

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL  
CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA Y  
ANTIINFLAMATORIA DE UNA CREMA ELABORADA A  
BASE DE ACEITE ESENCIAL DE SCHINUS MOLLE  
“MOLLE” EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION.**

**Tesis presentada por:**

Br. Farfan Hanco Sulma Lucia Cornelia

Br. Huarhuachi Diaz Gimena

Para optar el título profesional de:

**Químico Farmacéutico**

Asesora: Dra. Carla del Carpio Jimenez

Co-Asesora: Q.F. Karina Vera Ferchau

Cusco – Perú

2019

## DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a Dios por guiarnos en todo momento, brindarnos sabiduría y fortaleza para superar los retos día a día.

Dedicada a mis padres Hermogenes Huarhuachi y Gladys Diaz por su esfuerzo para cuidar de mi como padre y madre, su infinito amor, comprensión, confianza y por enseñarme la actitud perseverante, gracias por todo.

A mis hermanos Deysi y José Manuel, por ser parte de mi vida, por sus palabras de aliento, sabios consejos y apoyo constante, gracias por estar siempre conmigo.

A mis amigos y amigas por brindarme su amistad y confianza en todos los momentos divertidos y difíciles. En especial a: Nayshia Santillan, Edward Román, Shauny Yancachajlla, Magaly Galindo.

**Gimena Huarhuachi Diaz**

Dedicada a mis padres Eulogio Farfan y Matilde Hanco quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, puntualidad, amor por la lectura y valentía.

A mis hermanos Oscar, Carlos y Alex por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a todas mis amigas, por apoyarme cuando más las necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día, de verdad mil gracias, siempre las llevo en mi corazón. En especial a Ruth Molleda, Yesica Huayta y Gianina Moron.

**Sulma Lucia Farfan Hanco**

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestra Alma Mater, la UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO por brindarnos la oportunidad de estudiar en sus aulas y pasar los más hermosos e inolvidables días de nuestras vidas.

Nuestro eterno agradecimiento a nuestra asesora de tesis, Dr. Carla del Carpio Jimenez y co-asesora de tesis Q.F. Karina Vera Ferchau por la confianza y amistad que depositaron desde la formación profesional, por habernos guiado en el mundo de la investigación. Esta tesis no hubiese sido posible sin sus conocimientos, su apoyo constante y su paciencia. Es todo un placer trabajar a vuestro lado.

A los integrantes del Jurado Evaluador, por sus atinadas sugerencias para enriquecer este trabajo y por la parte de valioso tiempo que destinaron a la revisión del mismo.

A todos mis docentes de la Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, gracias por sus conocimientos compartidos, su sabiduría académica y sus consejos.

En general, agradecer a todas aquellas personas que nos brindaron su ayuda y su apoyo invaluable para realizar esta tesis, tantos como a los que hemos citado y a los que no. Gracias por compartir con nosotras muchos momentos inolvidables y la satisfacción de cumplir nuestro objetivo.

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	xvii
CAPITULO I.....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
3. OBJETIVOS.....	3
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	4
4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.....	4
4.1 Conocimiento.....	4
4.2 Aplicabilidad Fitoterapeutica.....	5
4.3 Prioridad.....	6
4.4 Ámbito económico.....	7
4.5 Factibilidad.....	7
5. HIPOTESIS.....	7
GLOSARIO DE TERMINOS.....	8
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	10
CAPITULO II.....	11
2. MARCO TEORICO.....	12
2.1 ANTECEDENTES.....	12
2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	12
2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES.....	14
2.2. ESTADO DE LA CUESTION.....	15
2.3. BASES TEÓRICO- CIENTÍFICAS.....	16
2.3.1 DESCRIPCIÓN DE <i>Schinus molle</i> “molle”.....	16
2.3.1.1 Clasificación taxonómica.....	16
2.3.1.2 Sinonimia y nombre común.....	16
2.3.1.3 Características botánicas de <i>Schinus molle</i> “molle”.....	17
2.3.1.4 Ecología de la especie.....	17

2.3.1.5 Composición Fitoquímica.....	18
2.3.1.6 Dosis y usos según la Fitoterapia.....	24
2.4 ACEITE ESENCIAL.....	24
2.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	25
2.4.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DESTACABLES DE LOS ACEITES ESENCIALES .....	27
2.5. LOS FITOFÁRMACOS.....	27
2.5.1 EXIGENCIAS DE CALIDAD, SEGURIDAD Y EFICACIA .....	28
2.5.2 PASOS QUE LLEVAN A LA PRODUCCIÓN DE UN FITOFÁRMACO .....	28
2.6. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO .....	29
2.6.1 ASPECTOS ÉTICOS A CONSIDERAR PARA EL TRABAJO CON ANIMALES .....	29
2.6.1.1 Características de los animales de laboratorio .....	29
2.6.1. 2 Principios éticos específicos que aseguran el bienestar .....	30
2.6.1.3 Condiciones ambientales estandarizados y controlados para el mantenimiento de animales de experimentación (ratones) .....	30
2.6.1.4 Reglamento del comité Institucional de Bioética en Investigación de la Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco .....	31
2.6.1.4.1 FINALIDAD Art 4° .....	31
2.7. EL DOLOR.....	32
2.7.1 MECANISMO DEL DOLOR .....	32
2.7.2. TIPOS DE DOLOR .....	33
2.8. LA INFLAMACIÓN .....	34
2.8.1. DEFINICIÓN.....	34
2.8.2. ETIOLOGÍA .....	34
2.8.3. PROCESO INFLAMATORIO .....	34
2.8.4. MEDIADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA .....	35
2.8.5. BIOSÍNTESIS DE LOS MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN .....	36
2.9. ANALGESIA.....	38
2.9.1 TIPOS DE ANALGESIA.....	38

2.10. PIEL .....	39
2.10.1 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA PIEL .....	39
2.10.2 EPIDERMIS .....	40
2.10.3 DERMIS O CORION .....	40
2.10.4 FACTORES EN LA ABSORCIÓN CUTÁNEA .....	41
2.11. DERMATITIS.....	42
2.12. CARRAGENINAS.....	43
2.12.1. Propiedades de las carrageninas .....	43
2.13 CREMAS .....	44
2.13.1 CLASIFICACIÓN .....	44
2.14. FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS .....	45
2.14.1. LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs).....	45
2.14.1.1. Efecto analgésico.....	46
2.14.1.2. Efecto antipirético .....	46
2.14.1.3. Efecto sobre la función plaquetaria: .....	47
2.14.1.4. Efectos antiinflamatorios y antirreumáticos: .....	47
2.14.2. FÁRMACO PATRÓN .....	47
2.14.2.1. DICLOFENACO .....	47
CAPITULO III.....	49
3.1. MATERIALES Y METODOS .....	50
3.1.1. Material .....	50
3.2. DISEÑO METODOLOGICO .....	52
3.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	52
3.2.2. TIPO DE ESTUDIO .....	52
3.2.3. MUESTRA.....	55
3.2.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....	55
3.2.5. VARIABLES IMPLICADAS .....	56
3.2.5.1. VARIABLES NO IMPLICADAS .....	57
3.3. PROCEDIMIENTO.....	59

3.3.1. MÉTODO DE PLACA CALIENTE (HOT-PLATE).....	59
3.3.2. METODO DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA. DETERMINACION EFECTO ANTIINFLAMATORIO .....	61
3.3.3. ESTUDIOS PRELIMINARES.....	63
3.3.3.1. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	63
3.3.3.2. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE”..	63
3.3.3.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	65
3.3.3.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL ACEITE ESENCIAL .....	65
3.3.3.4.1. Preparación de la muestra .....	65
3.3.3.4.2. Densidad por el método picnométrico .....	65
3.3.3.4.3. Índice de refracción.....	66
3.3.3.4.4. Poder rotatorio .....	66
3.3.3.4.5. Solubilidad en etanol.....	66
3.3.3.4.7. Pruebas de solubilidad en Etanol a diferentes concentraciones .....	67
3.3.3.4.8. Solubilidad en solventes orgánicos .....	67
3.3.3.5 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA.....	67
3.3.3.5.1 DETERMINACION DE LOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE GASES .....	67
3.3.3.6. PRE FORMULACIÓN DE LA CREMA .....	69
3.3.3.7. CONTROL DE CALIDAD .....	72
3.3.3.8. ANÁLISIS DE DATOS.....	81
CAPITULO IV .....	86
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	87
4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS HOJAS DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	87
4.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	88
4.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL ACEITE ESENCIAL .....	89



4.3.1. DENSIDAD POR EL MÉTODO PICNÓMETRICO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	89
4.3.2. ÍNDICE DE REFRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	90
4.3.3. PODER ROTATORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE”	91
4.3.4. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	91
4.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	93
4.5 PREFORMULACIÓN Y ENSAYOS DE FORMULACIÓN .....	97
4.5.1. RESULTADOS DEL CONTROL FISICOQUÍMICO DE LA PREFORMULACIÓN Y ENSAYOS DE FORMULACIÓN .....	98
4.6. FORMULACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	100
4.6.1. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ORGANOLEPTICA DE LA CREMA ELABORADA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	102
4.6.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CREMA ELABORADA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	103
4.6.3. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA CREMA ELABORADA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	106
4.7 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO POR EL METODO DE HOT PLATE .....	107
4.7.1 PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA LA EVALUACION DEL EFECTO ANALGÉSICO DE LA CREMA ELABORADA CON ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	110
4.7.2 PORCENTAJE DE MAXIMO EFECTO POSIBLE (%MEP).....	115
4.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA CREMA CON ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” .....	118
4.8.1 PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA CREMA CON ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “MOLLE” A DIFERENTES CONCENTRACIONES .....	124
4.8.2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN INFLAMATORIA .....	128

BIBLIOGRAFÍA.....	134
ANEXOS.....	142
ARCHIVO FOTOGRÁFICO .....	178

## INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1. CLASIFICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES .....	26
TABLA N° 2. VARIABLES INTERVINIENTES DE LA PLANTA EN ESTUDIO .....	57
TABLA N° 3. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES .....	58
TABLA N° 4. PRUEBAS DE LA SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL A DIFERENTES CONCENTRACIONES .....	67
TABLA N° 5. LIMITES MICROBIANOS SEGÚN USP 37 .....	81
TABLA N° 6. PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS HOJAS DE <i>Schinus molle</i> "MOLLE" .....	87
TABLA N° 7. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> "MOLLE" .....	88
TABLA N° 8. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus</i> <i>molle</i> "MOLLE" .....	92
TABLA N° 9. DATOS DE LA CROMATOGRAFÍA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus</i> <i>molle</i> "MOLLE" .....	94
TABLA N° 10. COMPONENTES EN MAYOR PROPORCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> "MOLLE" CG-EM .....	95
TABLA N° 11. ENSAYOS DE PREFORMULACIÓN .....	97
TABLA N° 12. RESULTADOS DEL CONTROL FISICOQUÍMICO DE LAS PREFORMULACIONES .....	98
TABLA N° 13. FORMULACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> "MOLLE" .....	100
TABLA N° 14. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA .....	102
TABLA N° 15. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS PARA CREMAS .....	103
TABLA N° 16. RESULTADOS DEL CONTROL FISICOQUÍMICO DE LA CREMA TÓPICA A DISTINTAS CONCENTRACIONES.....	103
TABLA N° 17. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXTENSIBILIDAD DE LA CREMA TÓPICA A DISTINTAS CONCENTRACIONES.....	104
TABLA N° 18. RESULTADOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA CREMA TÓPICA .....	106
TABLA N° 19. MEDICIÓN DEL TIEMPO DE NOCICEPCIÓN DEL DOLOR DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CREMA CON ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus</i> <i>molle</i> "MOLLE" A DIFERENTES CONCENTRACIONES A LOS GRUPOS EXPERIMENTALES .....	108
TABLA N° 20. PRUEBA DE NORMALIDAD PARA PROBAR SI LAS MEDICIONES SE APROXIMAN A UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL .....	110

