- Medición: directa
- Escala: Razón.
- Instrumento: Balanza analítica
- Expresión final de la variable: mg/Oreja
- Procedimiento de medición: Se procedió a pesar en mg la cantidad necesaria de las cápsulas de indometacina. El cual fue disuelto en suero fisiológico tanto para la vía tópica.

3.4.3.1.2. VARIABLES DEPENDIENTES

a) Efecto antiinflamatorio en ratones albinos

Definición conceptual: Es la respuesta de la actividad de una droga frente a la inflamación como proceso defensivo, protector y localizador del agente invasor químico del TPA (13- acetato de 12 – tetradecanoilforbol). (20)

Definición operacional:

❖ **Indicador:** Disminución del edema auricular por el extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen, expresado en porcentaje de inhibición.

- Naturaleza: cuantitativa
- Medición: Indirecta
- Escala: mg
- Instrumento: balanza analítica
- Procedimiento de medición: El efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (botoncillo). Se determinó por medio de una fórmula (ecuación 4), de acuerdo a los pesos obtenidos en la balanza analítica de las secciones circulares (6mm de diámetro) de ambas orejas del ratón (tratada y no tratada), las cuales se pesaron para determinar por diferencia el edema producido en el proceso inflamatorio inducido por el aceite de crotón.
- Expresión final de la variable: % de inhibición de inflamación (edema).

b) Toxicidad Aguda Oral en ratones albinos

Definición conceptual:

Es la capacidad de una sustancia (extracto etanólico) de producir efectos tóxicos en ratones albinos al ser administrado por vía oral en una sola vez. (21)

Definición operacional:

La toxicidad aguda se determinó de acuerdo al número de animales muertos a la administración de los extractos etanólicos siguiendo el método de toxicidad aguda de Lorke.

- Naturaleza: cuantitativa
- Medición: directa
- Escala: Razón
- Indicador: Presencia de animales muertos
- Procedimiento de medición: se dosifica el extracto seco etanólico en mg/kg de peso de los ratones albinos y se administra por vía oral para que produzca el efecto de toxicidad aguda.
- Expresión final de la variable: número de animales muertos al administrar el extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (botoncillo).

3.4.3.2. VARIABLES INTERVINIENTES

a. Del Animal

Especie: Ratones albinos cepa Balb/c/CNPB

Edad: De 2 a 3 meses

Sexo: Macho

Peso: Entre 25 – 27 g

b. De la Planta

Estadio de crecimiento: Se determinó el estado de maduración de la especie *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen mediante una inspección visual evaluando el período en la que florece.

Altitud de recolección: La especie vegetal en estudio se recolectó a 700 m.s.n.m.

3.4.3.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

3.4.3.3.1. DE LA MUESTRA VEGETAL

A. Criterios de Inclusión

Se incluyeron aquellas plantas de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (botoncillo) con tallos, hojas y flores maduras enteras durante la floración libre de polvo, hongos e insectos.

B. Criterios de Exclusión

Se excluyeron las muestras vegetales que presentaban hojas y flores en putrefacción, húmedas, marchitas contaminadas con hongos o descoloridas.

3.4.3.3.2. DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

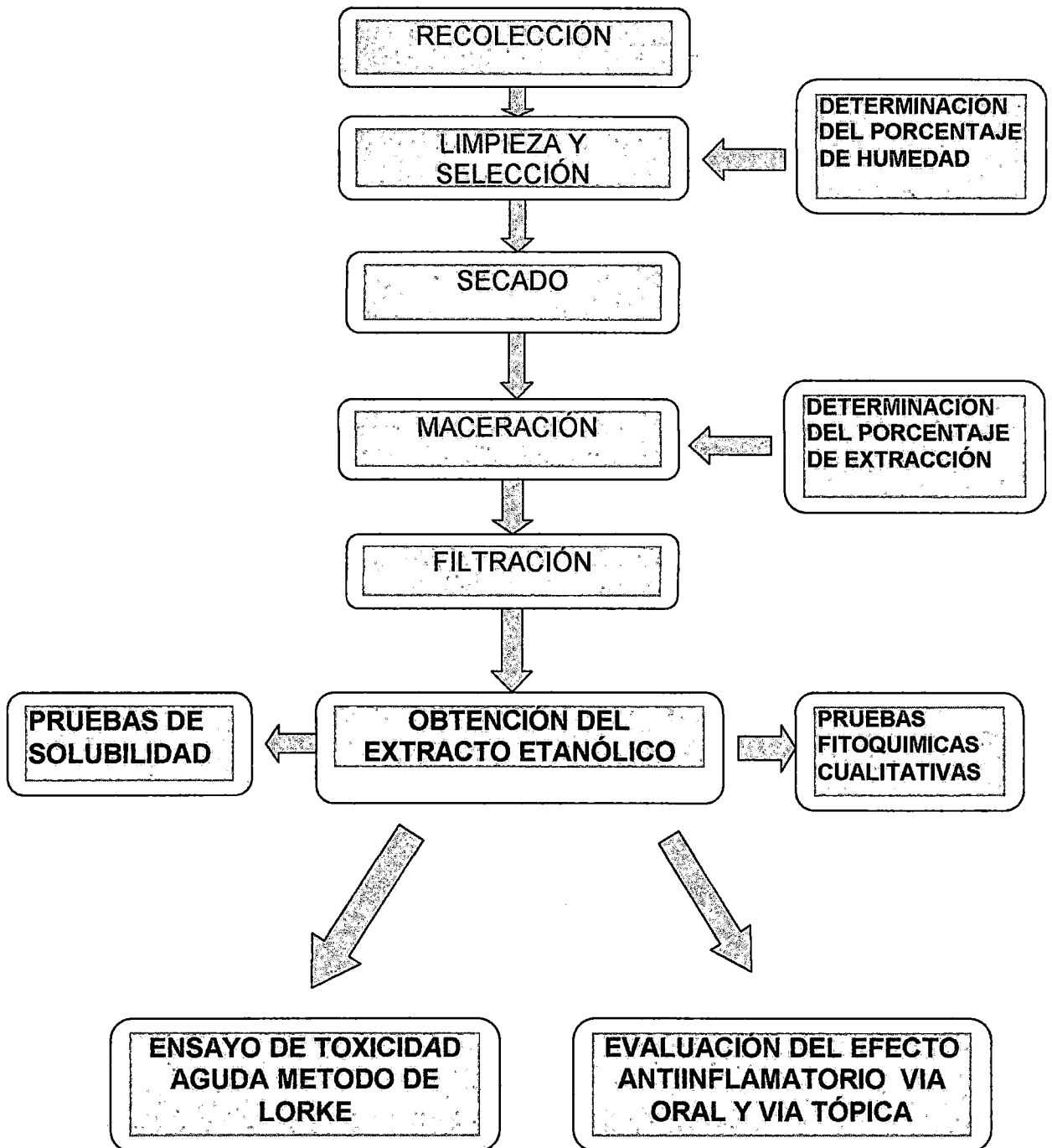
A. Criterios de Inclusión

Se utilizaron ratones machos de la especie *Mus musculus* de la cepa Balb/c/CNPB de tres meses de edad

B. Criterios de Exclusión

Se excluyó ratones hembras, enfermos, de bajo peso y de especies diferentes.

FLUJOGRAMA 3.1
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO SECO PARA LA EVALUACIÓN
DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VIA ORAL Y VIA TÓPICA



Fuente: Elaboración propia

3.5. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS

3.5.1. PREPARACIÓN DE LA PLANTA EN ESTUDIO

3.5.1.1. Recolección de la planta en estudio

La muestra vegetal de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (botoncillo).se recolectó en el distrito de Santa Ana, provincia de La Convención departamento del Cusco; recolectándose tallos, hojas y flores sanas, frescas y libres de plagas empleándose como recipientes bolsas de polietileno.

3.5.1.2. Identificación botánica :

Se realizó en el Herbario CUZ) de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

3.5.1.3. Secado de la Muestra

El secado se realizó en sombra en un ambiente limpio, ventilado, y temperatura ambiente sobre hojas de papel kraf cambiando cada 2 días de papel para evitar la humedad.

3.5.1.4. Molienda

Previa selección de las partes aéreas de la planta, se trituró la muestra vegetal seca en un molino de granos, luego se obtuvo una muestra homogénea pulverizada que fue envasada en un frasco de vidrio color ámbar de tapa hermética.

3.5.1.5. Determinación de la humedad

Para esta determinación se utilizaron tres placas petri en las que se depositaron 5 g de muestra fresca (partes aéreas) de la planta en

estudio y se llevo a la estufa la cual estaba graduada a 50°C hasta obtener peso constante.

Para determinar el porcentaje de humedad se procedió según la fórmula:

Ecuación 1:
$$\%H = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

Donde:

%H= Porcentaje de humedad

M1= Peso de muestra fresca

M2=Peso de muestra seca

3.5.1.6. Obtención de Extractos

La parte molida y envasada de la especie en estudio, se sometió a maceración en etanol al 70% en una relación de 1:2 aproximadamente durante 15 días en un envase color caramelo.

Transcurrido el tiempo se procedió a filtrar el macerado. El producto filtrado se depositó en envases de boca ancha y se procedió a evaporación.

El porcentaje de extracción se calculo con la siguiente relación:

Ecuación 2:
$$\%EES = \frac{Pf \times 100}{Pi}$$

Donde:

%EES= Porcentaje de extracción del extracto

Pf= Peso final (peso seco)

Pi=Peso inicial (muestra pulverizada)

3.5.1.7. Pruebas de Solubilidad

El extracto obtenido fue sometido a la prueba de solubilidad en el cual se utilizaron diferentes solventes desde los más polares hasta los más apolares para determinar la naturaleza disolutiva del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (botoncillo). Se tomaron aproximadamente 100mg del extracto seco en diferentes tubos a los cuales se les agregó 1ml del solvente de diferente polaridad.

Cuadro 3.3. Solventes en Orden Creciente de Polaridad

Solventes	
H ₂ O	Acido acético
Acetonitrilo	Acetato de etilo
Metanol	Cloro benceno
Amoniaco	CHCL ₃
Étanol	Éter dietílico
acetona	Tolueno
Diclorometano	Benceno

Fuente: Información recopilada de Salcedo Alfredo. Química. Perú .1995

3.5.1.8. Análisis Fitoquímico Cualitativo

Las pruebas de análisis fitoquímica cualitativo se realizaron en el laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

Este ensayo se realizó con la finalidad de identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto de los tallos, hojas y flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (botoncillo); utilizando reactivos químicos de caracterización dando una reacción de coloración específica.

Cuadro 3.4. Reactivos para la determinación de Metabolitos

Secundarios

Metabolitos secundarios	Reactivos
Azúcares reductores	Fehling A y B
Glicósidos	Fehling A y B
Aminoácidos	Ninhidrina
Flavonoides	Shinoda
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico
Alcaloides	Dragendorff
Taninos	Gelatina - sal
Saponinas	Acido sulfúrico
Lactonas	Hidroxamato ferrico
Cumarinas	Baljet
Esteroides	Lieberman – Burchad
Quinonas	Borntrager
Gomas	Acetato básico de plomo
Mucílagos	Acetato neutro de plomo
Resinas	Barfoef

Fuente: Información recopilada de Domínguez (1998), Villar del Fresno Angel (1999)

3.6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.6.1. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO

Para esta determinación se utilizó como agente inflamatorio aceite de crotón.

FUNDAMENTO

El método de edema auricular descrito por De Young (1989) y modificado por Payá (1993), el edema auricular se basa en la aplicación de 12 – O-Tetradecanoil Forbol – 13 – acetato (TPA), que se extraen del aceite de crotón (*Croton tiglium* L.) el TPA es el más potente de todos, este posee propiedades irritantes, pro-inflamatorias y promotora de tumores. La aplicación del TPA desencadena todos los eventos propios del proceso inflama-torio: vasodilatación y eritema entre 1-2 horas, extravasación y edema entre 3-4 horas.

A nivel histológico, se produce: agregación plaquetaria, agregación y adherencia de compuestos polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos), migración a la dermis y desgranulación de mastocitos con lo cual también interviene la histamina (mediador inflamatorio). También, se observa la acumulación y migración de leucocitos al compartimiento subcorneal epitelial, particularmente alrededor de los folículos que degenera en la formación de abscesos subcorneales. A partir de 24 h aparece incremento de mitosis en la membrana basal epidérmica, lo que conlleva hiperplasia y engrosamiento epidérmico aparente.

A nivel bioquímico, en minutos y hasta varias horas después, se elevan el adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y las PGs E1, E2 y F2. La síntesis proteica del ácido ribonucleico (RNA) y del ácido desoxiribonucleico (DNA) empieza a ser significativa a las 12h y llega al máximo entre 48h. La actividad del TPA parece implicar o ser independiente de la liberación y metabolismo del ácido araquidónico, lo que puede ocurrir simultáneamente con o casualmente subsecuente a la interacción del TPA con un receptor de la proteinquinasa C (PKC) estimulándola de modo análogo al diacilglicerol, su agonista natural. (12)(41)

La determinación del efecto antiinflamatorio del extracto seco etanólico se realizará, provocando la inflamación con aceite de croton en el pabellón auricular de ratón.

❖ PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA ORAL Y VÍA TÓPICA

1. Se utilizaron 55 ratones albinos aproximadamente de 27 g de peso, suministrados por el Instituto Nacional de Salud (INS), los cuales se mantuvieron en cuarentena durante 7 días con suministro de agua y alimentos a libre demanda .
2. Para la evaluación del efecto antiinflamatorio vía oral se procedió a administrar por medio de una sonda orogastrica con suero fisiológico los controles, con indometacina los patrones y el extracto de *Acmella*

oleracea (L.) R.K. Jansen, a dosis de 300 mg/Kg, 600 mg/Kg, 900mg/Kg y 1200 mg/Kg. El suero fisiológico y el extracto se administraron en un volumen de 0.4 ml por animal de igual manera se hizo con la indometacina los cuales previamente fueron disueltos en suero fisiológico.

3. Para el caso de la determinación del efecto antiinflamatorio por la vía tópica, se aplicaron por medio de una micropipeta, en oreja derecha el extracto (0.5 mg/Oreja, 2.5 mg/Oreja y 5 mg/Oreja) disueltas en etanol al 95% por ser el extracto totalmente soluble en ella en un volumen de 20 μ l, distribuido 10 μ l en la superficie interna y 10 μ l en la superficie externa de modo que quedó repartido lo más homogéneo posible. Para el patrón se utilizaron cápsulas de Indometacina(1mg/Oreja) disuelta en suero fisiológico la cual se aplicó en un volumen de 20 μ l y a los controles se les aplicaron 20 μ l de suero fisiológico.
4. Después de 30 minutos en caso de la administración vía. En caso de la muestra aplicada por vía tópica, se esperó solo 5 minutos.
5. Transcurrido el tiempo se procedió a administrar 20 μ l de aceite de crotón al 5% en acetona; 10 μ l en cada superficie interna y externa de la oreja derecha (oreja tratada) de todos los animales.
6. Se administró tópicamente el solvente acetona 20 μ l (10 μ l en cada superficie) en la oreja izquierda (oreja no tratada) con el fin de que esta oreja sea el control de cada animal.
7. Transcurridas cuatro horas desde la administración del agente irritante (aceite de crotón), tiempo en la que se dan los eventos propios del proceso inflamatorio entre ellas el edema; se procedió a sacrificar los animales por dislocación cervical.
8. Se tomaron secciones circulares de 6mm diámetro con la ayuda de un

sacabocados de ambas orejas (tratada y no tratada).

9. Inmediatamente se pesaron en una balanza analítica las secciones circulares de ambas orejas (tratada y no tratada).
10. Con los pesos obtenidos se determinó el edema por diferencia de peso de la oreja tratada y no tratada y posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de inflamación o inhibición de edema.

Cuadro 3.5. Distribución de grupos para la Evaluación del Efecto Antiinflamatorio vía oral

Sustancia	Número de animales	Dosis
Dosis muy baja de EEAO*	5	300 mg/Kg
Dosis baja de EEAO*	5	600 mg/Kg
Dosis intermedia de EEAO*	5	900 mg/Kg
Dosis alta de EEAO*	5	1200 mg/Kg
Patrón (Indometacina)	5	7 mg/Kg
Control(Suero Fisiológico)	5	0,4 ml

Fuente: Elaboración propia

EEAO*: Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (Botoncillo)

Cuadro 3.6. Distribución de grupos para la Evaluación del Efecto Antiinflamatorio vía tópica

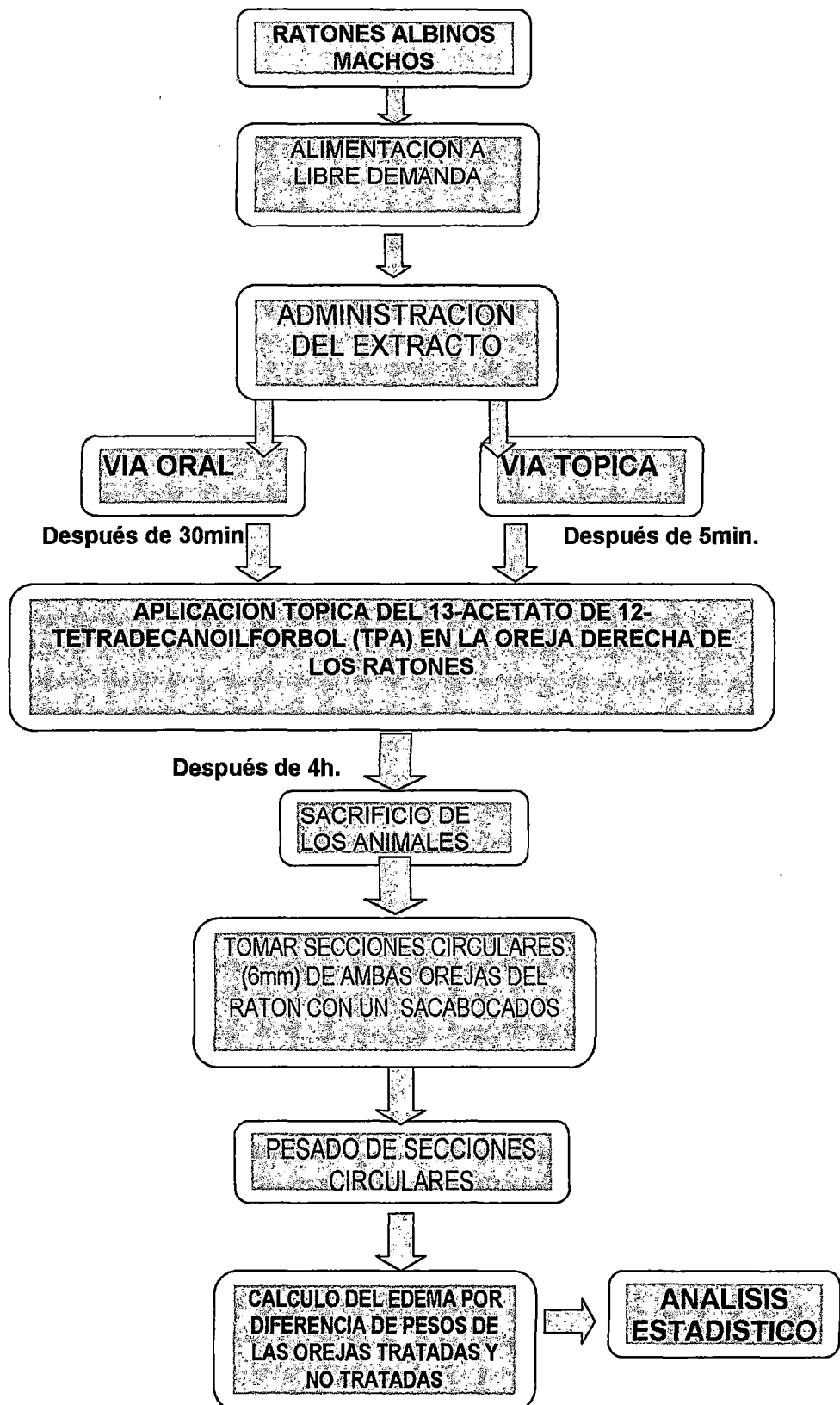
Sustancia	Número de animales	Dosis
Dosis baja de EEAO*	5	0.5 mg/Oreja
Dosis intermedia de EEAO*	5	2.5 mg/Oreja
Dosis alta de EEAO*	5	5 mg/Oreja
Patrón (Indometacina)	5	1 mg/Oreja
Control(Suero Fisiológico)	5	20 µl

Fuente: Elaboración propia

EEAO*: Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (Botoncillo)

FLUJOGRAMA 3.2

METODOLOGÍA PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO EN RATONES ALBINOS



Fuente: Elaboración propia

❖ EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Para la valoración de los resultados, se tomaron en cuenta el peso de las secciones circulares de las orejas de cada ratón tratada y no tratada.

El edema se expresó como la diferencia de las secciones de la oreja (tratada y no tratada) según la siguiente fórmula:

Ecuación 3:
$$Edema = Pt - Pnt$$

Donde:

Pt: peso en miligramos de la sección circular de la oreja tratada

Pnt: peso de la sección circular de la oreja no tratada.

Para determinar el porcentaje de inhibición de inflamación se utilizó la siguiente expresión:

Ecuación 4:
$$\%Inhibición = \frac{(Pt - Pnt)C - (Pt - Pnt)T}{(Pt - Pnt)C} \times 100$$

Donde:

(Pt - Pnt)C : Valor medio del edema obtenido de los animales del grupo control.

(Pt - Pnt)T : Valor medio del edema obtenido de los animales del grupo problema y patrón. (12,41)

3.6.2. PRUEBA DE TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL

En los ensayos de toxicidad aguda se determinó la sintomatología consiguiente a la administración del extracto en cuestión y su grado de letalidad. El procedimiento inicial consistió en la investigación de una serie de rangos de dosis del extracto en una especie animal.

Protocolo Experimental

Para la determinación de toxicidad aguda oral se empleó ratones albinos machos albinos raza *Mus musculus*, clínicamente sanos procedentes de un bioterio que garantice estas características.

Los animales fueron identificados mediante fichas en sus jaulas, donde se registró el número de grupo, peso inicial, fecha de administración, datos experimentales. Se conformaron 4 grupos experimentales cada uno de los cuales estuvieron en ayuno 24 horas antes de la administración del extracto.

Cada grupo estuvo conformado por tres ratones albinos machos de 27g a 30g de peso.

Posteriormente se procedió al cálculo de la dosis de forma individual para cada animal. Extracto etanólico seco fue disuelto en suero fisiológico y administrado en dosis única mediante cánula orogástrica en un volumen máximo de 0.4 ml.

Los ratones albinos fueron observados constantemente durante las 24 horas, en el cual se examinaron ojos, piel, mucosas y se tuvo en cuenta otros signos como piloerección, somnolencia, diarrea, dolor abdominal a la palpación, presencia de temblores y se valoraron aspectos del comportamiento tales como: irritabilidad, agresividad, intranquilidad, y depresión severa.

En la segunda fase se utilizó un ratón por grupo a los cuales se les administro dosis de 1600mg/kg, 2900 mg/kg y 5000 mg/kg los cuales también fueron observados durante 24 horas, durante el cual se examinaron los aspectos antes mencionados.

FASE I: los tres grupos del pre prueba estuvieron formados por 3 animales de experimentación según la tabla del método de Lorke.

FASE II. Los resultados de la primera fase fueron utilizados para determinar las nuevas dosis en el segundo test en el cada grupo que estuvo formado por un único ratón.

Cuadro 3.7. Toxicidad Aguda Fase I y II

FASES	GRUPO	Nº DE ANIMALES	DOSIS mg/kg
I	1	3	control
	2	3	10 mg /Kg
	3	3	100 mg /Kg
	4	3	1000mg /Kg
II	1	1	control
	2	1	1600mg/kg
	3	1	2900 mg/kg
	4	1	5000 mg/kg

Fuente: Elaboración propia

3.7. TECNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOPIACIÓN DE DATOS

El instrumento utilizado para la recopilación de datos fueron las fichas estructuradas de recolección de datos que se muestran en los anexos:

Anexo 4: Determinación del efecto antiinflamatorio vía oral

Anexo 5: Determinación del efecto antiinflamatorio vía tópica

Anexo 6: Determinación porcentaje de inhibición de inflamación

Anexo 7: Toxicidad aguda fase I

Anexo 8: Características a observarse en la determinación de la toxicidad aguda

3.8. PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos obtenidos en la evaluación del efecto antiinflamatorio fueron procesados en una base de datos creada en el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 17. Utilizando las pruebas estadísticas de ANOVA (análisis de varianza) y prueba Duncan (de comparaciones múltiples). Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES

4.1.1. HUMEDAD

Cuadro 4.1. Porcentaje de Humedad de las Partes Aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

Muestras	Nº de determinaciones		
	1	2	3
Peso de muestra fresca(M1)(g)	5	5	5
Peso de muestra seca(M2) (g)	0.926	0.931	0.947
Porcentaje promedio de humedad	81.31%		

Fuente: Datos experimentales

4.1.2. DE LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA PARTES AÉREAS DE *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (Botoncillo).