TABLA N° 21. ANOVA PARA PROBAR SI EXISTE DIFERENCIA DE MEDIAS ENTRE LOS GRUPOS .....	111
TABLA N° 22. DETERMINACIÓN DE HOMOGENEIDAD ENTRE LOS GRUPOS – PRUEBA DE TUKEY .....	112
TABLA N° 23. PRUEBA DE LEVENE PARA PROBAR LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE LAS MEDICIONES DE LOS GRUPOS .....	112
TABLA N° 24. GAMES HOWELL – COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA VER SI EXISTEN DIFERENCIAS MULTIPLES .....	113
TABLA N° 25. PRUEBA INTERSUJETOS .....	115
TABLA N° 26. PORCENTAJE DEL MAXIMO EFECTO POSIBLE (MEP) EN CADA GRUPO DE ESTUDIO.....	115
TABLA N° 27. MEDICIÓN DEL VOLUMEN PLANTAR ANTES Y DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CARRAGENINA 1%, OBTENCIÓN DE LA DISMINUCIÓN FINAL DEL VOLUMEN DE EDEMA PLANTAR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. ....	119
TABLA N° 28. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL VOLUMEN DE LOS EDEMAS DE CADA GRUPO EN ESTUDIO .....	122
TABLA N° 29. PRUEBA DE NORMALIDAD PARA PROBAR SI LAS MEDICIONES SE APROXIMAN A UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL .....	124
TABLA N° 30. ANOVA PARA PROBAR SI EXISTEN DIFERENCIAS DE MEDIAS ENTRE LOS GRUPOS .....	125
TABLA N° 31. DETERMINACIÓN DE HOMOGENEIDAD ENTRE GRUPOS- PRUEBA DE TUKEY.....	125
TABLA N° 32. PRUEBA DE LEVENE PARA PROBAR LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE LAS MEDICIONES DE LOS GRUPOS .....	126
TABLA N° 33. PRUEBA DE GAMES HOWELL- COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA VER SI EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.....	127
TABLA N° 34. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.....	128

## INDICE DE FLUJOGRAMAS

FLUJOGRAMA N° 1. Determinación del efecto analgésico. Método de Hot Plate .....	60
FLUJOGRAMA N° 2. Determinación del efecto antiinflamatorio. Método del edema plantar inducido por Carragenina .....	62
FLUJOGRAMA N° 3. Recolección, secado y obtención del aceite de <i>Schinus molle</i> “Molle” .....	64
FLUJOGRAMA N° 4. Determinación de los componentes por Cromatografía de Gases .....	68
FLUJOGRAMA N° 5. Elaboración de la crema con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle” (formula N°1).....	71
FLUJOGRAMA N° 6. Evaluación de la actividad Analgésica y Antiinflamatoria de una crema a base de aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “Molle” en animales de experimentación” .....	85

## INDICE DE FIGURAS

ILUSTRACIÓN N° 1. <i>Schinus molle</i> “molle” .....	17
ILUSTRACIÓN N° 2. Estratificación de la piel.....	40

## INDICE DE ECUACIONES

ECUACIÓN N° 1. Tiempo de cut off.....	59
ECUACIÓN N° 2. Porcentaje del Máximo Efecto Posible .....	60
ECUACIÓN N° 3. Porcentaje de Inhibición aguda .....	62
ECUACIÓN N° 4. Formula del porcentaje de humedad .....	63
ECUACIÓN N° 5. porcentaje de extracción del aceite esencial .....	65
ECUACIÓN N° 6. Formula de la densidad por el método picnómetro .....	66
ECUACIÓN N° 7. Formula del poder rotatorio .....	66

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	143
ANEXO N° 2. RESULTADOS DEL ANALISIS DEL ACEITE ESENCIAL POR CG-EM .....	144
ANEXO N° 3. CERTIFICADO SANITARIO DE LOS RATONES PROCEDENTES DEL INS CEPA Balb/c.....	147
ANEXO N° 4. RECONOCIMIENTO DE LA PLANTA POR EL HERBARIO VARGAS (CUZ).....	148
ANEXO N° 5. FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE LA CREMA FORMULADA .....	149
ANEXO N° 6. CARACTERIZACIÓN FISICA DEL ACEITE ESENCIAL .....	150
ANEXO N° 7. FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LA ANALGESIA.....	151
ANEXO N° 8. FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO.....	152
ANEXO N° 9. DESTILACIÓN DEL ACEITE DE MOLLE .....	153
ANEXO N° 10. PROTOCOLO DE EDEMA PLANTAR .....	154
ANEXO N° 11. . PROTOCOLO DE HOT PLATE .....	162
ANEXO N° 12. GUIA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO: RATON .....	167

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar la actividad analgésica mediante el método de Hot Plate y antiinflamatoria mediante el método de edema plantar de Carragenina al 1% de una crema elaborada a base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” en animales de experimentación; el paquete estadístico para el análisis de los resultados fue el SPSS 25.

El aceite esencial se obtuvo mediante destilación simple en el laboratorio de ciencias químicas, la obtención fue por arrastre de vapor a partir de las hojas desecadas de *Schinus molle* “molle”, la muestra obtenida fue caracterizada a través de diferentes ensayos químicos. Densidad: 0.8693g/ml; índice de refracción: 1,7052; poder rotatorio: 0,403°; solubilidad en etanol: 85% y 96%.

La cuantificación de los componentes del aceite de *Schinus molle* “molle” se determinó por cromatografía de gases –espectrofotometría de masas(CG-EM). Los resultados mostraron como principales componentes: Alfa-Pineno (11.4157%), Campheno (7.3984%), Beta-Pineno (1.3619%), Beta – Mirceno (5.4609%), Alfa-felandreno (19.1723%), evidenciando que los componentes presentan efecto analgésico y antiinflamatorio.

Los ensayos de pre formulación dieron como resultado final la formulación a base de alcohol cetílico, cera de abeja, propilenglicol, laurilsulfato de sodio, parabenos, agua estéril, aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, en las concentraciones de 1%, 2.5% y 5%, que fueron caracterizados mediante ensayos físicos: Densidad: 0.9905 g/mL, 0.9902 g/mL, 0.9874 g/mL; Extensibilidad: 87.6 cm<sup>2</sup>, 88.6 cm<sup>2</sup>, 91.3 cm<sup>2</sup> y pH: 6.5 para las 3 formulaciones.

La actividad analgésica y antiinflamatoria se determinó a las concentraciones de 1%, 2.5% y 5%, encontrándose para el efecto analgésico un porcentaje de máximo efecto posible (MEP) de 52,02%, 68.67%, 85,06% respectivamente a los 30 min y el fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren- cremigel) obtuvo un porcentaje de máximo efecto posible de 95.75%;y para el efecto antiinflamatorio se determinó un porcentaje de inhibición de la inflamación de 37, 42%, 65.64% y 88.96% respectivamente a la cuarta hora y el fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren- cremigel) obtuvo un porcentaje de inhibición de inflamación de 96.93%,

En conclusión, a crema elaborada a base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” al 5% presenta actividad analgésica y antiinflamatoria en animales de experimentación.

**Palabras clave:** Molle, *Schinus molle*, Aceite esencial, Crema, Actividad analgésica, Actividad antiinflamatoria.

## SUMMARY

The present work was done with the objective of evaluating the analgesic activity by the method of Hot Plate and anti-inflammatory by the method of the plantar edema method of Carrageenan to 1% of a cream elaborated on the basis of essential oil of *Schinus molle* "molle" in experimental animals; the statistical package for the analysis of the results was the SPSS 25.

The essential oil was obtained by simple distillation in the laboratory of chemical sciences, the obtaining was by steam dragging from the leaves, fruits and dried young branches of *Schinus molle* "molle", the obtained sample was characterized through different chemical tests. Density: 0.8693g/ml; refractive index: 1,7052; optical rotation: 0,403°; solubility in ethanol: 85% and 96%.

The quantification of the components of *Schinus molle* "molle" was determined by gas chromatography - mass spectrophotometry (GC-MS). The results showed as main components: Alfa-Pineno (11.4157%), Campheno (7.3984%), Beta-Pineno (1.3619%), Beta - Mirceno (5.4609%), Alfa-felandreno (19.1723%), evidence that the components have analgesic and anti-inflammatory effect.

The pre-formulation tests gave as final result the formulation based on cetyl alcohol, beeswax, propylene glycol, sodium laurilsulphate, parabens, sterile water, essential oil of *Schinus molle* "molle", in concentrations of 1%, 2.5% and 5%, which were characterized by physical test: Density: 0.9905 g/mL, 0.9902 g/mL, 0.9874 g/mL; Extensibility: 87.6 cm<sup>2</sup>, 88.6 cm<sup>2</sup>, 91.3 cm<sup>2</sup> and pH: 6.5 for the 3 formulations.

The analgesic and anti-inflammatory activity was determined at concentrations of 1%, 2.5% and 5%, being for the analgesic effect a percentage of maximum possible effect (MEP) of 52.02%, 68.67%, 85.06% respectively at 30 min and the standard drug diclofenaco 1% (Voltaren- cremigel) obtained a percentage of maximum possible effect of 95.75%; and for the anti-inflammatory effect a percentage of inflammation inhibition of 37, 42%, 65.64% and 88.96% respectively was determined at the fourth hour and the standard drug diclofenaco 1% (Voltaren- cremigel) obtained a percentage of inflammation inhibition of 96.93%,

In conclusion, a cream based on essential oil of *Schinus molle* "molle" at 5% presents analgesic and anti-inflammatory activity in experimental animals.

**Keywords:** Molle, *Schinus molle*, Essential oil, Cream, Analgesic activity, Anti-inflammatory activity.



## INTRODUCCIÓN

Nuestro país presenta una flora muy variada, dentro de ella se encuentran las plantas medicinales para el alivio y la curación de múltiples enfermedades <sup>1</sup>. La diversidad de estas especies vegetales existentes, permite realizar investigaciones, para determinar principios activos, establecer la localización de estos en las diferentes partes de la planta, y otorgarles el reconocimiento farmacológico y clínico en beneficio de la salud de la población, a través de la formulación de una forma farmacéutica adecuada.