Cuadro 4.2. Porcentaje de extracción

PESO INICIAL	PESO FINAL	% DE EXTRACCIÓN ETANÓLICA
0.2500 g	36.5932 g	14.63%

Fuente: Datos experimentales

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.1 se observa que se hicieron tres determinaciones para la obtención del porcentaje de humedad en la que se determinó un valor de 81.31% este resultado indica que la planta estudiada tiene un alto porcentaje de humedad. Según(Villar D.,1999); las plantas contienen diversos tipos de enzimas como las hidrolasas, oxidasas, polimerasas, etc.; las cuales dan lugar a diferentes reacciones enzimáticas y si la planta es insuficientemente deshidratada, provocará consecuencias perjudiciales tanto

para el aspecto, características organolépticas, contenido de los principios activos y por consiguiente en la actividad terapéutica. Además que la alta humedad favorece al desarrollo de los microorganismos y la fermentación durante la conservación. El porcentaje de humedad fue un dato importante el cual hizo que se tuviera las consideraciones pertinentes en la conservación de la planta y del extracto.

En el cuadro 4.2, nos muestra el porcentaje de extracción obtenida al realizar la extracción etanólica de la especie vegetal *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo); que fue del 14.63%. Este dato permitió determinar la cantidad de muestra vegetal que se requiere para la realización de los diferentes ensayos del trabajo de investigación además nos da información que permite saber si la planta es una buena materia prima o no para obtener productos a gran escala.

4.1.3. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Cuadro 4.3. Pruebas de Solubilidad

SOLVENTE	Extracto seco de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)
Agua destilada	++
Metanol	+++
Etanol 40%	-
Etanol 70%	++
Etanol 95%	+++
Acetona	+
Acido acético	+++
Éter etílico	+++
Cloroformo	+
Bencina	-
Hexano	-

Fuente: Datos experimentales

○ **Leyenda:**

+++ : Totalmente soluble
 ++ : Parcialmente soluble

+ : Muy poco soluble
 - : Insoluble

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en el cuadro 4.3, el extracto de la parte aérea de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) obtenido por la maceración con etanol al 70% muestra buena solubilidad con solventes de mediana polaridad y parcialmente solubles con solventes muy polares.

Según estos resultados el extracto de la parte aérea de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) presenta naturaleza regularmente polar.

4.1.4. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Cuadro 4.4. Resultados del Análisis Fitoquímico Cualitativo del Extracto Etanólico seco de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	RESULTADOS
AZÚCARES REDUCTORES	Lieberman-Burchart	+++
ALCALOIDES	Dragendorff	+
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	+++
COMPUESTOS FENÓLICOS	Cloruro férrico	+++
QUINONAS	Borntranger	-
SAPONINAS	Espuma	+
TANINOS	gelatina	+

Fuente: Datos experimentales

Legenda:

+++ : Abundante cantidad

++ : Moderada cantidad

+ : Escasa cantidad

- : Ausencia

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.4 se observa el análisis fitoquímico cualitativo del extracto seco etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen en los cuales se utilizaron los reactivos para la determinación de los metabolitos secundarios obteniéndose en algunas pruebas coloraciones específicas y en otras reacciones de precipitación.

Encontrándose abundante cantidad de azúcares reductores, compuestos fenólicos y flavonoides; respecto a los alcaloides, saponinas y taninos escasa cantidad; en cuanto a quinonas ausencia.

La actividad antiinflamatoria es una de las acciones más importantes de los ácidos fenólicos, en cuanto a los flavonoides la acción antiinflamatoria que poseen se relaciona en parte con su interacción con diversas enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico; además pueden inhibir la liberación de histamina, la inhibición de la migración celular y contribuir al efecto protector vascular por el cual se disminuye la exudación (Villar D. F., 1999).

4.2. DE LA TOXICIDAD AGUDA POR EL MÉTODO DE LORKE

Cuadro 4.5. Resultados de la Fase I del ensayo de la Toxicidad Aguda Vía Oral del Extracto Etanólico seco de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

GRUPO	DOSIS (mg/Kg)	Nº Ratones	Nº Ratones Muertos desde los 5 minutos hasta el día 14	OBSERVACIONES	
				Sintomatología	Aspectos del comportamiento
1	CONTROL	3	0	Piloerección: 0 Somnolencia: 0 Diarrea: 0 Dolor abdominal: 0 Temblores:	Irritabilidad: 0 Agresividad: 0 Intranquilidad:1 Depresión : 0
2	10	3	0	Piloerección: 0 Somnolencia: 0 Diarrea: 0 Dolor abdominal: 0 Temblores: 0	Irritabilidad: 0 Agresividad: 0 Intranquilidad:1 Depresión : 1
3	100	3	0	Piloerección: 0 Somnolencia: 0 Diarrea: 0 Dolor abdominal: 0 Temblores: 0	Irritabilidad: 0 Agresividad: 0 Intranquilidad:1 Depresión : 1
4	1000	3	0	Piloerección: 0 Somnolencia: 0 Diarrea: 0 Dolor abdominal: 0 Temblores: 0	Irritabilidad: 0 Agresividad: 0 Intranquilidad:1 Depresión: 1

Fuente: Datos experimentales

Leyenda de las observaciones:

- 0. Nada
- 1. Ligera
- 2. Moderada
- 3. Severa
- 4. Muy severa

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.5, muestra los resultados de la fase I del ensayo de la toxicidad aguda vía oral del extracto etanólico seco de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen en ratones albinos sometidos a dosis crecientes siguiendo el método de Lorke, en la que observa que la sustancia no es tóxica debido a que de un grupo de 9 ratones a las 24 horas ninguno muere a las dosis utilizadas lo cual indicaría que estas dosis pueden ser empleadas para la investigación. Así mismo se observa que a las dosis empleadas no se presentaron síntomas de piloerección, somnolencia, diarrea, dolor abdominal ni temblores; pero respecto a los aspectos del comportamiento se observó una ligera intranquilidad en los grupos: control, extracto (10, 100, 1000 mg/Kg), respuesta propia de los animales frente a la manipulación. Los grupos tratados con el extracto presentaron una ligera depresión después de ser administrados con el extracto pero minutos más tarde tuvieron un comportamiento aparentemente normal. No se encontró referencias de estudios de toxicidad de la especie en estudio.

Cuadro 4.6. Resultados de la Fase II de la Toxicidad Aguda Vía Oral del Extracto Etanólico seco de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

GRUPO	DOSIS (mg/Kg)	Nº Ratones	Nº Ratones Muertos	OBSERVACIONES	
				Sintomatología	Aspectos del comportamiento
1	Control	1	0	Piloerección: 0 Somnolencia: 0 Diarrea: 0 Dolor abdominal: 0 Temblores:	Irritabilidad: 0 Agresividad: 0 Intranquilidad: 1 Depresión: 0
2	1600	1	0	Piloerección: 0 Somnolencia: 0 Diarrea: 0 Dolor abdominal: 0 Temblores: 0	Irritabilidad: 0 Agresividad: 0 Intranquilidad: 1 Depresión : 1
3	2900	1	0	Piloerección: 0 Somnolencia: 0 Diarrea: 0 Dolor abdominal: 0 Temblores: 0	Irritabilidad: 0 Agresividad: 0 Intranquilidad: 2 Depresión : 2
4	5000	1	1	Piloerección: 0 Somnolencia: 0 Diarrea: 0 Dolor abdominal: 0 Temblores: 3	Irritabilidad: 0 Agresividad: 1 Intranquilidad: 1 Depresión : 0

Fuente: Elaboración propia

Leyenda de las observaciones:

0. Nada
1. Ligera
2. Moderada
3. Severa
4. Muy severa

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.6, presenta los resultados de la determinación de toxicidad aguda fase II por vía oral en ratones al administrar dosis crecientes del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen según el método de Lorke, se observa que la sustancia es poco tóxica ya que se requiere de una dosis de 5000 mg/Kg de peso para que un ratón muera a los 5 minutos después de la administración el cual sobreviene con aspectos del comportamiento con una ligera agresividad e intranquilidad que luego en pocos segundos pasa a temblor severo y finalmente las convulsiones que terminó con la muerte del animal ; lo cual nos indica que esta planta tiene compuestos tóxicos que podrían afectar el sistema nervioso. Así mismo se aprecia que a la dosis de 2900 mg/Kg de peso el animal de experimentación presenta en un inicio intranquilidad moderada y minutos más tarde presentó una depresión moderada. En cuanto a la dosis de 1600 mg/Kg el ratón tuvo un comportamiento de ligera intranquilidad paso a una ligera depresión posiblemente debido a la manipulación del animal de experimentación, que después pasaron a tener un comportamiento aparentemente normal. Entonces la dosis de 5000 mg/Kg de peso es un límite para la utilización en la investigación. Ospina D., et al., 1987; realizan un estudio farmacológico de la especie vegetal *Acmella americana* en donde reportan al realizar la determinación de la toxicidad aguda vía intraperitoneal del compuesto puro (isobutilamida) obtenido de la planta a la dosis de 140mg/Kg de peso desencadenó después de cinco minutos una reacción tóxica principalmente en el sistema nervioso central, caracterizada por un estado convulsivo por aproximadamente diez minutos, observándose paro respiratorio y finalmente la muerte de los animales de experimentación. Entonces se podría asumir que la planta posee compuestos tóxicos presentes en el extracto.

Cuadro 4.7. Dosis Letal Media (DL50) del Extracto Etanólico seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen Administrado Vía Oral en ratones albinos

DOSIS mg/Kg	PROPORCION DE MUERTES	DL50 HASTA LOS 5 MINUTOS (mg/Kg)
2900	0/1	3800
5000	1/1	

Fuente: Datos experimentales

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.7 se observa que la dosis letal media (DL50) es de 3800 mg/Kg de peso. El resultado de la DL50 obtenido nos indica que se requiere una dosis de 3800 mg/Kg para ocasionar la muerte del 50% de animales de experimentación. Existe un antecedente sobre la especie *Acmella americana* en la que contiene un compuesto denominado isobutilamida en la que reportan los investigadores realizando la toxicidad aguda por vía intraperitoneal en ratones albinos encontrando una dosis letal media de 128mg/Kg (Ospina D., et al., 1987).

4.3. DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA ORAL

Cuadro 4.8. Efecto de Diferentes Dosis del Extracto Etanólico Seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen Administrado Vía Oral sobre el Edema Auricular inducido por TPA (13-acetato de 12-terradecanoilforbol)

GRUPO	DOSIS	Nº Ratones	Peso oreja tratada [Pt] (mg)	Peso oreja no tratada [Pnt] (mg)	EDEMA [Pt - Pnt] (mg)
1	300 mg/Kg	R1	17.3	9.5	7.8
		R2	16.5	9	7.5
		R3	17	8.6	8.4
		R4	18.5	8.4	10.1
		R5	17.4	7.9	9.5
2	600 mg/Kg	R1	16.2	9.6	6.6
		R2	17.5	7.2	10.3
		R3	15.8	8.3	7.5
		R4	14.9	9.7	5.2
		R5	16	8.5	7.5
3	900 mg/Kg	R1	15.8	9.5	6.3
		R2	16.3	8.1	8.2
		R3	14.5	9	5.5
		R4	14.7	9.5	5.2
		R5	16.3	9.3	7
4	1200 mg/Kg	R1	14.6	9.2	5.4
		R2	14.2	8.9	5.3
		R3	13.4	8	5.4
		R4	13.8	9.7	4.1
		R5	14.1	8.5	5.6
5	Indometacina 7mg/Kg	R1	13.7	9.8	3.9
		R2	15	9.1	5.9
		R3	14.1	8.7	5.4
		R4	13.8	9.5	4.3
		R5	12.9	9	3.9
6	Suero fisiológico	R1	19.1	8.5	10.6
		R2	17.3	9.2	8.1
		R3	22	9	13
		R4	18.5	9.6	8.9
		R5	17.9	8.8	9.1

Fuente: Elaboración propia

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.8, muestra los resultados del efecto de los tratamientos sobre el edema auricular inducido por TPA (13- acetato de 12- tetradecanoilforbol). Para obtener el edema se realizaron diferencias de la oreja tratada (oreja derecha) menos la oreja no tratada (oreja no tratada). Se puede observar que hay diferencias en los pesos de las orejas tratadas en la que se evidencia la acción irritante del TPA que provoca el edema agudo al aumentar la permeabilidad vascular y la infiltración leucocitaria y con los tratamientos utilizados se observa una variación en el resultado del edema como en el caso de los extractos y el grupo patrón (indometacina) que influyeron en la reducción del peso del edema en relación al grupo control.