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. <sup>2</sup>

El dolor es un síntoma desagradable, pero ante todo un reflejo y mecanismo de protección, que se activa contra agresiones físicas, químicas o mecánicas, después que ha ocurrido un traumatismo o una lesión tisular. El dolor es de tipo variado y origen múltiple, por lo tanto, son varios los componentes del mismo. El dolor es definido como una experiencia sensorial o emocional desagradable, asociada a daño tisular real o potencial, o bien descrita en términos de tal daño. El dolor es, por tanto, subjetivo y existe siempre que un paciente diga que algo le duele. <sup>3</sup>

El *Schinus molle* “molle”, conocida también como árbol del Perú o árbol de la vida es considerada una de las plantas para tratar el dolor, debido a la presencia de la salicilina, aceites esenciales, además de contener alcanfor y linalol que permite usarlo externamente como frotación en los lugares afectados. <sup>1</sup>

El dolor crónico representa un problema de salud en diferentes países del mundo, siendo su tratamiento complicado cuando tiene una causa multifactorial. La prevalencia varía desde un 16% hasta un 70 %, siendo más frecuente en mujeres que en hombres, asociado a enfermedades degenerativas y frecuente en mayores de 65 años, además se estima que entre las enfermedades degenerativas la artritis reumatoide es la más frecuente causa de inflamación encontrándose en un rango entre 0,2% y 5% en el mundo <sup>4</sup>, teniendo en cuenta estos problemas hoy en día es necesario plantear alternativas que brinden y garanticen la calidad, seguridad y eficacia a un costo al alcance del paciente, por ello planteamos el trabajo de tesis para brindar una alternativa a base de productos naturales.

El presente trabajo será realizado con el objetivo de determinar la acción analgésica y antiinflamatoria de una forma farmacéutica de aplicación tópica (crema) elaborada usando el aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, mediante el método de Hot plate <sup>5</sup> y edema plantar inducida por carragenina al 1% <sup>6</sup>, respectivamente.

# **CAPITULO I**

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor es un síntoma desagradable, pero ante todo un reflejo y mecanismo de protección. El dolor es de tipo variado y origen múltiple, por lo tanto, son varios los componentes del mismo y muy variados los neurotransmisores comprometidos en su intensidad y modulación. <sup>3</sup>

La analgesia es la eliminación de la sensación de dolor mediante el bloqueo artificial de las vías de transmisión del mismo y/o de los mediadores dolorosos, o por desconexión de los centros del dolor. <sup>7</sup>

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. <sup>2</sup>

El mecanismo más importante involucrado en la respuesta antiinflamatoria, es la inhibición de enzimas tales como la fosfolipasa A2 (PLA2) generadora de eicosanoides, la COX- 2 productora de cantidades significativas de la PGE2 y el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, productora de óxido nítrico). Dichas enzimas participan en el complejo proceso de la inflamación y dolor, cuyo objetivo es liberar al organismo de la causa inicial de la lesión. <sup>8</sup>

Los AINEs son un grupo de fármacos ampliamente empleados gracias a sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas e inhibidoras de la función plaquetaria. En cuanto a su mecanismo de acción, actúan inhibiendo la ciclooxigenasa (COX). La inhibición de esta isoenzima (COX-1) está asociada con la presencia de efectos colaterales, en especial irritación de la mucosa gástrica y efectos tóxicos a nivel renal. <sup>8</sup>

Las plantas medicinales y aromáticas juegan un importante papel en el cuidado de la salud de las personas. Hasta el advenimiento de la medicina moderna, el hombre dependió de ellas para el tratamiento de sus enfermedades. <sup>9</sup>

Es así que la fitoterapia estudia el uso de las plantas medicinales y las incorpora en formas farmacéuticas (fitofármacos), cuya calidad, seguridad y eficacia están garantizadas, teniendo en cuenta las características de las drogas vegetales y extractos<sup>10</sup>. La mayoría de las plantas presentan efectos fisiológicos múltiples debido a la existencia de más de un principio activo las cuales son compuestos químicos propios de la planta a la cual se le atribuyen propiedades curativas, en este caso al *Schinus molle* "molle" se le atribuye la propiedad analgésica y antiinflamatoria gracias a la

presencia de metabolitos secundarios como los terpenos por lo que es de interés en este estudio.

Los AINEs por vía tópica presentan una buena absorción, y pueden presentar algunas reacciones adversas de toxicidad dérmica cuando su uso es prolongado como: Irritación local ligera o moderada, enrojecimiento, erupción cutánea y picor debido a los excipientes o a al principio activo. Por lo tanto, la administración tópica de un analgésico y antiinflamatorio a base de productos naturales es una alternativa al tratamiento.

Debido a la condición de liposolubilidad de nuestro aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, este atravesaría fácilmente la barrera de la piel, debido a que compuestos terpenoides apolares son utilizados con éxito en la cosmética para promover la absorción de otras sustancias a través de la piel. La explicación de este hallazgo se basa en que provocarían alteraciones reversibles en la capa lipídica del estrato córneo, facilitando así su absorción. <sup>11</sup>

Por lo tanto, este estudio sugiere la elaboración de una crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” con la finalidad de determinar la acción analgésica mediante el método de Hot Plate y antiinflamatoria mediante el método de edema plantar inducido por carragenina, en el cual se evalúa si el aceite esencial obtenido y administrado en una forma farmacéutica por vía tópica, produce una respuesta anti-nociceptiva y la disminución del edema plantar inducido por carragenina en ratones albinos machos de la cepa Balb/c procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud.

## 2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentará actividad analgésica y antiinflamatoria la crema elaborada a base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” en animales de experimentación?

## 3. OBJETIVOS:

### 3.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad analgésica y antiinflamatoria de una crema elaborada a base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” en animales de experimentación.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar las características fisicoquímicas del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.
2. Cuantificar el porcentaje de los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* “molle” recolectado en la provincia de Calca, por cromatografía de gases –espectrofotometría de masas.
3. Realizar la pre formulación de la crema con el aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.
4. Realizar el control organoléptico, físico-químico y microbiológico de la crema de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.
5. Determinar la concentración efectiva para el efecto analgésico mediante el método de Hot Plate en ratones albinos de la cepa balb/c de la crema de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.
6. Determinar la concentración efectiva para el efecto antiinflamatorio mediante el método de edema plantar con carragenina en ratones albinos de la cepa balb/c de la crema de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.

### 4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

#### 4.1 Conocimiento:

Las plantas medicinales y aromáticas juegan un importante papel en el cuidado de la salud de las personas. Hasta el advenimiento de la medicina moderna, el hombre dependió de ellas para el tratamiento de sus enfermedades <sup>9</sup>. La información científica sobre la utilidad de las plantas medicinales hoy en día, es numerosa y creciente lo que hace que los profesionales de salud se vean obligados a tener un conocimiento serio, objetivo y de esa manera obtener una validación científica sobre su uso.

En el sector salud continúa siendo un inconveniente los problemas relacionados a los procesos de inflamación ocasionados por diferentes patologías, así como también el uso desmesurado de antiinflamatorios en especial de los AINEs. Los AINEs representan uno de los grupos farmacológicos más consumidos en el mundo. Sin embargo, en muchas ocasiones son infrutilizados o se abusa de ellos, siendo a veces innecesaria su prescripción. <sup>12</sup>

## 4.2 Aplicabilidad Fitoterapéutica

El Perú presenta una biodiversidad de plantas medicinales nativas, siendo utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado de la salud. Dentro de este contexto la región andina del Perú posee una variada flora destacándose la especie *Schinus molle* “molle”, conocida también como mullí, cullash, falsa pimienta, árbol de la vida, aguaribay, peper tree (inglés), árbol de la pimienta, Peru-piru (México), orighan, árbol del Perú, huignan (13). Su hábitat es en casi todas las quebradas templadas en la vertiente occidental de los Andes, así como en muchos valles interandinos, entre los 1500-2000 m.s.n.m. <sup>13</sup>

La identificación de la presencia de varios compuestos químicos en el aceite esencial puede justificar el uso de *Schinus molle* “molle” en la medicina tradicional. <sup>14</sup>

El extracto *Schinus molle* “molle” exhibe un perfil interesante de actividad farmacológica como analgésico y depresor central. En el análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* “molle” se comprobó la presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, taninos, fenoles, resina, lactonas, cumarinas, azúcares reductores, saponinas, glucósidos cardiotónicos, catequinas, triterpenos y esteroides. <sup>15</sup>

La recolección, extracción y comercialización del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, se debe a la necesidad de incorporar esta especie a los procesos agroindustriales, evitando así que cada año se pierda en su medio geográfico, producto del abandono y del desaprovechamiento. Con la extracción del aceite esencial se pretende dar un valor agregado e incrementar su valor económico como comercial en los mercados locales y nacionales, creando nuevas alternativas de trabajo e ingresos para el agricultor y orientar su futuro como un potente agente antiinflamatorio y analgésico que contenga una base científica que lo respalde y le permita su comercialización.

La incorporación y utilización de las plantas medicinales en el tratamiento de diversas reacciones inflamatorias, en particular el reumatismo es una práctica común en la medicina tradicional. Hoy en día es evidente que el interés por las sustancias antiinflamatorias y analgésicas de origen vegetal va en aumento, porque ofrecen en algunos casos ventajas en relación a los analgésicos clásicos, como es la baja incidencia de efectos secundarios. <sup>16</sup>

### 4.3 Prioridad

Dentro de las enfermedades que causan la inflamación y dolor se tiene las enfermedades reumáticas representan un grupo heterogéneo de más de 200 padecimientos diferentes, las cuales tienen en común, además de desconocerse su etiología en la mayoría de las mismas, el cursar con inflamación y/o dolor, localizado o generalizado, en las diversas estructuras del aparato musculoesquelético y, con mucha frecuencia, con alteraciones autoinmunes y compromiso sistémico.<sup>17</sup>

La heterogeneidad de los estudios, los métodos objetivos para evaluar el dolor y la diferencia en las variables estudiadas hacen difícil analizar en conjunto estas investigaciones. Sin embargo, es evidente que el dolor involucra a un amplio porcentaje de pacientes conforme progresa la enfermedad. La patología articular es la que produce mayor ausentismo frecuentemente en personas de edad avanzada, por encima de las enfermedades cardíacas y neoplásicas, repercutiendo en la vida socioeconómica, lo cual conduce a un uso excesivo de antiinflamatorios corticoides, citostáticos, etc, cuyo uso prolongado produce daños colaterales.

Para tratar la inflamación se utilizan diversos tratamientos, como antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINEs). Los AINEs representan uno de los grupos farmacológicos más usados en el mundo, en muchas ocasiones se abusa de ellos, siendo a veces innecesaria su prescripción, observándose los riesgos cardiovasculares, gastrointestinales y renales. Por ende, es importante la búsqueda de nuevas alternativas.<sup>9</sup>

Las terapias están dirigidas a controlar la inflamación, no obstante, el tratamiento demanda un enfoque multidisciplinario, que se basa en la utilización de analgésicos. Tradicionalmente estos fármacos son administrados por vía sistémica, sin embargo, cuando se aplican por esas vías, están asociados a los efectos colaterales importantes, los cuales pueden impedir su uso. La administración tópica de analgésicos es una alternativa al tratamiento.<sup>18</sup>

En esta investigación se evalúa la capacidad analgésica y antiinflamatoria de una crema a base de aceite esencial de *Schinus molle* "molle" en animales de experimentación (ratones albinos de la cepa Balb/c) con el propósito de determinar su efectividad en el proceso inflamatorio y como analgésico, lo que nos permitirá fundamentar un tratamiento alternativo para el control de la inflamación y el dolor, y que cuente con todos los beneficios requeridos para la administración tópica ante estas manifestaciones clínicas.

#### 4.4 Ámbito económico

Un problema mundial es el uso irracional de los medicamentos siendo estos prescritos, dispensados o vendidos de forma inadecuada y que limitan que los pacientes lo tomen en la dosis adecuada.

Lo que conlleva a un gran movimiento económico que favorece a las industrias farmacéuticas, ya que ofrecen productos sintéticos a costos elevados y en muchos casos son inaccesibles para muchos de los pacientes. Es por ello que brindamos una alternativa de medicamento a base de productos naturales que brinde y garantice calidad, seguridad y eficacia a un costo al alcance del paciente y que sobre todo no presente efectos secundarios ni reacciones adversas. Así mismo se trata de brindar una nueva alternativa de ingreso económico a las familias de bajos recursos, implementando el uso tradicional de esta especie.

#### 4.5 Factibilidad

El proyecto es factible ya que la materia prima que en este caso es el aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, se puede obtener mediante destilación simple con factibilidad del uso de los ambientes de los laboratorios, equipos y materiales para la destilación en la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

### 5. HIPOTESIS

La crema elaborada a base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” presenta actividad analgésica y antiinflamatoria en animales de experimentación.



## GLOSARIO DE TERMINOS

- I. Analgesia: Ausencia del dolor en respuesta a estímulos que normalmente provocaría dolor. <sup>7</sup>
- II. Antiinflamatorio: Medicamento o sustancia que reduce o combate los síntomas y los signos de la inflamación. <sup>19</sup>
- III. Antinocicepción: Reversión o alteración de los aspectos sensoriales de la intensidad del dolor. <sup>5</sup>
- IV. Aceite esencial: Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. <sup>20</sup>
- V. Biosíntesis: Conjunto de reacciones químicas que permiten a un ser vivo elaborar sustancias orgánicas complejas, como las proteínas, grasas, etc.
- VI. Ciclooxygenasa: Enzima clave en la síntesis de las prostaglandinas, a través de la oxidación del ácido araquidónico. <sup>19</sup>
- VII. Cromatografía de gases: Es una técnica analítica instrumental que sirve para separar y analizar los componentes de una mezcla, también se le conoce con el nombre de cromatografía de partición gas-líquido. <sup>21</sup>
- VIII. Carragenina: Polisacárido sulfatado que constituye la estructura principal de ciertas variedades de algas rojas, de la clase *Rhodophyceae*. Estos polímeros son fuertemente aniónicos debido a la presencia de grupos sulfatos, lo cual facilita su interacción con moléculas catiónicas y anfotéricas, como las proteínas. <sup>22</sup>
- IX. Crema: Emulsión semisólida formadas por una fase lipofílica y otra hidrofílica <sup>23</sup>.
- X. Dolor: Es un síntoma desagradable percibido como una molestia de intensidad variable localizada en una parte del cuerpo, es el resultado de una interacción entre estímulos físicos y el procesamiento de estos por el sistema nervioso central. <sup>3</sup>
- XI. Densidad: Relación entre la masa y el volumen de una sustancia, o entre la masa de una sustancia y la masa de un volumen igual de otra sustancia tomada como patrón. <sup>21</sup>
- XII. Edema: Hinchazón de los tejidos blandos debido a la acumulación de líquido en el compartimento intersticial. <sup>19</sup>
- XIII. Farmacopea: Libro oficial que publica cada país periódicamente y que sirve de norma legal en la identificación, preparación, ensayo y dispensación de los medicamentos. <sup>24</sup>

- XIV. Fitofármaco: Productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa, paliativa o para fines de diagnóstico. <sup>10</sup>
- XV. Formulación: Proceso mediante el cual se combinan diferentes sustancias químicas, incluido el fármaco activo, para producir un medicamento final <sup>25</sup>.
- XVI. Hot-Plate: Modelo de dolor somático clásico, test nocivo de calor-inducido que mide dolor agudo debido a la activación de nociceptores centrales en el tejido dañado. <sup>26</sup>
- XVII. Índice de Refracción: Se denomina índice de refracción al cociente de la velocidad de la luz en el vacío y la velocidad de la luz en el medio, se simboliza con la letra  $n$  siendo un valor adimensional. <sup>21</sup>
- XVIII. Inflamación: Es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. <sup>2</sup>
- XIX. L1 (latencia basal): el punto de partida o la latencia para responder antes del tratamiento. <sup>26</sup>
- XX. L2 (latencia post droga): es la latencia para responder después del tratamiento<sup>26</sup>.
- XXI. Poder rotatorio: capacidad de determinadas sustancias, llamadas ópticamente activas para desviar la luz polarizada. <sup>21</sup>
- XXII. Porcentaje de máximo efecto posible: Es el mayor efecto posible que se espera en un tiempo determinado. <sup>26</sup>
- XXIII. Tiempo de cut off: es el tiempo de permanencia máxima permitida. <sup>26</sup>
- XXIV. Transmisión nociceptiva: Es un proceso neuronal mediante el cual se codifican y procesan los estímulos potencialmente dañinos contra los tejidos. <sup>26</sup>

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- I. AINEs: antiinflamatorios no esteroideos.
- II. PIA2: Fosfolipasa A2
- III. IL-1, IL-6: Interleucinas.
- IV. FNT-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa.
- V. Ig A, Ig G: Inmunoglobulinas
- VI. C5a: Componente complemento receptor
- VII. ESCOP: European scientific corporative on fhytoterapy
- VIII. OMS: Organización mundial de la salud
- IX. COX 1, COX 2: Ciclooxygenasa 1, ciclooxygenasa 2
- X. DCM: Diclorometano
- XI. SM-DCM: Diclorometano de *Schinus molle*
- XII. LDL: lipoproteínas de baja densidad
- XIII. DMSO: dimetil sulfóxido
- XIV. AFNOR: French national organization for standardization (Asociación Francesa de Normalización)
- XV. ESCOP: European Scientific Cooperative on Phytotherapy
- XVI. PAF: factor activador de plaquetas
- XVII. CETIS: Centro de Estudios De Trabajos De Investigación
- XVIII. PG: Prostaglandinas
- XIX. Tx: Tromboxanos
- XX. EV: Vía endovenosa
- XXI. IM: Intramuscular
- XXII. O/W: Oil/Water (aceite/agua)
- XXIII. W/O: Wáter/Oil (agua/ aceite)
- XXIV. MPE: Máximo efecto posible
- XXV. NIST1L: Base de datos del equipo de Cromatografía.
- XXVI. NIST: El Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
- XXVII. HLB: hydrophilic-lipophilic balance (equilibrio hidrófilo-lipófilo)
- XXVIII. TSB: Caldo caseína soja.
- XXIX. SPSS: Statistical Package for the Social Sciences (Paquete estadístico para ciencias sociales).
- XXX. NCF: Normas Correctas de Fabricación
- XXXI. GMP: Good Manufacturing Practices (Buenas prácticas de manufactura)
- XXXII. L1: Latencia basal
- XXXIII. L2: Latencia post droga
- XXXIV. TI: Tiempo de cut off (tiempo de corte)

# **CAPITULO II**

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 ANTECEDENTES

#### 2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

- **TAYLOR A., OYEDEJI O., AREMU O., OYEMITAN I., GWEBU E., OYEDEJI A., NKEH-CHUNGAG B. “EVALUACIÓN DEL EFECTO ANALGESICO, ANTIINFLAMATORIO Y SEDANTE DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO EXTRAÍDO DEL *Schinus molle*”. REVISTA EUROPEA DE CIENCIAS MÉDICAS Y FARMACOLÓGICAS. USA. 2016. <sup>27</sup>**

Se determinó la fracción activa y los compuestos del extracto del diclorometano de las semillas *Schinus molle* y la evaluación de sus efectos biológicos.

Las semillas secas de *Schinus molle* fueron extraídas secuencialmente en hexano, acetato de acetil y diclorometano. El extracto de diclorometano fue separado en dos fracciones (1 y 2) mediante cromatografía en columna. Las dos fracciones aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) la latencia de la película de la cola, aunque la fracción 2 proporcionó una protección mejor y más duradera contra dolor térmico, a fracción 2 redujo significativamente ( $p < 0.01$ ) el edema de la pata de la rata en comparación con el grupo de tratamiento salino a lo largo de los experimentos dado que la fracción 2 tenía solamente dos compuestos constituyentes (isomasticadieno y Masticatrienonato), se concluye que uno o ambos de estos compuestos deben contribuir a los efectos analgésico y antiinflamatorios observados. Por otra parte, ambas fracciones carecían de efectos sedantes significativos.

- **STEIDER P., FERREIRA H., CALIL J., PALERMO M. “COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* Y SUS ACTIVIDADES BIOLÓGICAS”. REV CUBANA FARM. VOL.49 NO.1. CIUDAD DE LA HABANA ENE.-MAR. 2015. <sup>14</sup>**

Se realizó la caracterización química de *Schinus molle*. Los aceites esenciales y sus actividades biológicas y compararlos con las actividades biológicas de los principales compuestos encontrados en la literatura.

Se utilizaron cincuenta gramos de hojas para extraer los aceites mediante destilación en un aparato Clevenger modificado. El análisis químico de los aceites volátiles se llevó a cabo con cromatografía de gases capilar utilizando un detector de ionización de llama para el análisis cuantitativo de sus elementos y, posteriormente, un detector de masas

para el análisis cualitativo. Se separaron diecinueve sustancias y los principales compuestos fueron el biciclogermacreno (20.5%), beta-cariofileno (19.7%) y espatulenol (19.2%). El biciclogermacreno presente en el aceite esencial de *Schinus molle*, actúa como un potencial agente antiinflamatorio, antioxidante, protector de la mucosa gástrica, anestésico local, anti-acné y anticancerígeno, debido a su capacidad para desintoxicar los xenobióticos o para atacar líneas celulares cancerosas.

- **ZENG YUEQUIN M., RECIO C., GINER R. “AISLAMIENTO DE DOS TRITERPENOIDES Y UNA BIFLAVANONA CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS FRUTOS DE *Schinus molle*”. PLANTA MEDICA. (2003).<sup>28</sup>**

Se aisló dos triterpenoides y una biflavona con actividad antiinflamatoria del fruto del *Schinus molle*.