4.3.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA ORAL

Cuadro 4.9. Resultados Descriptivos del Efecto Antiinflamatorio Vía Oral de Diferentes Dosis del Extracto Etanólico Seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

Dosis	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite Inferior	Límite Superior		
300 mg/Kg	5	8.660	1.110	0.497	7.281	10.039	7.500	10.100
600 mg/Kg	5	7.420	1.865	0.834	5.105	9.735	5.200	10.300
900 mg/Kg	5	6.440	1.210	0.541	4.938	7.942	5.200	8.200
1200 mg/Kg	5	5.160	0.602	0.269	4.412	5.908	4.100	5.600
Indometacina 7mg/Kg	5	4.680	0.918	0.410	3.541	5.819	3.900	5.900
Control	5	9.940	1.935	0.865	7.538	12.342	8.100	13.000
Total	30	7.050	2.257	0.412	6.207	7.893	3.900	13.000

Fuente: Datos experimentales

N: Número de repeticiones por cada tratamiento.

Media: Promedio de las diferencias de peso de las secciones circulares de la oreja (tratada y no tratada) y este valor representa el edema.

Cuadro 4.10. Análisis de Varianza (ANOVA) para el Efecto Antiinflamatorio Vía Oral del Extracto Etanólico 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	103.2	5	20.642	11.137	0.000
Intra-grupos	44.48	24	1.854		
Total	147.7	29			

Fuente: Datos experimentales.

Sig.: Nivel de significancia ($p < 0.05$) ANOVA estadísticamente significativo frente al control.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.9, muestra los resultados descriptivos para el edema ocasionado por el TPA (13- acetato de 12- tetradecanoilforbol), compuesto irritante del aceite de crotón después de 4 horas y la variación del promedio del edema en relación a los tratamientos (extracto, patrón, control). En el grupo control se puede observar que el grupo control muestra un elevado promedio de edema de 9.940 mg valor que indica el efecto edematoso del TPA; que comparando con los valores obtenidos con el efecto del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen a la dosis de 300 mg/Kg de peso muestra una ligera disminución en el promedio con 8.660 mg de edema, y si se incrementa la dosis a 600 mg/Kg de extracto se obtiene un promedio aun menor respecto a la anterior con 7.420 mg de edema, si se utiliza una dosis intermedia de 900 mg/Kg se aprecia que disminuye un poco mas el promedio de edema a 6.440 mg; pero al ser tratada con una dosis alta (1200 mg/Kg) de extracto se obtiene una mayor disminución del edema promedio a 5.160 mg pero no mayor en comparación con el peso de 4.680 mg de edema promedio del grupo patrón(indometacina). Si comparamos con el grupo control se observa que hay una reducción del promedio de edema de los grupos tratados con el extracto y el fármaco patrón.

El extracto de etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen(Botoncillo), a las dosis empleadas presentaron propiedades antiinflamatorias ya que

redujeron el edema auricular inducido por TPA en relación al grupo control, además el extracto presenta una respuesta dosis- dependiente ya que al incrementarse la concentración el extracto disminuye de mejor manera el edema.

En el cuadro 4.10, se tiene los resultados del análisis de varianza en cuanto al efecto del extracto etanólico 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, patrón (indometacina) y control (suero fisiológico) sobre el edema producido por el TPA al cabo se 4 horas.

El cuadro muestra un valor de $p = 0.000$ que es un valor de $p < 0.05$, lo cual indica que es menor la probabilidad de que las medias de los grupos tratados sean iguales. Entonces hace referencia de que los promedios de edema obtenidos para cada grupo son significativamente diferentes ya que cada dosis (300 mg/Kg, 600 mg/Kg, 900 mg/Kg, 1200 mg/Kg) de extracto etanólico 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo), presentan un efecto antiinflamatorio diferente al reducir el edema auricular inducido en la oreja tratada (oreja derecha) de los ratones albinos.

Cuadro 4.11. Comparaciones Múltiples de Duncan para el Efecto Antiinflamatorio Extracto Etanólico seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen Administrado Vía Oral

DOSIS	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
Indometacina 7m/Kg	5	4.680			
1200 mg/Kg	5	5.160			
900 mg/Kg	5	6.440	6.440		
600 mg/Kg	5		7.420	7.420	
300 mg/Kg	5			8.660	8.660
Suero Fisiológico	5				9.94
Sig.		0.064	0.266	0.163	0.150

Fuente: Datos experimentales

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.11, se muestra las comparaciones múltiples de Duncan, método de comparaciones por pasos basado en la distribución de T student, donde se aprecia que los grupos de tratamiento con el extracto (900 mg/Kg, 1200mg/Kg) y el grupo patrón están agrupados en un mismo subconjunto y tienen un valor de significancia de 0.064 resultado mayor a lo aceptado para que sea un valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Entonces lo que se deduce que utilizando los tratamientos mencionados se obtienen resultados iguales en la reducción del edema promedio ocasionado por TPA. De igual manera se aprecia en los subconjuntos 2 y 3; pero en el subconjunto 4 están agrupados la dosis de extracto (300 mg/Kg) y el grupo control por lo que podemos decir que a la dosis muy baja de extracto etanólico al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) no se obtuvo un efecto antiinflamatorio bueno ya que no redujo de mejor manera el edema auricular.

Cuadro 4.12. Porcentaje de Inhibición de Inflamación del Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen Aplicado Vía Oral

GRUPOS	DOSIS mg/Kg	EDEMA	PORCENTAJE DE INHIBICION DE INFLAMACION (%)
Dosis muy baja EEAO*	300 mg/Kg	8.660±0.497	12.877
Dosis baja EEAO*	600 mg/Kg	7.420±0.834	25.351
Dosis intermedia EEAO*	900 mg/Kg	6.440±0.541	35.211
Dosis alta EEAO*	1200 mg/Kg	5.160±0.269	48.088
Indometacina	7 mg/Kg	4.680±0.410	52.918
Control	0.4 ml	9.940±0.865	-

Fuente: Datos experimentales

*EEAO: Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

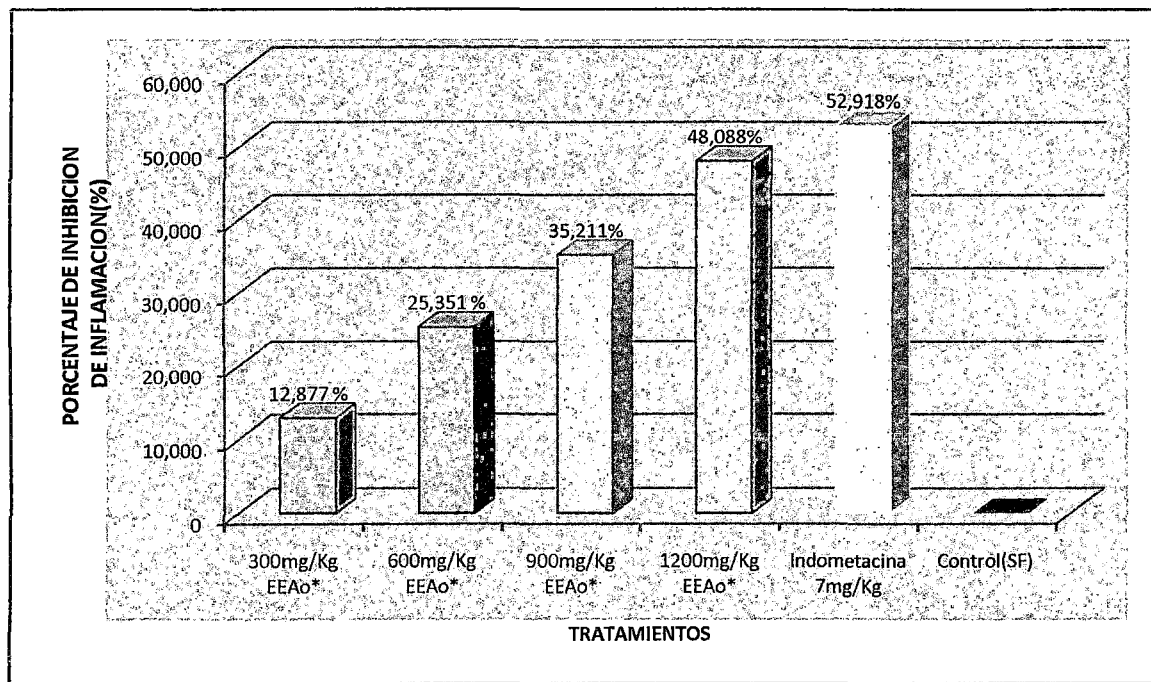
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.12, muestra los porcentajes de inhibición presentados tras la administración oral del extracto de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen a dosis

conocidas en las que reduce significativamente el edema auricular inducido por TPA con porcentajes de inhibición dosis dependiente. El grupo tratado con la dosis alta (1200mg/Kg) del extracto mostró efecto antiinflamatorio con una inhibición del 48.088%; cercana a la presentada por el fármaco patrón (indometacina) con un 52.918% de inhibición. Los resultados presentados por las dosis crecientes del extracto se deberían a que en la administración vía oral intervienen factores que condicionan la absorción intestinal como son la liposolubilidad , el pH del medio , grado de ionización , además en la administración vía oral se produce el fenómeno de primer paso (Armijo J. A., 2005) en la cual puede haber una absorción incompleta ya que los componentes presentes en el extracto pudieran haber sido metabolizados o destruidos antes de llegar a la circulación sistémica. Según la composición química de la planta en la que indican la presencia de alcanoides, flavonoides los cuales pudieran ser en parte responsables de la acción antiinflamatoria. (Voto J., 1994; Agapito F., 2004; De Araujo M., 2009).

Al comparar con otros estudios utilizando el mismo método de edema auricular inducido por TPA para determinar el efecto antiinflamatorio; como los realizados por Núñez Y., et al., 2007, reportan para el polvo seco de *Caléndula officinalis* administrado vía oral porcentajes de inhibición de inflamación de 15.82%, 39.92%, 49.50% para las dosis de 50, 150 y 450 mg/Kg respectivamente y Huamani R., 2010; en su trabajo de tesis reporta para el extracto seco hidroalcoholico al 70% de *Brassica rapa subsp. Campestris* (L.) claphan (Nabo silvestre) administrados vía oral porcentajes de inhibición de 57.06%, 75.88%, 79.41% para las dosis de 1, 10 y 100 mg/Kg respectivamente. Los resultados presentados para las especies mencionadas nos indican que cada especie vegetal tiene una composición de principios activos, metabolitos secundarios en concentraciones diferentes y además el solvente utilizado para la obtención del extracto es muy importante ya que algunos principios activos pueden ser solubles en solventes polares o apolares.

Gráfico 4.1. Porcentaje de Inhibición de Inflamación en relación a las Dosis administradas del Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen Aplicado Vía Oral



Fuente: Elaboración propia

*EEAo: Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el gráfico 4.1, se aprecia los porcentajes de inhibición de inflamación del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen a las dosis de 300mg/Kg, 600mg/Kg, 600mg/Kg y 1200mg/Kg, en las cuales podemos observar que la inhibición aumenta cuando la dosis de extracto de la especie vegetal es incrementada. Franco L. A., et al., 2007, indican que todos los agentes antiinflamatorios presentan actividad principalmente los inhibidores de la cicloxigenasa/lipoxigenasa, aunque los inhibidores de cicloxigenasa son más efectivos que los inhibidores de la lipoxigenasa para inhibir las respuestas edematosas del (TPA). Entonces se podría pensar que el extracto de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen puede tener un comportamiento similar a los inhibidores de la cicloxigenasa en el modelo de inflamación investigado.

4.4. DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA A TÓPICA

Cuadro 4.13. Efecto de diferentes dosis del Extracto Etanólico seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen administrado vía tópica sobre el edema auricular inducido por TPA

GRUPO	DOSIS	Nº Ratones	Peso oreja tratada [Pt] (mg)	Peso oreja no tratada [Pnt] (mg)	EDEMA [Pt - Pnt] (mg)
1	0.5 mg/oreja	R1	14.4	8.5	5.9
		R2	16.9	6.8	10.1
		R3	17.9	8.4	9.5
		R4	16.5	7.2	9.3
		R5	15	9.2	5.8
2	2.5mg/oreja	R1	14.2	8.8	5.4
		R2	14.4	6.8	7.6
		R3	13.1	8.7	4.4
		R4	14.9	8.1	6.8
		R5	13.8	8.5	5.3
3	5 mg/oreja	R1	12.2	9	3.2
		R2	10.9	8.3	2.6
		R3	12.7	8.7	4
		R4	11	8.5	2.5
		R5	11.6	9.9	1.7
4	Indometacina 1 mg/oreja	R1	12	8.6	3.4
		R2	12.5	8	4.5
		R3	11.7	9	2.7
		R4	12.8	7	5.8
		R5	12.2	8.9	3.3
5	Suero fisiológico (20µl/Oreja)	R1	17.7	8.5	9.2
		R2	19.4	9.5	9.9
		R3	18.3	7.8	10.5
		R4	18.1	8.4	9.7
		R5	15.1	6.6	8.5

Fuente: Elaboración propia

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.13, muestra los pesos de las orejas tratadas y no tratadas con los cuales se obtuvo los valores de edema con la aplicación del agente irritante TPA (13 - acetato de 12 - tetradeceoilforbol) después de 4 horas. Se puede observar que hay aumento del peso de las orejas tratadas (oreja derecha) las cuales varían de acuerdo al tratamiento (extracto, patrón, control) recibido.