Se recolectaron los frutos de *Schinus molle* y se extrajo usando acetona y metanol de grado analítico, y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con grado de gradiente de Baker, para la identificación de los componentes. Los triterpenos aislados fueron identificados según a su característica espectroscópica como ácido 3-*epi*-isomasticadienolálico (1), ácido isomasticadienonálico (2) y el flavonoide (3) fue identificado como la biflavona chamaejasmina. El triterpeno 2 fue el único compuesto activo que reduce significativamente el edema (66%), de manera similar a la del medicamento de referencia al mismo tiempo.

En cambio, la chamaejasmina falló al inhibir el edema plantar, sin embargo, fue el único compuesto activo que redujo el edema inducido por la carragenina. Los Triterpenos 1 y 2 son los más activos, inhibiendo el edema en 39% a y 48% respectivamente. Mientras chamaejasmina inhibieron significativamente el edema, pero sólo en un 26%. El medicamento de referencia dexametasona, como control, inhibe la inflamación en un 85%. Por otro lado, triterpenos 1 y 2 inhiben el neutrófilo infiltración mide la actividad de 57 y 50 % respectivamente, valores similares a los obtenidos con dexametasona (55%).

## 2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES

**MARTEL J. “EFECTO CITOPROTECTOR DEL ACEITE DE MOLLE (*Schinus molle*) EN LESIONES GÁSTRICAS INDUCIDAS CON ETANOL EN RATAS”. UNIVERSIDAD NACIONAL “HERMILIO VALDIZÁN”. ESCUELA DE POST GRADO. HUÁNUCO-PERÚ. 2017.** <sup>29</sup>

Se determinó el efecto citoprotector del aceite de molle (*Schinus molle*) en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas. En el estudio se dividió aleatoriamente en tres grupos de veinte ratas cada uno y permanecieron en ayunas 24 horas antes del experimento (24 horas de ayuno sólido y 12 horas de ayuno líquido). A los grupos experimentales se le administró durante siete días consecutivos, vía orogástrica aceite de molle a través de una cánula metálica cada 8 y 16 horas. Mientras que al grupo control se le administró sucralfato cada 8 y 16 horas durante siete días. Una hora después de recibido el tratamiento se le administró a los grupos experimentales y control 1,5ml de etanol vía orogástrica durante el primer, cuarto y séptimo día. Cuatro horas después de la última ingesta de etanol, las ratas fueron anestesiadas con 1ml de pentobarbital sódico (Halatal), luego se procedió a cirugía abdominal para la localización y extracción de los estómagos, los cuales fueron abiertos por la curvatura mayor, lavados con suero fisiológico y extendidas para lograr una completa exposición de la mucosa para el análisis macroscópico y la toma de fotografías en fresco.

Se determinó que 47,6% de las ratas en el grupo experimental 1 con aceite de molle a dosis de 0,15ul, el 28,6% en el grupo experimental 2 con aceite de molle a dosis de 0,30ul, y el 23,8% en el grupo control con sucralfato, con administración de cada 8 horas presentaron citoprotección de la mucosa gástrica.

- **CORTEZ A. “IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN HOJAS DE *Schinus molle* (*molle*) PROCEDENTE DEL CASERÍO DE HUAÑIMBA-CAJABAMBA”. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA. UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES DE CHIMBOTE. TRUJILLO – PERÚ. 2018.** <sup>15</sup>

Se identificó la presencia de metabolitos secundarios presentes en hojas de *Schinus molle* (*molle*) procedente del Caserío de Huañimba-Cajabamba. Se emplearon aproximadamente 3 kg de hojas de *Schinus molle* l. (*molle*). Para la Identificación de Alcaloides se realizó Ensayo de Dragendorff, identificación de Flavonoides Reacción de Shinoda, identificación de Taninos reacción de Tricloruro Férrico, identificación de

Resinas solución alcohólica, identificación de Triterpenos y Esteroides reacción De Lieberman-Burchard. identificación de Glucósidos Cardiotónicos el ensayo de Kedde. En el análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* (Molle) se comprobó la presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, taninos, fenoles, resina, lactonas, cumarinas, azúcares reductores, saponinas, glucósidos cardiotónicos, catequinas, triterpenos y esteroides.

## 2.2. ESTADO DE LA CUESTION

- El estudio realizado por **A. CORTEZ, 2018**. Con el objetivo de identificar la presencia de metabolitos secundarios presentes en hojas de *Schinus molle* (molle) procedente del Caserío de Huañimba-Cajabamba. En cuyo resultado se identificó alcaloides, flavonoides, taninos, fenoles, resina, lactonas, cumarinas, azúcares reductores, saponinas, triterpenos, esteroides, catequinas, glucósidos cardiotónicos. los cuales están relacionados con acciones cicatrizante, antibacteriano, antiinflamatorio, antidiarreico, anti fúngico, antimicrobiana en las hojas de *Schinus molle* “molle”.<sup>15</sup>
- El estudio realizado por **TAYLOR A., OYEDEJI O., AREMU O., OYEMITAN I., GWEBU E., OYEDEJI A., NKEH-CHUNGAG B. 2016**. cuyo objetivo es la determinación de la fracción activa y los compuestos del extracto del diclorometano de *Schinus molle* semillas y de la evaluación de sus efectos biológicos. En cuyo resultado se encuentra los compuestos (isomasticadienonico y Masticatrienonato), los cuales contribuyen a los efectos analgésico y antiinflamatorios del extracto de *Schinus molle* “molle”.<sup>27</sup>
- El estudio realizado por **STEIDER P, FERREIRA H, CALIL JULIANA, PALERMO MELÂNIA. 2015**. Cuyo objetivo es la caracterización química de *Schinus molle*. Los aceites esenciales y sus actividades biológicas y compararlos con las actividades biológicas de los principales compuestos encontrados en la literatura. En cuyo resultado se encuentra el bicilogermacreno presente el aceite esencial de *Schinus Molle* como un agente potencial antiinflamatorio.<sup>14</sup>
- El estudio realizado por **ZENG YUEQUIN, M. CARMEN RECIO SALVADOR. 2003**. Se realizó el aislamiento de triterpenoides y un biflavona con actividad antiinflamatoria de los frutos del *Schinus molle*, en cuyos resultados se aisló el ácido (13 $\alpha$ , 14 $\beta$ , 17, 20S, 24Z) -3-hidroxi-21-oxolanosta-8, 24-dien- 26-OIC (1), ácido isomasticadienonálico (2) y el flavonoide (3) identificados como el chamaejasmina de biflavona. Obteniéndose que los Triterpenos 1 y 2 son los



más activos, relacionándolo con el efecto antiinflamatorio que se le atribuye al *Schinus molle* “molle”.<sup>28</sup>

- La investigación realizada por **VILLAR M. VILLAVICENCIO O. CAPITULO VIII. “USO CLÍNICO DE LAS PANTAS MEDICINALES”. MANUAL DE FITOTERAPIA. 2001.** Donde el *Schinus molle* “molle”, conocida también como árbol del Perú o árbol de la vida es considerada una de las plantas para tratar la artritis reumatoidea, debido a la presencia de la salicilina, aceites esenciales, además contiene alcanfor y linalol que permite usarlo externamente como frotación en las articulaciones afectadas.<sup>1</sup>
- La investigación realizada por **PALACIOS V. “PLANTAS MEDICINALES NATIVAS DEL PERU”. 1997.** Menciona que los indígenas usaban la resina, corteza, hojas, fruto en infusión, cocimiento y emplastos del *Schinus molle* “mole”. Como antiinflamatorio.<sup>13</sup>

## 2.3. BASES TEÓRICO- CIENTÍFICAS

### 2.3.1 DESCRIPCIÓN DE *Schinus molle* “molle”

#### 2.3.1.1 Clasificación taxonómica:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Subdivisión: *Magnoliopsida*

Clase: *Dicotyledoneae*

Orden: *Sapindales*

Familia: *Anacardiaceae*

Género: *Schinus*

Especie: *Schinus molle*

#### 2.3.1.2 Sinonimia y nombre común:

La especie *Schinus molle* “molle” presenta diferentes nombres comunes de acuerdo a la región donde se encuentre y entre ellas tenemos: Mullí, cullash, falsa pimienta, árbol de la vida, aguaribay, peper tree (inglés), árbol de la pimienta, Peru-piru (México), orighan, árbol del Perú, huignan.<sup>13</sup>

### 2.3.1.3 Características botánicas de *Schinus molle* “molle”

El ***Schinus molle*** “molle” es un arbusto o arbolillo perennifolio de hasta 10 metros de alto. <sup>13</sup>

El **tallo** es ramoso, de hasta un metro de diámetro, ramas esparcidas, colgantes a modo de cortina, las ramas y el tronco exudan una resina blanquecina si sufren una herida <sup>13</sup>.

Las **hojas** son alternas, pecioladas, limbo imparipennado, foliolos de 25 a 27 lineal lanceolados o falcados, sésiles. Los basales son alternos y de mayor tamaño, cerca del ápice tienen disposición opuesta y son de menor tamaño. <sup>13</sup>

Las **inflorescencias** son panículas abiertas. <sup>13</sup>

Las **flores** son pequeñas muy numerosas, pentámeras, heteroclamideas, uni o bisexuales. Cáliz cupuliforme, pentámero. Corola dialipétala, pentámera, pétalos imbricados, elípticos, blancos. <sup>13</sup>

El **androceo** con diez estambres incluidos en dos series de cinco cada uno insertos debajo de un disco lobulado, la serie externa tiene filamentos más largos, anteras aovadas. <sup>13</sup>

El **fruto** es una drupa esférica de 5 mm de diámetro de color rosado oscuro brillante <sup>13</sup>.

Las **semillas** son negras. Lisas, opacas. <sup>13</sup>

ILUSTRACIÓN N° 1. *Schinus molle* “molle”



**Fuente:** Imagen del *Schinus molle* [internet]

### 2.3.1.4 Ecología de la especie

**HABITAT:** El *Schinus molle* “molle” tiene un hábitat en casi todas las quebradas templadas en la vertiente occidental de los Andes, así como en muchos valles interandinos, entre los 1500-2000 m.s.n.m. <sup>13</sup>

**DISTRIBUCIÓN:** El *Schinus molle* “molle” es común en muchas partes de América, siendo oriundo del Perú, abunda también en Chile, Ecuador y Bolivia. Cultivado como árbol ornamental en México y Estados Unidos.<sup>13</sup>

### 2.3.1.5 Composición Fitoquímica:

CUADRO N° 1. Composición Fitoquímica del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

Hojas y frutos		
T E R P E N O S	MONOTERPENOS	D-CADINENO, canfeno, car-3.eno, carvacrol, paracimeno, butirato de geniarol, limoneno, mirceno, hexanoato de nerol, A-felandreno, B-felandreno, pineno, a-pineno, B-pineno, sabineno, A-terpineno, G-terpineno, A-terpineol, formiato de A-terpineol, terpinoleno.
	TRITERPENOS	A-Amirina, ácido iso-masticadienoico, Ácido iso-3-epi-masticadienolico, ácido iso-masticadienonálico, ácido iso-masticadienónico, ácido masticadienónico.
	SESQUITERPENOS	A-bergamonttranseno, B-ourboneno, A-cardinol, D-cardinol, T-cardino, A-calacoreno, G-calacoreno, calamenneno, B-cariofileno, A-copaeno, A-cubebeno, E-elemeno, elemol, A-eudesmol, B-eudesmol, G-eudesmol, D-germacreno, B-guaieno, A-Gurjuneno, A-humuleno, A-muuroloeno, G-muuroloeno, muurolel, G-espatuleno.
LIPIDOS		Ácido behénico, ácido ceótico, ácido heptacosanoico, ácido lignocérico, ácido linoleico, ácido octacosanoico, metil-éster del ácido octanoico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido pentasanoico, ácido tricosanoico.
ENZIMAS		Lacasa, peroxidasa
ALCALOIDES		Piperina
FLAVONOIDES		Quercitrina, iso-quercitrina, rutina, cianidin-3-O-A-L-galactosido, cianidin-3-O-B-D-rutinosido, peonidin -3-O-BD

Fuente: Peña R.<sup>30</sup> y Bruneton J.” Farmacognosia- Fitoquímica plantas medicinales”<sup>31</sup>

CUADRO N° 2. Características Fisicoquímicas del aceite esencial de *Schinus molle* "molle"

CARACTERÍSTICAS		PARÁMETROS
Punto de ebullición		>110 C°
Color		Amarillo intenso
olor		característico
aspecto		liquido
Índice de refracción		1,477
Densidad		0.838 g/mL
Rotación óptica		203-206 nm - 4,924°.
Solubilidad	Acetona	+ + +
	Éter etílico	+ + +
	Éter de petróleo	+ + +
	Cloroformo	+ + +

Fuente: Tineo F.<sup>32</sup>

- **TERPENOS**

Elaborados a partir de los mismos precursores los terpenoides constituyen sin duda, el más amplio conjunto conocido de metabolitos secundarios de los vegetales. La inmensa mayoría de los terpenos son específicos del reino vegetal, pero se pueden encontrar en los animales: feromonas y hormonas juveniles sesquiterpénicas de los Insectos; diterpenos de organismos marinos (Celentéreos, Espongiarios). Igualmente, los triterpenos son específicos del reino vegetal. Los esteroides vegetales, como los triterpenos, proceden -vía escualeno del mevalonato: el mecanismo de su formación es ligeramente diferente de aquel que da lugar a los triterpenos y, casi siempre, su estructura demuestra su especificidad vegetal; cardiotónicos cardenólidos, alcalinas esteroídicas, saponósidos, fitosteroles.<sup>31</sup>

La diversidad de los metabolitos terpénicos naturales nos llevará a considerar la presentación de las reacciones y mecanismos que justifican la existencia de los principales esqueletos, a medida que la estructura y la distribución de éstos vaya siendo descrita en los diferentes capítulos que constituyen esta parte de la obra; monoterpenos regulares (aceites esenciales, oleorresinas, iridoides); monoterpenos irregulares (piretrinas); sesquiterpenos (aceites esenciales, lactonas sesquiterpénicas); diterpenos; triterpenos.<sup>31</sup>

Todos los terpenos y los esteroides tienen en común que se pueden considerar formados por la unión de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del 2-metilbutadieno: ya, en 1887, O. Wallach consideraba que los terpenos debían estar constituidos a partir de unidades isoprénicas y, algunas decenas de años más tarde (1953), Ruzicka, después de más de treinta años consagrado al estudio de

los terpenos, transformaba esta hipótesis en una regla general cuyo principio ha sido, después, confirmado experimentalmente.<sup>31</sup>

Clásicamente se han utilizado como antitusivos y expectorantes, antiinflamatorios, analgésicos, venotónicos, antihemorroidales y adaptógenos.<sup>31</sup>

En general para la identificación de estructuras triterpénicas y/o esteroideas se utilizan métodos como reacciones de decoloración (Lieberman- Bouchard) donde dan una coloración rosada o púrpura para saponinas, mientras que para esteroides dan coloración verdosa también se usa la cromatografía en capa fina.<sup>31</sup>

- **LÍPIDOS**

Los lípidos son las grasas y sustancias similares, las cuales se encuentran en las plantas y los animales, constituyen un grupo muy importante de moléculas orgánicas con utilización farmacológica y forman una gama heterogénea de funciones químicas.<sup>33</sup>

Los lípidos se agrupan, en principio, sobre la base de sus características de solubilidad; en general, son solubles en solventes orgánicos como el éter y el cloroformo y son insolubles en agua.<sup>33</sup>

**Clasificación de los lípidos:**

Los lípidos pueden ser clasificados en cinco grupos de acuerdo a su estructura química.

**Aceites fijos y grasas:** Son ésteres de la glicerina con los ácidos grasos, los aceites fijos sólidos a temperatura ambiente son comúnmente llamados grasas.<sup>33</sup>

**Ceras:** Ésteres de alcoholes monohidroxilados de alto peso molecular con ácidos grasos de alto peso molecular.<sup>33</sup>

**Esteroles:** Alcoholes que contienen la estructura típica del ciclo pentano fenantreno (esteroideo).<sup>33</sup>

**Fosfolípidos:** Ésteres constituidos por glicerina, ácidos grasos, ácido fosfórico y algunos compuestos nitrogenados. Los más importantes de este grupo son las lecitinas.

<sup>33</sup>

**Glucolípidos:** Son sustancias aisladas del cerebro y otras fuentes las cuales parten de la hidrólisis de ácidos grasos, galactosa y de compuestos nitrogenados. Debido a que el azúcar más común presente en estos compuestos es la galactosa se les denominan también galactolípidos. Estos compuestos no tienen aplicación farmacéutica.<sup>33</sup>

- **ENZIMAS**

Si bien las enzimas están contenidas en las drogas vegetales las que tienen usos terapéuticos son muy pocas, se utiliza enzimas cuando se quiere acelerar un proceso. En vegetales superiores tienen actividad proteolítica, por lo que se usan en terapéutica, principalmente:

Las peroxidasas son un grupo de enzimas que oxidan sustratos a expensas del peróxido de hidrógeno. En las plantas desempeñan un papel catalítico en el proceso de lignificación del xilema, expresándose también en la epidermis de los órganos aéreos.

34

- **FLAVONOIDES**

Esta familia agrupa varios miles de compuestos (se han descrito más de 8000 flavonoides diferentes de origen natural; que comparten un esqueleto común, C6- C3- C6, en el que dos anillos aromáticos (A y B) se encuentran ligados a través de un puente de 3 átomos de carbono que normalmente, aunque no siempre, forma un heterociclo (anillo C) dando lugar a una estructura fenilcromano.<sup>31</sup>

Los flavonoides son uno de los grupos más numerosos de metabolitos secundarios de plantas que juegan papeles relevantes en ecofisiología vegetal, participando en los procesos de propagación y los mecanismos de defensa frente a factores de estrés bióticos y abióticos. Se encuentran ampliamente distribuidos en la dieta humana y su consumo se ha relacionado con la prevención frente a diversas patologías crónicas, especialmente de tipo cardiovascular.<sup>31</sup>

Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA. La reacción bioquímica que da origen a los flavonoides está controlada por dos enzimas: la chalcona sintasa y la chalcona flavonona isomerasa. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten una estructura común el difenilpirano (C6-C3-C6), que son compuestos con dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo heterocíclico C de pirano.<sup>31</sup>

Debido a su mecanismo de acción de estos fitoquímicos se han podido usar en patológicas como la diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, úlceras, así también se le ha dado un uso como antialérgicos, antitrombóticos e incluso como antiinflamatorios. Se ha demostrado que protegen de la fotooxidación a la Vitamina E en la membrana celular, inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por lo que evitan la formación del ateroma y reducen la citotoxicidad de las LDL.<sup>31</sup>

El efecto relajante vascular de los flavonoides es dependiente del endotelio y se ha descrito ser útil en diferentes patologías. Hasta este momento, el mecanismo de acción no es claro, sin embargo, se asocia con la síntesis del óxido nítrico (NO) y a la presencia de un grupo carbonilo en la posición 4 y su doble enlace C2-C3; que son requisitos indispensables para el efecto vasodilatador.<sup>31</sup>

Desde un punto de vista farmacológico las plantas con flavonoides muestran actividad antiinflamatoria tanto in vivo como in vitro. Se propusieron diferentes mecanismos para entender la actividad antiinflamatoria in vivo. Uno de los más importantes mecanismos es la inhibición de enzimas generadora de eicosanoides como son las enzimas fosfolipasa A<sub>2</sub>, ciclooxigenasa y lipooxigenasas. Produciendo como consecuencia la reducción de las concentraciones de prostaglandinas y leucotrienos.<sup>31</sup>

La extracción de los diferentes flavonoides se realiza a partir del material fresco o incluso seco, siempre y cuando no se altere su composición. Se utilizan inicialmente disolventes no polares o ligeramente polares para separar las clorofilas gomas y agliconas de flavonoides altamente metoxiladas. Los flavonoides, que poseen un gran número de grupos hidroxilos insustituídos o azúcares, son considerados polares, por lo que son ligeramente solubles en disolventes polares, como el metanol, etanol, acetona, DMSO o agua. El filtrado final se concentra y todo el disolvente se remueve. Este proceso es favorable para la extracción de la mayoría de los flavonoides, pero no para antocianidinas o flavonoides de baja polaridad los cuales aparecen en la superficie de las plantas.<sup>31</sup>

Los métodos de valoración clásicos son, sobre todo, colorimétricos o espectrofotométricos (ej.: medida de la absorbancia después de la reacción con AlCl<sub>3</sub>), La CLAR ofrece en la actualidad la posibilidad de una valoración rápida y precisa de todos los flavonoides presentes en una droga, por ello se utiliza ampliamente.<sup>31</sup>

- **ALCALOIDES**

alcaloide es un compuesto orgánico de origen natural (normalmente vegetal), nitrogenado, más o menos básico, de distribución restringida y dotado, a bajas dosis, de marcadas propiedades farmacológicas. El agrupamiento de tal conjunto, se confirma por otra parte mediante reacciones comunes de precipitación con los «reactivos generales de alcaloides» (vid e infra).<sup>31</sup>

En el vegetal, los alcaloides se encuentran en forma soluble, de sales (citratos, malatos, tartratos, m-econatos, isobutiratos, benzoatos) o en combinación con taninos. La microquímica permite comprobar que los alcaloides se localizan generalmente en tejidos

periféricos: capas externas de las cortezas de tallo y raíz, tegumento de las semillas, etc.<sup>31</sup>