El efecto del extracto etanólico seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, aplicado por vía tópica se evidencia cuando apreciamos los valores de edema (mg) las cuales están disminuidas en relación a las obtenidas por el grupo patrón.

4.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO VÍA TÓPICA

Cuadro 4.14. Resultados Descriptivos del edema ocasionado de diferentes dosis del extracto etanólico seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

DOSIS	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
0.5 mg/Oreja	5	8.120	2.093	0.936	5.521	10.719	5.800	10.100
2.5 mg/ Oreja	5	5.900	1.281	0.573	4.310	7.490	4.400	7.600
5 mg/ Oreja	5	2.800	0.857	0.383	1.735	3.865	1.700	4.000
Indometacina 1mg/Oreja	5	3.940	1.226	0.548	2.418	5.462	2.700	5.800
Suero fisiológico (20µl/Oreja)	5	9.560	0.754	0.337	8.624	10.496	8.500	10.500
Total	25	6.064	2.840	0.568	4.892	7.236	1.700	10.500

Fuente: Datos experimentales

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.14, muestra los resultados descriptivos del edema auricular inducido por TPA por vía tópica después de 4 horas. El grupo control muestra un elevado promedio de 9.560 mg de edema este valor indica que hubo la producción de inflamación a causa del agente irritante provocando los eventos

propios del proceso inflamatorio como vasodilatación, eritema, edema al incrementar la permeabilidad vascular en la oreja tratada de los ratones albinos. El grupo aplicado con el extracto vía tópica a la dosis de 0.5 mg/Oreja muestra una ligera disminución del edema con un promedio de 8.120 mg respecto a lo obtenido por el grupo control; con la dosis de extracto de 2.5 mg/Oreja muestra una mayor disminución del promedio con 5.900 mg de edema y con la dosis de 5 mg/Oreja se observa que la disminución del edema es de 2.800 mg de promedio incluso mayor a la obtenida por el grupo patrón con un promedio de 3.940 mg de edema.

De acuerdo a estos resultados se deduce que las dosis (0.5 mg/Oreja, 2.5mg/Oreja ,5mg/Oreja) de extracto disminuyen el edema auricular provocado por TPA de manera dosis- dependiente, ya que al incrementar las los principios activos responsables de la acción antiinflamatoria.

Cuadro 4.15. Análisis de Varianza (ANOVA) para el Efecto Antiinflamatorio del Extracto Etanólico seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen tras la administración Vía Tópica

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	158.2056	4	39.551	22.401	0.000
Intra-grupos	35.312	20	1.766		
Total	193.5176	24			

Fuente: Datos experimentales

Sig.: Nivel de significancia ($p < 0.05$) ANOVA estadísticamente significativo frente al control.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.15, se tiene los resultados del Análisis de Varianza con un nivel de confianza del 95% para ver si las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen aplicado vía tópica difieren en el efecto antiinflamatorio al reducir el edema auricular inducido por TPA (13-acetato de 12- tetradecanoilforbol) a las 4 horas. Como se puede observar se obtuvo una significancia de 0.000 que es estadísticamente significativo porque $p < 0.05$, lo que indica que hay diferencias significativas en el efecto

antiinflamatorio que tiene cada grupo a concentraciones diferentes, por lo que el extracto a las dosis (0.5 mg/Oreja, 2.5mg/Oreja ,5mg/Oreja) tienen diferencias en la reducción del edema auricular inducido por TPA.

Cuadro 4.16. Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan para edema producido tras la administración del Extracto Etanólico seco al 70% de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

Dosis	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
5mg/oreja	5	2.800		
Indometacina 1mg/oreja	5	3.940		
2.5.mg/oreja	5		5.900	
0.5 mg/oreja	5			8.120
Suero fisiológico	5			9.560
Sig.		0.190	1.000	0.102

Fuente: Datos experimentales

Sig.: Nivel de significancia ($p < 0.05$)

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.16, se observa las comparaciones múltiples de Duncan, método que permite corroborar que los promedios de los edemas producidos son significativamente diferentes. En el primer subconjunto se encuentra el extracto a una dosis de 5mg/oreja y el fármaco patrón Indometacina; en la que se observa una significancia de 0.190 que es un valor mayor a $p < 0.05$ lo cual nos indica que se obtiene el mismo efecto al utilizar las dosis mencionadas ya que no hay diferencias significativas entre ellas, de igual manera ocurre en los subconjuntos 2 y 3 que en cada uno ellos tampoco hay diferencias significativas y como están agrupadas en un mismo subconjunto se obtienen los mismos efecto antiinflamatorios.

Por lo tanto, se concluye que no existe una diferencia significativa en los subconjuntos en el efecto antiinflamatorio, de acuerdo a las diferentes dosis del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen aplicado vía tópica.

Cuadro 4.17. Porcentaje de Inhibición de Inflamación del Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) Aplicado Vía Tópica

DOSIS	DOSIS mg/Oreja	EDEMA(mg)	PORCENTAJE DE INHIBICION DE INFLAMACION (%)
Dosis baja EEAo*	0.5 mg/Oreja	8.120±0.936	15.063
Dosis intermedia EEAo*	2.5 mg/Oreja	5.900±0.573	38.284
Dosis alta EEAo*	5 mg/Oreja	2.800±0.383	70.711
Indometacina	1 mg/Oreja	3.940±0.548	58.787
Control(Suero fisiológico)	20µl	9.560±0.337	-

Fuente: Datos experimentales

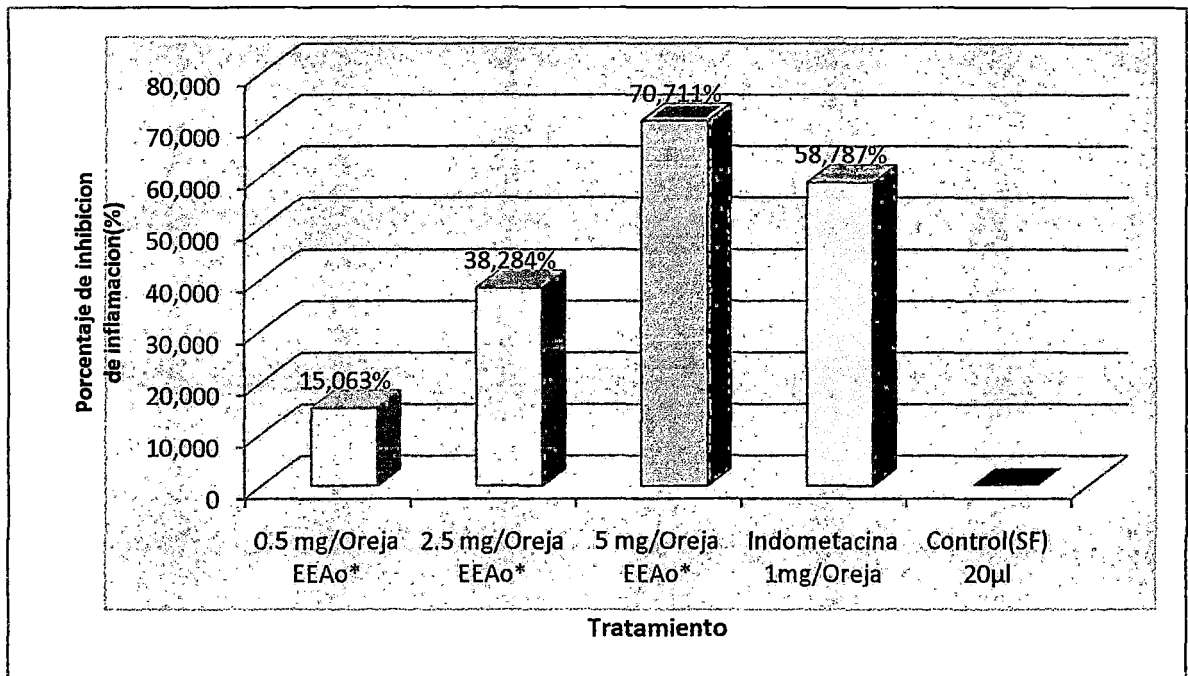
* EEAo: Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El cuadro 4.17 muestra los porcentajes de inhibición obtenidos tras la administración tópica de dosis crecientes del extracto etanólico que reducen el edema auricular inducido por el TPA (aceite de crotón) con porcentajes de inhibición dosis dependiente. La dosis alta (5mg/oreja) mostró potente efecto antiinflamatorio con una inhibición de 70.711% superior a la presentada por el fármaco patrón (Indometacina) con un 58.787% de inhibición. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos indicar que la vía de administración de una droga es importante ya que condiciona su biodisponibilidad. Para que una droga tenga una buena absorción tópica debe poseer cierta liposolubilidad para poder atravesar la epidermis y cumplir el efecto terapéutico deseado. En la vía de administración tópica se evita el efecto de primer paso hepático y las fluctuaciones de las concentraciones plasmáticas; además que se permite

rápidamente la absorción de los compuestos y es más rápida cuando la piel es delgada. (36). Por otra parte según las pruebas de solubilidad del extracto etanólico tiene un polaridad mediana la cual indicaría una buena absorción tópica de los componentes presentes en el extracto.

Gráfico 4.2. Porcentaje de Inhibición de Inflamación en Relación a las dosis Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) Aplicado Vía Tópica



Fuente: Elaboración propia

*EEAo: Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Como se observa en el gráfico 4.2 las concentraciones utilizadas hacen un efecto inhibitorio de inflamación dependiente de la dosis; en tanto que la dosis mayor de extracto supera en la inhibición de inflamación a la del grupo patrón. Según Keipert R., Melzig. M., 2009, realizan un estudio enzimático de la actividad inhibidora de elastasa de neutrófilos humanos reportan que las variedades *Acmella ciliata* (H.B.K) Cassini y *Acmella oleracea* evidenciaron actividad inhibidora de la elastasa (enzima implicada en la inflamación aguda)

una endopeptidasa presente en los granulocitos neutrófilos, en los que el extracto de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen obteniendo con el extracto de acetona y diclorometano una inhibición de elastasa hasta del 90% en comparación de con la especie *Acmella ciliata* que obtuvo un porcentaje de inhibición del 60%.

Cuadro 4.18. Resultados de la Comparación de las Vías de Administración Oral y Tópica Utilizadas para la Determinación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

Tratamientos	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
VIA ORAL 1200mg/Kg	5	5.160	0.602	0.269	4.412	5.908	4.100	5.600
VIA TÓPICA 5 mg/oreja	5	2.800	0.857	0.383	1.735	3.865	1.700	4.000
VIA ORAL GRUPO PATRÓN	5	4.680	0.918	0.410	3.541	5.819	3.900	5.900
VIA TOPICA GRUPO PATRÓN	5	3.940	1.226	0.548	2.418	5.462	2.700	5.800
Total	20	4.145	1.248	0.279	3.561	4.729	1.700	5.900

Fuente: Datos experimentales

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.18, podemos observar que la dosis de 0.5 mg/oreja del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) aplicado *vía tópica* obtuvo un mayor efecto antiinflamatorio, obteniendo un edema mínima promedio de 2.80mg, en comparación con la 1200m/Kg. del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen aplicado *vía oral*, cabe recalcar que la dosis de 5mg/oreja del extracto de Botoncillo aplicado *vía tópica* supera el efecto antiinflamatorio del fármaco Indometacina aplicado *vía oral y tópica*.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados del análisis estadístico podemos concluir que el extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) por *vía tópica* tiene un mejor efecto antiinflamatorio que aplicado *vía oral*.

Cuadro 4.19. Análisis de Varianza (ANOVA) para las Vías de Administración Oral y Tópica Utilizadas para la Determinación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	15.8375	3	5.279	6.133	0.006
Intra-grupos	13.772	16	0.861		
Total	29.6095	19			

Fuente: Datos experimentales

Sig.: Nivel de significancia ($p < 0.05$)

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.19 se tiene los resultados del Análisis de Varianza, con un nivel de confianza del 95% para ver si la aplicación *oral* o *tópica* del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) difieren en el efecto antiinflamatorio.

El cuadro ANOVA nos proporciona el valor estadístico **F=6.133**, el cual aparece acompañado de su correspondiente nivel crítico o nivel de significación observado **Sig.=0,006**. Puesto que el valor del estadístico F (6.133) es mayor que 1 con un nivel crítico asociado (0,006) menor que 0.05, por lo cual podemos afirmar que existe una diferencia altamente significativa en el efecto antiinflamatorio, debido al modo de aplicación del extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo).

Cuadro 4.20. Comparaciones múltiples de Duncan para las Vías de Administración Oral y Tópica Utilizadas para la Determinación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)

TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
VIA TÓPICA (5mg/oreja)	5	2.800	
VIA TOPICA (Indometacina)	5	3.940	3.940
VIA ORAL (Indometacina)	5		4.680
VIA ORAL (1200mg/Kg)	5		5.160
Sig.		0.070	0.065

Fuente: Datos experimentales

Sig.: Nivel de significancia ($p < 0.05$)

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 4.20 según la prueba del rango múltiple de Duncan, que es una prueba posterior al ANOVA, en la que podemos observar que no existen diferencias significativas en el primer subconjunto que agrupa la dosis 5mg/Kg aplicado por vía tópica y el fármaco indometacina (grupo patrón) son los que disminuyeron mejor el edema de la oreja de los ratones.

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados del análisis estadístico podemos concluir que el extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) aplicado por vía tópica es más efectivo que aplicado por vía oral presentando mejor efecto antiinflamatorio, e incluso superando en el efecto antiinflamatorio del fármaco Indometacina (grupo patrón) aplicado tanto por vía oral y tópica.

CONCLUSIONES

Del trabajo de investigación realizado con el extracto etanólico de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) y toxicidad aguda en ratones albinos se concluye.

1. Se determinó el efecto antiinflamatorio experimentalmente del extracto etanólico de las partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) en ratones albinos.
2. Se obtuvo el extracto etanólico seco al 70%, se determinó el porcentaje de humedad de 81.63% para las partes aéreas *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo); se obtuvo el extracto etanólico seco de la parte aérea de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo); hallando un porcentaje de rendimiento del 14.63%; en las pruebas de solubilidad fue totalmente soluble en agua alcohol al 95%, ácido acético, éter etílico el extracto presentó naturaleza medianamente polar y en el análisis fitoquímico cualitativo abundante cantidad ácidos fenólicos flavonoides y azúcares reductores.
3. En los ensayos de toxicidad aguda vía oral se determinó una DL50 de 3800 mg/Kg de peso utilizando el Método de Lorke.
4. El extracto etanólico seco al 70% de la especie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) posee propiedades antiinflamatorias que estadísticamente son significativos para el ANOVA tanto para la vía oral y vía tópica en el edema auricular inducido por TPA(13-acetato de 12- tetradecanoilforbol) en ratones albinos cepa Balb/c/CNPB, donde se obtuvieron una Sig.=0.000 para ambas vías de administración, resultados que confirman el efecto antiinflamatorio de la especie.

5. El extracto etanólico seco al 70% de la especie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo), aplicado por vía oral mostró porcentajes de inhibición de la inflamación de 35.211%, 48.088% para las dosis de 900mg/Kg, 1200 mg/Kg respectivamente.
6. El extracto etanólico seco al 70% de la especie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo), aplicado por vía tópica mostró porcentajes de inhibición de la inflamación de 38.284%, 70.711% para las dosis de 2.5mg/Oreja, 5 mg/Oreja respectivamente.
7. Al realizar la comparación del efecto antiinflamatorio de las vías de administración utilizadas, la vía tópica presentó mayor porcentaje de inhibición de la inflamación de 70.711% con una dosis de 5 mg/Oreja y la vía oral con una dosis alta (1200 mg/Kg) mostró un porcentaje de inhibición de la inflamación de 48.088%.

RECOMENDACIONES

1. A las autoridades

- Fomentar la investigación, premiando los trabajos más resaltantes realizados en cada carrera profesional de la universidad.
- Buscar convenios con instituciones ONGS, dedicados a la investigación de plantas medicinales, que den un mayor respaldo en la ejecución de proyectos.
- Implementar y ampliar el laboratorio de farmacología experimental para el desarrollo adecuado de los trabajos de investigación en plantas medicinales y otros.
- Facilitar y propiciar documentación referida a permisos y uso de materiales de laboratorio de otras facultades.

2. A los docentes

- Incentivar a la realización de trabajos de investigación.
- Apoyar en los trabajos de investigación que requieran su orientación y consejería.

3. A los estudiantes

- Continuar los estudios de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) demostrando otros efectos atribuidos en la medicina tradicional.
- Realizar los estudios fitoquímicos de fraccionamiento para los diferentes metabolitos secundarios (principios activos) *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo) y evaluar el efecto antiinflamatorio de las fracciones.
- Realizar el efecto antiinflamatorio por separado de los tallos, hojas y flores para evaluar cual de ellos tiene mayor efecto antiinflamatorio.
- Continuar con el estudio de las diferentes plantas investigadas a fin de incrementar el conocimiento acerca de ellas, evaluando los diversos usos medicinales tradicionales y de esta manera poder dar una validación del empleo terapéutico de estas.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGAPITO F.TEODORO; SUNG ISABEL DE AGAPITO. Fitomedicina Tomo. Editorial Isabel. Lima. Perú.2004
2. ALDAVE PAJARES AUGUSTO, MOSTACERO LEON JOSÉ. Botánica Farmacéutica. Editorial Libertad.1ª Edición. Perú.1988
3. ANDERSON, W. Y SCOTTI, T. Anatomía Patológica Básica. Novena edición. Ediciones Toray, S.A. Barcelona-España.1989
4. ANGUIANO RUEDA CRISTINO. Diccionario de Ciencias Médicas. Novena edición. Editorial El Ateneo.Argentina.1992
5. APAZA AMACHI GIOVANA. Tesis. Efecto Antiinflamatorio de *Cestrum conglomeratum* R&P(Ñucáu).Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional San Antonio Abad Cusco.2003
6. BRAIER, L. Diccionario Enciclopédico de Medicina Jims. Cuarta Edición.Barcelona .España.1980
7. CARBALLO, M.A; CORTADA, C.M. Y GADANO A.B. Riesgo y beneficios en el consumo de de plantas medicinales Univ. De Buenos Aires, CIGETOX: citogenética humana y genética toxicológica .Departamento de bioquímica Clínica .Facultad de farmacia y bioquímica .Argentina.2005
8. CASTAÑEDA, C.B.; MANRIQUE M.R.; IBÁÑEZ V.L.; GAMARRA, C.F.; GALAN, L.D.; QUISPE, H.P. Evaluación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Acuoso de las Semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi, Chocho), en Animales de Experimentación. Lima Peru.UNMSM.2006
9. CONTRERAS RAÚL. Anatomía, Patológica General. Editorial Interamericana.Mexico.1989
- 10.CONTRERAS SANTOS FREDDY O, BLANCO GARCIA MARIO R. Fisiopatología. Editorial Mc Graw Hill .Venezuela.1997
- 11.COTILLO P. ROJAS L. Métodos Farmacológicos en la Investigación de Productos Vegetales. Primera edición , Lima- Peru.1990
- 12.CYTED. Programa Iberoamericana de Ciencia y Tecnología para el desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación.1995
- 13.CHOYILLAS T., Inflamación aguda y crónica., En Patología Estructural y Funcional,C. Ranz. , Mc Grawn - Hill. México. 2000

14. DE LA FUENTE GABRIELA. Fisiopatología de la inflamación. Revista Médica. España. 2004
15. DIDIER LACAZE, MIGUEL ALEXIADES .Salud Para Todos. Plantas Medicinales y Salud Indígena en la Cuenca del Rio de Madre de Dios. Perú. 1995
16. ESPINO CHOQUE ELIZABETH PRESCILA. Tesis. Efecto Gastroprotector y Toxicidad Aguda del Extracto Seco Hidroalcohólico al 70% de *Trixis divaricata* (H.B.K) Sprangel "Hank'u - chuta" en animales de experimentación. Carrera Profesional Farmacia y Bioquímica. UNSAAC. 2009
17. GOODMAN GILMAN ALFRED; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Editorial Mc Graw Hill. México. 10ª Edición. 2003
18. HUAMANI ALONSO ROXANA. Efecto Antiinflamatorio y toxicidad aguda del Extracto Hidroalcohólico seco de *Brassica rapa subsp. Campestris* (L.) claphan (Nabo silvestre) en animales de experimentación. Tesis para Optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico. UNSAAC. 2010
19. ISAZA, M. Fundamentos de Farmacología en terapéutica. Tercera edición. Editorial Postergraph. Medellín-Colombia. 1997
20. LITTER MANUEL. Farmacología Experimental y Clínica. 7ª Edición .1988
21. LOOMIS T., Fundamentos de Toxicología .España. Editorial Acribia .1984
22. LORKE DIETRICH. Toxicology Institut fair Toxikologie, Bayer AG, Friedrich-Ebert-Strasse 217, D-5600 Wuppertal, Federal Republic of Germany. 1983
23. OSPINA DE NIGRINIS LUZ STELLA, OLARTE JORGE, NUÑEZ OLARTE ENRIQUE. Estudio fitofarmacológico de la fracción liposoluble de las flores de *Acmella americana*. Revista Colombiana de Ciencias Farmacéuticas. Colombia. 1987
24. ROBBINS SANTANLEY, COTRAN RAMZI, KUMAR VINAY. Patología Estructural y Funcional. 5ª edición. Editorial medica panamericana. España. 1997
25. SALCEDO ALFREDO. Química. Editorial "San Marcos". Perú. 1995
26. VELAZQUEZ P. LORENZO. Farmacología básica y clínica .17ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid España. 2004

27. VILLAR DEL FRESNO ANGEL .Farmacognosia General .Editorial Síntesis.España.1999
28. VILLENA TEJADA MAGALY.EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y TOXICIDAD AGUDA DE *Gamochaeta americana* (Miller) Weddell "Q'eto – Q'eto". Tesis para optar el grado académico de Magister. UNSAAC. Cusco.2006
29. VOIGT, Re .Tratado de Tecnología Farmacéutica. Tercera edición. Editorial. Acribia. España. 1982
30. WELLER BARBARA F. Diccionario Enciclopédico de Ciencias de la Salud. Editorial Mc Graw- Hill.Interamericana.México.1997

PÁGINAS WEB

31. *Acmella oleracea* .Artículo. 2009
<http://www.medical-answers.org/hd/index.php?t=Acmella+oleracea>
32. *Acmella ciliata* . : Thailand: Khao Yai National Park, N of Nakhon Nayok.2008 ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2008/1/Bot491-11.pdf
33. AIZPURU ET AL. CARRETERO DEVESA.Herbario de la Universidad Pública de Navarra. 2004
<http://www.unavarra.es/servicio/herbario/html/Compositae.htm>
34. ARENCIBIA ARREBOLA DANIEL FRANCISCO, FERNÁNDEZ LUIS ALFREDO, LÓPEZ FERIA YULIEÉ, FARIÑAS MEDINA MILDREY, INFANTE BOURZAC JUAN FRANCISCO, DÍAZ RIVERO DAIYANA, PRIETO DÍAZ JORGE LUIS. Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda .Toxicología experimental. Revista de toxicología. Instituto Finlay. Cuba.2009
<http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>
35. ARMIJO J. A. Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. 2005.
[http://dspace.universia.net/bitstream/2024/480/3/CAP+4+\(47-72\).PDF](http://dspace.universia.net/bitstream/2024/480/3/CAP+4+(47-72).PDF)
36. BOSCH, C.H. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen. Grubben, G.J.H. Y Denton, O.A. Recursos Vegetales del África Tropical / Recursos Vegetales del África Tropical.2004
http://database.prota.org/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?AC=QBE_QUERY&BU=http://database.prota.org/sea

rch.htm&TN=PROTAB~1&QB0=AND&QF0=Species+Code&QI0=Acmella+oleracea&RF=Webdisplay

37. CARDOSO, MO; GARCIA, LC Jambu (*Spilanthus oleraceae* L.). (Hortaliças não-convencionais da Amazônia . PROYECTO: "NO extractivismo-MADERA Y EL DESARROLLO AMAZONIA SOSTENIBLE . Brasil.1997
http://translate.google.com.ar/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.naturalpedia.com/oleracea.html&ei=0G37TY-7KoyitgediJC8Dg&sa=X&oi=translate&ct=result&resnum=3&ved=0CCUQ7gEwAjgK&prev=/search%3Fq%3DAcmella%2Boleracea%2Bpropiedades%2Bmedicinales%26start%3D10%26hl%3Des%26lr%3D%26sa%3DN%26as_qdr%3Dall%26biw%3D1004%26bih%3D581%26prmd%3Divns
38. DE ARAUJO MARGARIDA MARIA. Estudio Etnobotánico das plantas utilizadas como Medicinaias no Assentamento Santo Antonio, Cajazeiras. Brasil.2009
http://www.ucf.edu.br/cstr/ppgcf/Dissertacoes/dissert_margarida.pdf
39. DELGADO SUMAR HUGO E., .En el Inventario de Recursos Curativos en Centros de Expendio Formales e Informales de Tumbes, denominado apuntes de Medicina Tradicional. Instituto Nacional de Medicina Tradicional. Perú.1990.
<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:2kiNrKTvhRIJ:www.docstoc.com/docs/74808296/AMT-78-Inventario-Recursos-Curativos-Tumbes+Acmella+oleracea+medicina+popular&cd=10&hl=es&ct=clnk&gl=ar&source=www.google.com.ar>
40. FLORA DEL PERÚ. Actualización de Datos.2005
http://www.minam.gob.pe/pdf/orden/Division_Magnolioplyta_clase_Magnoliopsida_O_Asterales.pdf
41. FRANCO LUIS A., MATIZ GERMAN E., CALLE JAIRO, PINZON ROBERTO, OSPINA LUIS F. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES OBTENIDAS DE CALICES DE *Physalis peruviana* L. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Cartagena .Colombia.2007
<http://www.biomedica.ins.col/pp.110.pdf>
42. GONZALES SIMÓN WENDELL ALDO, PALACIOS BERNUY MIGUEL ÁNGEL. Tesis. Estudio Farmacognóstico y actividad antiinflamatoria del