La basicidad y las acciones antimetabólicas de la mayoría de estas moléculas imponen su compartimentación: normalmente se almacenan en vacuolas celulares, ya sean estas específicas (en los laticíferos) o no. Normalmente la síntesis de estos alcaloides se realiza a nivel de determinados lugares (raíz en crecimiento, células especializadas de los laticíferos, cloroplastos) y posteriormente son transportados a su lugar de almacenamiento.<sup>31</sup>

Farmacológicamente tiene acciones antitumorales, estimulantes, analgésica y antiinflamatoria. Estos alcaloides se pueden encontrar distribuidos en los vegetales al estado libre, como glicosidos o como sales de ácidos orgánicos.<sup>31</sup>

La extracción preliminar puede ser una extracción «clásica» de los alcaloides o, más rápidamente, una maceración en alcohol; la disolución alcohólica se evapora y el residuo se recoge con agua acidificada; después de filtración los alcaloides se localizan en el filtrado.<sup>31</sup>

Estas reacciones generales de precipitación se basan en la capacidad que poseen los alcaloides de combinarse con metales y metaloides: bismuto, mercurio, tungsteno, yodo, etc. En la práctica, se utiliza la disolución yodo-yodurada, el tetrayodomercuriato potásico conocido con el nombre de reactivo de Mayer y el tetrayodobismutato potásico, más conocido con el nombre de reactivo de Dragendorff. También es posible utilizar el reactivo silico-túngstico (mezcla de óxidos de tungsteno y de silicio) o también disoluciones de yodo-platinatos alcalinos. La especificidad de estos reactivos no es absoluta; proteínas, a-pironas, algunas cumarinas e hidroxiflavonas, lignanos y otros compuestos pueden dar lugar a reacciones falsamente positivas con el reactivo de Dragendorff.<sup>31</sup>

- **SAPONINAS**

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando se las agita en agua.. Existe una gran variedad de plantas que contienen saponinas en distintas concentraciones, como por ejemplo la yuca, el ginseng, la quinua, el tribulus terrestris o el quillay, entre otros.<sup>31</sup>

Los esteroides (saponósidos, heterósidos cardiotónicos, fitosteroides, triterpenos modificados); carotenos; poliisoprenos. Por el contrario, insistiremos en este punto, en



las tres secuencias de reacciones fundamentales que justifican la existencia de todos los terpenos y esteroides: formación de las unidades reactivas en C5 a partir del acetato, vía mevalonato. <sup>31</sup>

Los saponósidos poseen acción venotónica y antiinflamatoria y los flavonoides acción diurética, protectora capilar y antiedematosa. Por ello, esta droga está indicada en la profilaxis y tratamiento de la insuficiencia venosa originada por calor, piernas cansadas, varices, edema y hemorroides. Conviene utilizarla conjuntamente por vía externa e interna. <sup>31</sup>

Para la identificación de estructuras esteroideas se utilizan métodos como reacciones de decoloración (Lieberman- Bourchard) donde dan una coloración rosada o púrpura para saponinas, mientras que para esteroides dan coloración verdosa también se usa la cromatografía en capa fina. <sup>31</sup>

#### 2.3.1.6 Dosis y usos según la Fitoterapia:

- Según Doleski <sup>35</sup> popularmente se usa como elemento antiviral, antibacteriano, tópico antiséptico, antioxidante, antiinflamatorio, antibacteriano, antifúngico, antitumoral, antiespasmódico, astringente, diurético, cicatrización de heridas, diurético, analgésico, así como también antidepresivo y estimulante.
- Adicionalmente también ha sido utilizado para el tratamiento del dolor de muelas, reumatismo, trastornos menstruales, infección urinaria y respiratoria. <sup>36</sup>
- Si se muelen las hojas y con esto se hace una infusión más concentrada, resulta un líquido muy usado como enjuagatorio contra la inflamación de la boca y las encías. <sup>13</sup>
- La decocción de frutos y hojas es antirreumática, se usa (10g/L), se toma 2 vaso al día por 15 días, también se usa tintura de los frutos. <sup>13</sup>

## 2.4 ACEITE ESENCIAL

Los aceites esenciales son sustancias de origen vegetal cuyas mezclas de metabolitos secundarios volátiles, insolubles en agua, les confieren características particulares según sus diferentes proporciones. <sup>37</sup>

Estos aceites se originan en los tejidos secretores de las plantas y, por lo general, son líquidos a temperatura ambiente, más ligeros que el agua, de olor fuerte y penetrante que recuerda su planta de origen, e incoloros o de color amarillo traslúcido. <sup>38</sup>

En tiempos modernos, las propiedades poderosas para curar de los aceites esenciales fueron redescubiertos en 1937 por un químico francés, Rene Maurice Gattefosse, quien curó una mano con quemaduras graves solamente con el aceite de lavanda. Otro francés contemporáneo, el Dr. Jean Valnet usó aceites esenciales de grado terapéutico para tratar soldados heridos durante la segunda guerra mundial. El Dr. Valnet se convirtió en un líder mundial en el desarrollo de prácticas de la aromaterapia. El uso moderno de aceite esenciales ha seguido creciendo rápidamente mientras científico de la salud y médicos profesionales continúan investigando y validando los numerosos beneficios de salud y bienestar de los aceites esenciales de grado terapéutico. <sup>39</sup>

Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. <sup>31</sup>

Normalmente son líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos. En general son los responsables del olor de las plantas. <sup>31</sup>

Están ampliamente distribuidos en coníferas (pino, abeto), mirtáceas (eucaliptus), rutáceas (*Citrus ssp*), compuestas (manzanilla), si bien las plantas que producen aceites esenciales se encuentran en las familias de las labiadas (menta, lavanda, tomillo, espliego, romero) y las umbelíferas (anís, enojo). Pueden estar en diferentes órganos: Raíz, rizoma, (jengibre), leño, (alcanfor), hoja (eucaliptus), fruto (anís), sumidades floridas (*F. Labiatae*). <sup>31</sup>

La composición varía con el lugar de origen, también varía con el hábitat en que se desarrolla, (por lo general climas cálidos tienen mayor contenido de aceites esenciales), el momento de la recolección, el método de extracción, etc. <sup>31</sup>

Se debe tener en cuenta que algunos aceites esenciales, sobre todo a dosis elevada, son tóxicos, principalmente a nivel del sistema nervioso central. Otros como el de ruda o enebro, se considera que poseen propiedades abortivas. Algunos también pueden ocasionar problemas tópicos, irritación o alergias. <sup>20</sup>

Además de sus propiedades terapéuticas, los aceites esenciales tienen un gran interés industrial en la industria farmacéutica, en alimentación y sobre todo en perfumería.

#### 2.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

TABLA N° 1. CLASIFICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

CRITERIO	CLASIFICACIÓN	CARACTERÍSTICA	
Consistencia	Esencias fluidas	Líquidos volátiles a temperatura ambiente	
	Bálsamos	Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, así como sus correspondientes ésteres. De consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización. Bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, bálsamo de tolú.	
	Resinas	Resinas	La colofonia, obtenida por separación de la oleoresina trementina. Contiene ácido acético y derivado.
		Oleoresinas	La trementina obtenida por incisión en los troncos de diversas especies de pinus. Contiene resina (colofonia) y aceite esencial (esencia de trementina) que se separa por destilación por arrastre de vapor.
	Gomoresinas	Están compuestas por mezclas e gomas y resinas	
origen	Naturales	Se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas.	
	Artificiales	Se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalol, o la esencia de anís enriquecida con etanol.	
	Sintéticos	Son los producidos por la combinación de sus componentes os cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa.etc)	
Naturaleza química de los componentes mayoritarios	Tipo monoterpenoide	Prevalcen Mono terpenos C10. Esencias de albahaca, salvia, menta, etc.	
	Tipo sesquiterpenoide	Abundan sesquiterpenos c15. Esencia de ciprés, copaiba, pino, etc.	
	Compuestos oxigenados	Ricos en compuestos oxigenados, ésteres, alcoholes, aldehídos. Esencia de geranio, jazmín. Lavanda, ylang-ylang.	

**Fuente:** Peña R." Elaboración y evaluación de la actividad antiinflamatoria de un gel a base de aceite esencial de *Senecio Graveolens Wedd* (Wiskataya) en animales de experimentación" <sup>30</sup>

## 2.4.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DESTACABLES DE LOS ACEITES ESENCIALES

Las más importantes son la volatilidad, la inestabilidad ante la luz, del oxígeno, ante la presencia de oxidantes, reductores, medios con pH extremos, o trazas de metales que pueden catalizar reacciones de descomposición, etc. Esta inestabilidad, que resulta en un problema para la conservación o formulación de las esencias, puede ser un factor interesante cuando se trata de utilizarlas para la síntesis química, pues una molécula reactiva, y solamente es necesario fijar las condiciones para poder aprovechar esta reactividad química de los productos aromáticos y orientar su transformación hacia productos deseables.<sup>40</sup>

Otra propiedad destacable de los constituyentes de una esencia es sus variabilidades estructurales, lo que permite generar por semisíntesis estructuras novedosas. En cuanto a sus solubilidades, tienen la particularidad de que, si bien son solubles en medio no polar son más liposolubles cuanto mayor contenido de monoterpenos tengan, también suelen tener una alta solubilidad en etanol, lo que es ampliamente explotado en la elaboración de fragancias y extractos hidroalcohólicos para las industrias farmacéuticas y cosméticas. Para estos fines también suelen aprovecharse sus solubilidades en agua: agua de rosas, de azahar.<sup>40</sup>

Los aceites esenciales refractan la luz polarizada, propiedad que es usada para su control de pureza, pues tienen por ello un índice de refracción característico, en razón de que poseen en su composición numerosos productos ópticamente activos. Poseen una densidad normalmente menor que la del agua, excepto algunas esencias como la del clavo y en general son líquidos (la esencia de palo santo: *Bulnesia sarmietoi*, es una excepción) traslucidos y amarillentos o pardo amarillento (algunas esencias poseen un color muy particular, como el azul de la manzanilla alemana (*matricaria recutita*, o el verde de la bergamota).<sup>40</sup>

## 2.5. LOS FITOFÁRMACOS

La organización mundial de la salud (OMS), define a los fitofármacos, como: productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con finalidad profiláctica, curativa, paliativa o para fines de diagnóstico. Se caracteriza por el conocimiento de su

eficacia y de los riesgos de uso, así como para la reproducibilidad y la constancia de su calidad. <sup>10</sup>

En Europa, los fitofármacos forman parte de los medicamentos oficiales y son evaluados en cuanto a su eficacia, calidad, seguridad, y normas que deben cumplir, como los medicamentos convencionales. <sup>10</sup>

### 2.5.1 EXIGENCIAS DE CALIDAD, SEGURIDAD Y EFICACIA

En sí, la fitoterapia es la ciencia que estudia el uso de las plantas medicinales y las incorpora en formas farmacéuticas (fitofármacos), cuya calidad, seguridad y eficacia están garantizadas, teniendo en cuenta las características de las drogas vegetales y extractos. La calidad, la seguridad y la eficacia, se determinan a través de análisis químicos, físicos y microbiológicos. <sup>10</sup>

Algunos elementos a tomar durante el análisis son: características organolépticas, porcentaje de humedad, pH, viscosidad, variación de peso, llenado de volumen, y otras (dependiendo de la forma farmacéutica en que se presenten). <sup>10</sup>

### 2.5.2 PASOS QUE LLEVAN A LA PRODUCCIÓN DE UN FITOFÁRMACO

#### **Exigencias de uniformidad** <sup>10</sup>

- Autenticación de la especie empleada: género y especie
- Partes de la planta que son usadas: raíz, corteza, hojas, flores.
- Factores ambientales: clima, altura, fertilidad del suelo, etc.
- Condiciones de la cosecha
- Contaminación de ingredientes herbarios: insectos, hongos, excretas, Pb, Mn; hg.
- Buenas prácticas de manufactura: control de calidad.
- Estandarización de los extractos.