- fruto *Averrhoa carambola* L. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 2003
http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2003/gonzales_sw/html/sdx/gonzal.html
43. HOCSMAN M. E. MAGGI, S. M. PALACIOS, C. G. FERRAYOLI, L. PETRYMA, C. NÚÑEZ Y J. J. CANTERO. METABOLITOS SECUNDARIOS DE *ACMELLA DECUMBENS* CON ACTIVIDAD ANTIALIMENTARIA EN INSECTOS. CEPROCOR, Agencia Córdoba Ciencia, (5164) Santa María de Punilla, Córdoba, Argentina. 2000
www.idecefyn.com.ar/clf12002/archivos/070_FerrayoliCG_R.doc
44. KEIPERT RONALD UND MATTHIAS F. MELZIG. Análisis fitoquímico y enzimático de *Acmella ciliata*. Tesis para el grado académico de Doctor en Ciencias Naturales presentada en el Departamento de Biología, Química y Farmacia la Universidad Libre de Berlín Abstracts .Alemania. 2009
<http://www.phytotherapy.org/presse/abstracts1-2009.pdf>
45. KIMURA, MOTOKO; MORITA, YASUSHI; OGAWA, TAKAHIRO YTERAI, TADASHI. España. 2001
http://www.espatentes.com/pdf/2157949_t3.pdf
46. MOREIRA, VMT S, MALA, JG S, SOUZA, JM DE; ZUNER ASSIS; CAVALHEIRO, ESPER ABRAO. Caracterización de las convulsiones provocadas por un extracto hexánico de *Spilanthes Acmella var. Oleracea* en ratas. Brasil. 1989
<http://trigramas.bireme.br/cgi/bin/mx/cgi=@1?collection=LILACS.org.TiKwAb&maxrel=10&minsim=0.30&tex=Spilanthes%20oleracea>
47. NETO XAVIER, G.S; BRAGA, F.C.O; SILVA, R.M.G. Evaluación del potencial anestésico del extracto de *Acmella ciliata*, Asteraceae en cobayos albinos. Centro Universitario de Patos de Minas. Brasil. 2003
<http://www.plantasmedicinais.ufu.br/anais.html>
48. PLANTAS MEDICINALES PROMISORIAS DE LA AMAZONIA. 1994
<http://www.siamazonia.org.pe/archivos/publicaciones/amazonia/libros/28/28000007.htm#I28>
49. QUIJANDRIA ACOSTA GABRIEL, DUEÑAS CORRIDO GLORIA. En el proyecto "Estudio Etnobotánico en las cuencas Altas de los Ríos Tambopata Inambari". 2005
www.ibcperu.org/doc/isis/5931.pdf

50. REVILLA, J. Plantas da Amazônia: oportunidades Econômicas e Sustentáveis. Brasil. 2001
<http://translate.google.com.ar/translate?hl=es&sl=en&u=http://www.naturalpedia.com/oleracea.html>
51. RÍOS-CHÁVEZ P., CORTEZ-ESPINOSA N, RAMÍREZ-CHÁVEZ E. Y MOLINA-TORRES J. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. En el Estudio valina y fenilalanina como precursores de las alcaloides en la planta *Acmella radicans*. 2006
http://www.smb.org.mx/XXVIICONGRESO/Text/AREA-1/ORALES/1_A_2.pdf
52. ROMERO MOLINA ASUNCIÓN .Tesis Doctoral. Efecto de los Opioides sobre la Extravasación de Plasma en un Modelo de Inflamación Agudo PERIFÉRICO EN RATA. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 2003
http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1222103-162106//marm1de2.pdf
53. RUÍZ MONTENEGRO DIANA MARICELA .Tesis: Validación farmacológica de la actividad antiinflamatoria de las infusiones acuosas de las hojas de *Acalypha guatemalensis* (hierba del cáncer), *Solanum mammosum* (chichitas) y *Rauvolfia tetraphylla* L. (chalchupa). Guatemala. 2008
54. SÁNCHEZ DE LORENZO JOSE MANUEL .Colección de Plantas Interesantes. España. 2010
<http://www.arbolesornamentales.es/Acmella%oleracea.pdf>
55. SANTOS MENDES CAVALCANTI VANESSA. Extracción de spilanthol de *Spilanthes Acmella oleracea* var con dióxido de carbono supercrítico. Brasil. 2002
<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?view=vtls000442658>
56. SHAK S., Leukotriene B4 Catabolism: Quantitation of Leukotriene B4 and its w – Oxidation Products by Reversed- Phase High – Performance Liquid Chromatography en Cellular Regulators(Conn PM y Means AR) Academic Press Inc., Orlando. 1987
<http://www.bibliociencias.cu/gsdll/collet/libros/index/assoc/HASHO199.dir/doc.pdf>

57. SIÑANI CALISAYA GLADYS BRENDA. Determinación de la Actividad Antiinflamatoria e Interacción de Extractos de la Planta Kiswara (*Buddleja coriacea* Remy) con dexametasona, mediante los ensayos de edema plantar y auricular en modelo murino. Universidad Mayor de San Andres. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Bolivia. 2009
<http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/435/1/T652.pdf>
58. TOSO, R.E; TORIBIO, M.S.; MENGELLE, P.; BOERIS, M.A Plantas de la provincia de La Pampa, Argentina, con actividad gastroprotectora y antiespasmódica Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Pampa. 2007
<http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1668-34982007000100015&script=sciarttext>
59. VOTO BERNALES JORGE. Etnobotánica de la Amazonia Peruana. Lima. Perú. 1994
<http://repository.unm.edu/bitstream/handle/1928/11667/Etnobot%C3%A1nica%20de%20la%20amazon%C3%ADa%20peruana.pdf?sequence=1>
60. YUEQIN ZENG. Identificación y Actividad Farmacológica de Principios de Especies Antiinflamatorias. Tesis Doctoral Universidad de Valencia. España. 2007
http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX-0403108-115541//yueqin.pdf

ANEXOS

ANEXO 1

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- **APARTADO POSTAL**
N° 921 - Cusco - Perú
- **FAX:** 238156 - 238173 - 222512
- **RECTORADO**
Calle Tigre 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
- **MUSEO 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
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO CUZ

CERTIFICA

Que, la Bachiller: **NÚÑEZ GUTIÉRREZ, MARLENI**; con el expediente N° 102911, de la Carrera Profesional de **Farmacia y Bioquímica**, Facultad de Ciencias Químicas, Físicas, Matemáticas, Farmacia e Informática de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; ha presentado al Herbario 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 en comparación con las muestras existentes en el herbario de la que se desprende que el material analizado corresponde a la especie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen. Siendo su posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981)

Reino : Plantae
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Acmella*
Especie : *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen
N. vulgar : Botoncillo

Se le expide, el presente certificado de identificación de la especie para los fines que viera por conveniente

Cusco, 08 de febrero del 2011

Arch/HV CUZ



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

ANEXO 2



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

CERTIFICADO SANITARIO N° 126-2010

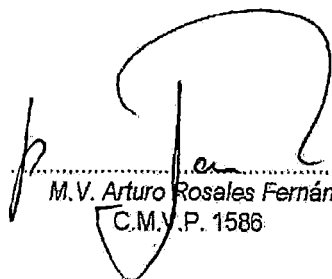
Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M- 22 - 2010
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 60
Cepa	: Balb/c/CNPB	Edad	: 1 mes ½ a 2 meses.
Peso	: Mayores a 25 gr.	Sexo	: Machos
B.V- N°	: 004-12665 G.R. 021577	Destino	: Marleni Nuñez Gutierrez Univ. San Antonio Abad - Cuzco
Fecha	: 27-05-10		

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, 27 de Mayo del 2010

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. 1586

ANEXO 3

PRUEBAS FITOQUIMICAS

REACCIONES DE RECONOCIMIENTO

ALCALOIDES: Para esta prueba se realizara una extracción acida con 0.5ml de extracto acidificado y filtrado con acido clorhídrico al 5%, el filtrado se trata con amoniaco hasta reacción alcalina, trasvasar a una pera de decantación y adicionarle cloroformo , decantar la fase clorofórmica y evaporar hasta sequedad , el residuo se disuelve con ácido clorhídrico al 5%.

A 0.5 ml de esta solución acida agregar 2 a 3 gotas de reactivo de Dragendorf. La presencia de un precipitado naranja a marrón, indica prueba positiva.

AZUCARES REDUCTORES: Se usa la prueba de Benedict, para lo cual se tomara un poco del extracto seco diluido en alcohol al 70%, de la disolución se tomara 0.5 ml y se agregara 0.2 ml de Benedict y se llevara a baño maría .La presencia de precipitado de color amarillo indicara prueba positiva.

FLAVONOIDES: De la dilución ya preparada tomo 0.5ml y se le agrega limaduras de magnesio metálico mas 2 a 3 gotas de acido clorhídrico concentrado. La presencia de coloraciones rojizas tendientes al amarillo o azuladas indica prueba positiva.

- ❖ Flavonoles: Rojo magenta.
- ❖ Glavanona : Rojo magenta , violeta, azul
- ❖ Isoflavonas: Amarillo

COMPUESTOS FENÓLICOS: De la dilución ya preparada se tomara 0.5ml y se le agregara 2 gotas cloruro férrico al 1%, la presencia de precipitaciones azuladas o verdosas indican prueba positiva para compuestos fenólicos.

LACTOSAS: prueba de Baljet, para ello se mezcla volúmenes iguales de acido pícrico al 1% en etanol e hidróxido de potasio al 10%.De esta mezcla se toma de 2 a 3 gotas para poner en contacto con extracto, la presencia de una coloración naranja o roja oscura es prueba positiva para lactosas.

QUINONAS: A 0.2 ml de la dilución se agrega 0.4 ml de ácido sulfúrico concentrado, las coloraciones rojizas indican prueba positiva.

SAPONINAS: Se realiza la prueba de espuma: se solubiliza el extracto en 5ml de etanol al 70%, una vez ya disuelto ya disuelto se agita por 30 segundos.

TANINOS: A 0.5 ml de la muestra se adiciona 3 gotas de cloruro férrico al 1%. La aparición de una coloración o precipitado indica prueba positiva. La coloración azul oscura indica presencia de taninos gálicos y una coloración verde indica la presencia de taninos catéquicos.

ANEXO 4

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO

ANTIINFLAMATORIO VIA ORAL

HORA DE ADMINISTRACION DE EXTRACTO:

HORA DE ADMINISTRACION DE AGENTE IRRITANTE (ACIETE DE CROTON):

GRUPO	DOSIS	N	PESO DE RATON (gramos)	peso oreja tratada (mg)	peso oreja no tratada (mg)	EDEMA(mg) (diferencia de peso de oreja tratada y no tratada)
1	300 mg/Kg	1				
		2				
		3				
		4				
		5				
2	600 mg/Kg	1				
		2				
		3				
		4				
		5				
3	900 mg/Kg	1				
		2				
		3				
		4				
		5				
4	1200 mg/Kg	1				
		2				
		3				
		4				
		5				
5	Indometacina 7m/Kg	1				
		2				
		3				
		4				
		5				
6	Suero fisiológico	1				
		2				
		3				
		4				
		5				

ANEXO 5

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA LA DETERMINACION DEL EFECTO

ANTIINFLAMATORIO VIA TOPICA

HORA DE ADMINISTRACION DE EXTRACTO:

HORA DE ADMINISTRACION DE AGENTE IRRITANTE (ACIETE DE CROTON):

GRUPO	DOSIS	N	peso oreja tratada (mg)	peso oreja no tratada (mg)	EDEMA(mg) (diferencia de peso de oreja tratada y no tratada)
1	0.5 mg/Oreja	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
2	2.5 mg/Oreja	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
3	5mg/Oreja	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
4	Indometacina 1mg/Oreja	1			
		2			
		3			
		4			
		5			
5	Suero fisiológico	1			
		2			
		3			
		4			
		5			

ANEXO 6

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA LA DETERMINACION PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN

VIA DE ADMINISTRACION:

DOSIS	EDEMA (mg)	PORCENTAJE DE INHIBICION DE INFLAMACION (%)
<p align="center">FORMULA</p> $\%Inhibición = \frac{(Pt - Pnt)C - (Pt - Pnt)T}{(Pt - Pnt)C} \times 100$		

Donde:

$(Pt - Pnt)C$: Valor medio del edema obtenido de los animales del grupo control

$(Pt - Pnt)T$: Valor medio del edema obtenido de los animales del grupo problema y patrón

ANEXO 7

FICHA PARA LA RECOLECCION DE DATOS PARA LA TOXICIDAD AGUDA FASE I

GRUPO	DOSIS (mg/Kg)	Nº RATONES	PESO (g)	MUERTE								
				5min	10min	15min	30min	1h	2h	12h	24h	Hasta día 14
1	CONTROL	1										
		2										
		3										
2	10	1										
		2										
		3										
3	100	1										
		2										
		3										
4	1000	1										
		2										
		3										

ANEXO 8

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LAS CARACTERISTICAS A OBSERVARSE EN LA DETERMINACION DE LA TOXICIDAD AGUDA

GRUPO:

DOSIS:

OBSERVACIONES	TIEMPO							
	5min	10min	15min	30min	1h	2h	12h	24h
SINTOMATOLOGIA								
Piloerección								
Somnolencia								
Diarrea								
Dolor abdominal								
Temblores								
ASPECTOS DEL COMPORTAMIENTO								
Irritabilidad								
Agresividad								
Intranquilidad								
Depresión								

Legenda de las observaciones:

0. Nada
1. Ligera
2. Moderada
3. Severa
4. Muy severa

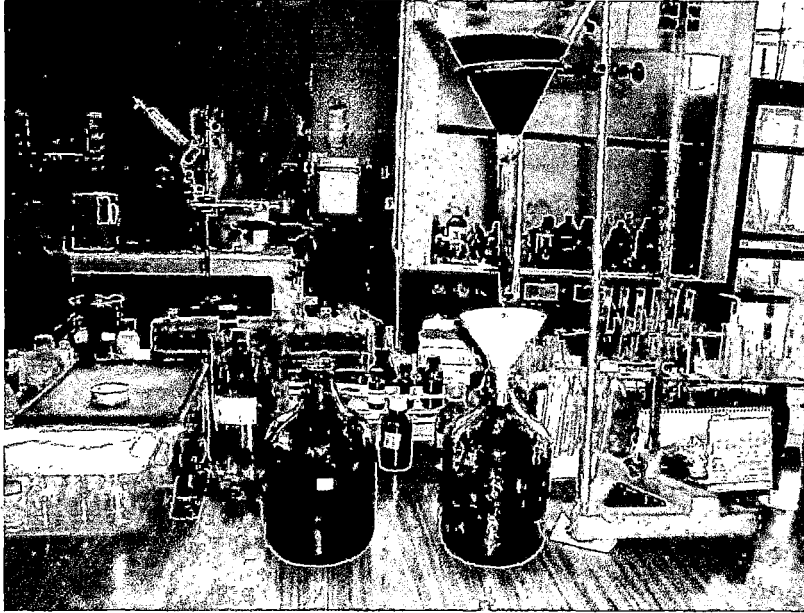
FOTOGRAFÍAS



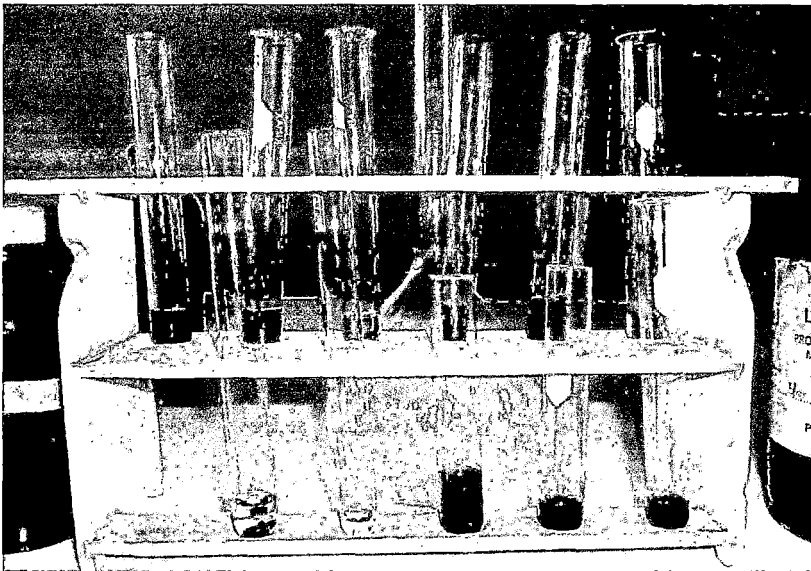
Fotografía N°1: *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo), en su hábitat natural en la localidad de Idma-Esmeralda. Distrito Santa Ana- Quillabamba - Cusco.
Fuente: M.N.G.2010



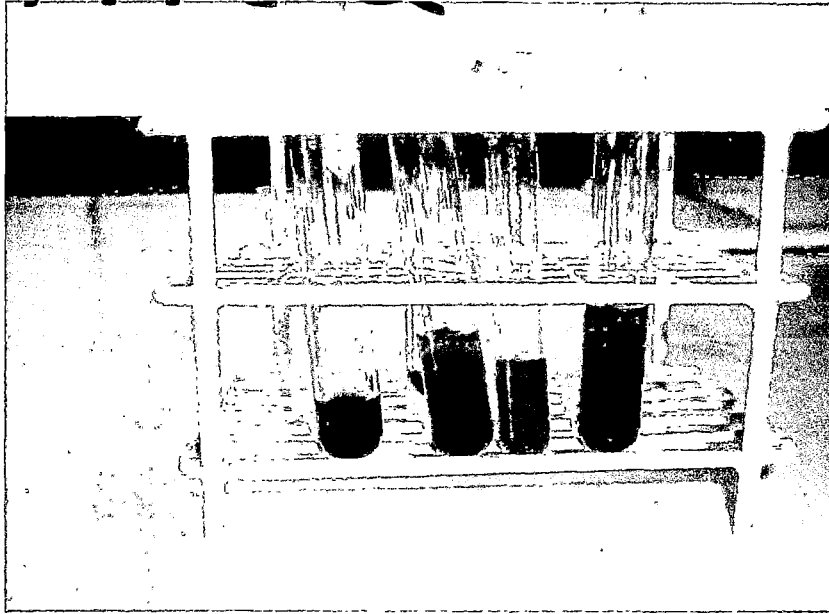
Fotografía N°2: Proceso de secado de las partes aéreas seleccionadas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)
Fuente: M.N.G.2010



Fotografía N° 3: Proceso de filtrado de las partes aéreas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Botoncillo)
Fuente: M.N.G.2010



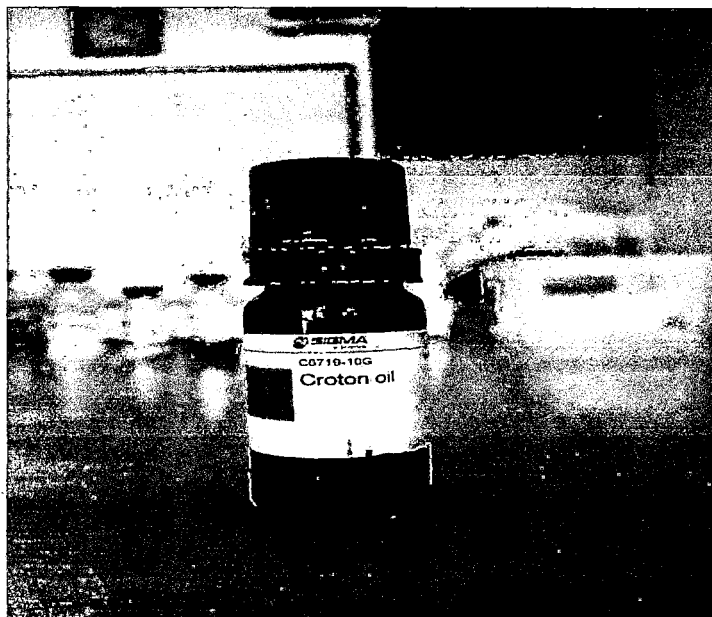
Fotografía N°4: Determinación de la solubilidad con los solventes de polaridad variada.
Fuente: M.N.G



Fotografía N°5: Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios de extracto etanólico de *Acmella ciliata* "Botoncillo"
Fuente: M.N.G



Fotografía N°6: Materiales de laboratorio, escritorio y otros para la determinación del efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de Botoncillo.
Fuente: M.N.G



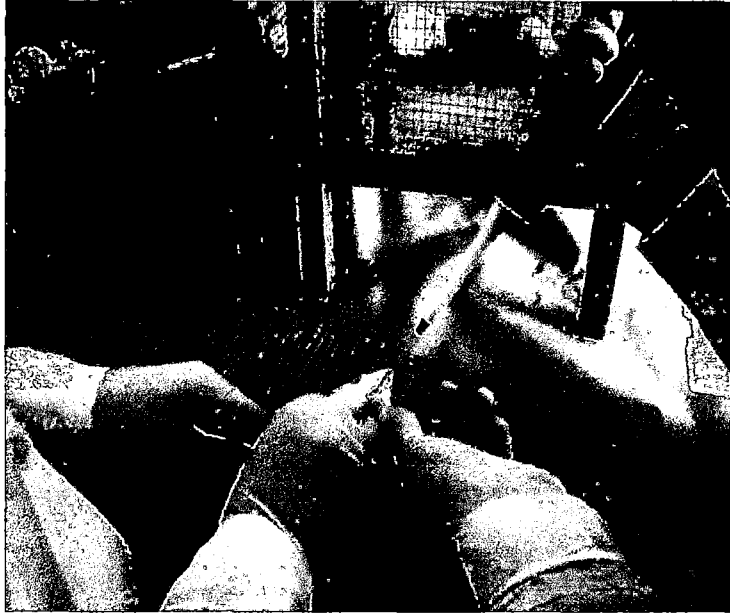
Fotografía N° 7: Aceite de croton adquirido del laboratorio Química Service del Perú.

Fuente: M.N.G



Fotografía N° 8: Administración oral por medio de una sonda orogástrica del extracto etanólico de Botoncillo al animal de experimentación.

Fuente: M.N.G



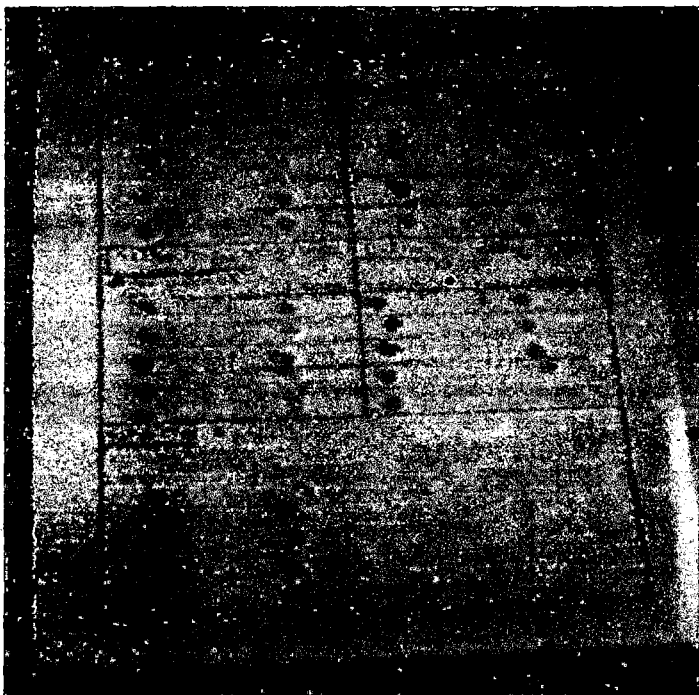
Fotografía N° 9: Administración tópica por medio de una micropipeta el extracto etanólico de Botoncillo. Fuente: M.N.G



Fotografía N° 10: Perforación de la oreja del ratón con un sacabocados de 6mm de diámetro. Fuente: M.N.G



Fotografía N° 11: Pesado de los diámetros de las orejas obtenidos para su posterior cálculo del edema ocasionado y posterior cálculo del porcentaje de inhibición de la inflamación y análisis estadístico.
Fuente: M.N.G



Fotografía N° 12: Diámetros de las orejas de los ratones utilizados para la experimentación del efecto antiinflamatorio por la vía tópica.
Fuente: M.N.G