#### **Control de calidad** <sup>10</sup>

- Aspectos químicos y microbiológicos
- Control del material de envase y empaque
- Controles de proceso
- Controles químicos, microbiológicos y organolépticos de producto terminado.

- Calidad, seguridad y eficacia: exigencias de calidad (FARMACOPEAS), seguridad y eficacia (literatura científica), necesidad de ensayos clínicos, evaluación de la información (Min. salud), aporte de monografías (Comisión E, ESCOP, OMS), responsabilidad profesional.

## **2.6. ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO**

### **2.6.1 ASPECTOS ÉTICOS A CONSIDERAR PARA EL TRABAJO CON ANIMALES**

En virtud al trato humanitario y mitigar el dolor de los animales utilizados en esta investigación, se consideran las “Normas Internacionales en Investigación Biomédicas que involucra el uso de animales”. Esta reglamentación ha sido elaborada por el consejo de organizaciones internacionales de Ciencias Médicas en Ginebra 1986. <sup>41</sup>

#### **2.6.1.1 Características de los animales de laboratorio**

Estos son animales que tienen una calidad genética y ambiental controlada y asegurada y es capaz de dar una respuesta confiable y reproducible, se debe considerar para su bienestar las características de la especie y sus requerimientos etológicos. Los principales factores ambientales que afectan a los animales pueden ser de diferentes tipos: climáticos, fisicoquímicos, habitacionales, nutricionales, presencia de microorganismos y parásitos, situación experimental, entre otros. <sup>42</sup>

Para poder obtener este tipo de animal se deben establecer estrictas medidas y condiciones bajo las cuales se producen y reproducen los animales en los bioterios, esto se conoce como barreras, abarca la temperatura, nivel de ruido, intensidad de la luz, esterilización de agua, comida y cama, control microbiológico, ropa adecuada para el personal que labora, etc. Estas garantizan las condiciones tanto genéticas como sanitarias. <sup>42</sup>

Las barreras que permiten la separación del ambiente externo, minimizan el riesgo de posibles contaminaciones con organismos no deseados o microorganismos patógenos. <sup>42</sup>

#### 2.6.1. 2 Principios éticos específicos que aseguran el bienestar: <sup>43</sup>

- Posibilitar el mínimo de manipulaciones al animal y las intervenciones en su entorno, evitando perturbarlo o provocarle reacciones de alerta o refugio. <sup>43</sup>
- Ofrecerle un entorno confortable y protegido en cuanto a agentes físicos, químicos y biológicos. <sup>43</sup>
- Lograr la seguridad del confinamiento, evitando su escape o fuga, la penetración de otros animales, la exposición a daños y la ausencia de peligros. <sup>43</sup>
- Las áreas de alojamiento de los animales deben ser específicas para este propósito y responder a los requerimientos establecidos, para la actividad de que se trate. <sup>43</sup>
- Lograr los objetivos del experimento, ensayo o validación con el mínimo de variables de tiempo y de animales. <sup>43</sup>

#### 2.6.1.3 Condiciones ambientales estandarizados y controlados para el mantenimiento de animales de experimentación (ratones) <sup>44</sup>

##### MICROAMBIENTE <sup>44</sup>:

- Los ratones se alojaron en jaulas especialmente diseñadas para facilitar su bienestar, fueron de plástico (polipropileno, policarbonato, poliestireno y polisulfano), provistas de tapa de acero inoxidable.
- La altura de las paredes de la caja no fue menor de 12,7 cm.
- Los lechos fueron de viruta de madera (pino blanco), libres de polvillo, alérgenos y sustancias tóxicas.
- El agua usada fue destilada y se suministró libremente al animal, en bebederos de plástico.
- La alimentación consto de alimentos estériles traídos del INS (Instituto Nacional de Salud).

##### MACROAMBIENTE <sup>44</sup>:

- El ambiente donde se procedió a la conservación de los ratones, así como las jaulas donde se alojaron contaron con una ventilación adecuada.
- La iluminación se distribuyó adecuadamente a través de la sala de alojamiento y fueron lo suficiente para las prácticas de mantenimiento,

inspección y bienestar de estos, sin causarles signos clínicos a los animales.

- La temperatura ambiental a la que estuvieron los ratones fue de 20 °C.
- No se utilizó desinfectantes que emanen olores, que sean irritantes y mucho menos desodorizantes, dentro de los ambientes donde se alojaron los ratones.

#### 2.6.1.4 Reglamento del comité Institucional de Bioética en Investigación de la Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco <sup>45</sup>

El Comité Institucional de Bioética en Investigación de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, se constituye por la necesidad de instaurar en los trabajos de investigación de la universidad los principios y parámetros bioéticos concordantes con la reglamentación y normatividad nacional e internacional sobre bioética en investigación, que impliquen investigación en seres humanos, utilización de sus datos personales o de muestras biológicas de origen humano, experimentación animal, vegetal o empleo de agentes biológicos o de organismos genéticamente modificados, no sólo cumplan los requisitos establecidos en cada caso por la legislación vigente, sino que cuenten también con la autorización expresa emitida por el Comité Institucional de Bioética en orden a la protección de los derechos fundamentales de la persona, el bienestar de los animales y el medio ambiente y al respeto de los principios y compromisos bioéticos asumidos por la comunidad científica. <sup>45</sup>

##### 2.6.1.4.1 FINALIDAD Art 4°

El CBI-UNSAAC tiene como finalidad fundamental salvaguardar: <sup>45</sup>

- El derecho a la vida, a la integridad física y psicológica, a la salud, a la intimidad, a la dignidad y al bienestar de la(s) persona(s), que participan en un proyecto de investigación como personas de evaluación. <sup>45</sup>
- La preservación de la integridad y la salud de los animales en experimentación siempre que sea posible y evitar el sufrimiento innecesario. <sup>45</sup>
- La preservación y conservación de los recursos vegetales y material genético no humano protegido, objetos de investigación. <sup>45</sup>



- La preservación y conservación del medioambiente y ecosistemas en la investigación, los cuales no deben tener impactos negativos o ser minimizados al máximo. <sup>45</sup>
- La integración a redes nacionales e internacionales relacionados a la bioética en investigación. <sup>45</sup>
- Los principios para la conducta más apropiada de los investigadores respecto al ser humano, la vida humana, no humana (animal y vegetal). <sup>45</sup>

## 2.7. EL DOLOR

El dolor es un síntoma desagradable, pero ante todo un reflejo y mecanismo de protección, que se activa contra agresiones físicas, químicas o mecánicas, después que ha ocurrido un traumatismo o una lesión tisular. Evita que el uso o el contacto con la zona afectada, interfiera con los procesos de cicatrización, regeneración celular o restablecimiento de las funciones perdidas. El dolor es de tipo variado y origen múltiple, por lo tanto, son varios los componentes del mismo y muy variados los neurotransmisores comprometidos en su intensidad y modulación. <sup>3</sup>

### 2.7.1 MECANISMO DEL DOLOR

El conocimiento de la neuroanatomía y de la neurofisiología del dolor constituyen las bases que sustentan su tratamiento racional. De ahí la importancia clínica de conocer estos procesos en forma general. Los fenómenos que participan en el proceso nociceptivo son: <sup>46</sup>

- **Transducción:** Proceso por el cual el estímulo nocivo periférico se transforma en un estímulo eléctrico. <sup>46</sup>
- **Transmisión:** Propagación del impulso nervioso hasta los niveles sensoriales del SNC. <sup>46</sup>
- **Modulación:** Capacidad que tienen los sistemas analgésicos endógenos de modificar la transmisión del impulso nervioso, fundamentalmente inhibición en las astas dorsales de la médula, pero aparentemente también a otros niveles (periférico, por ejemplo). <sup>46</sup>
- **Percepción:** Proceso final en que los tres primeros, interactuando con una serie de otros fenómenos individuales, crean la experiencia subjetiva y emocional denominada dolor. <sup>46</sup>

## 2.7.2. TIPOS DE DOLOR

La clasificación del dolor resulta útil para organizar su abordaje terapéutico. <sup>47</sup>

El dolor se puede clasificar según su duración en el tiempo en agudo o crónico: <sup>47</sup>

- El dolor agudo es una señal biológica esencial de la posibilidad o la extensión de una lesión. Generalmente es de corta duración, horas, a veces días, a nivel efectivo se acompaña de ansiedad. Es útil, alerta sobre la inminencia de una lesión. Ejemplo la artritis infecciosa o microcristalinas y la osteonecrosis aséptica entre otros. <sup>47</sup>
- El dolor crónico se define como el dolor persistente durante 3 a 6 meses, si bien sus rasgos característicos pueden presentarse antes o después de este periodo de tiempo. Puede deberse a la cornificación de un dolor agudo, a una enfermedad crónica, o a dolores agudos pero recurrentes en el tiempo, no tiene utilidad biológica. Se acompaña de signos vegetativos, laxitud, alteraciones del sueño, anorexia, adelgazamiento, disminución de la libido, y estreñimiento. Ejemplo las periartrosis crónicas, la artrosis, la osteoporosis. <sup>47</sup>

Tomando en cuenta la estructura de la neuroanatomía implicada en la patogenia del dolor se puede dividir en: <sup>47</sup>

- **Nociceptivo:** originado a nivel de receptores nociceptores, es proporcional al grado de activación de estos. Pudiendo ser agudo o crónico. <sup>47</sup>
- **Neuropático:** por lesión de vías dolorosas periféricas (más frecuentes) o centrales. Persiste, aunque no progrese la enfermedad. <sup>47</sup>
- **Psicógeno:** que es el dolor que no coincide con distribución anatómica, no hay patología orgánica que lo justifique. <sup>47</sup>

De acuerdo a la topografía hablamos de: <sup>47</sup>

- **Dolor superficial:** se produce por estímulos que actúan sobre la piel y mucosas o sobre las fibras nerviosas que las inervan. Se localizan con precisión. <sup>47</sup>
- **Dolor visceral(profundo):** nace de la visera que contiene pocos nociceptores, es difuso y mal localizado, tiene importante componente autonómico incluso el shock. Ejemplo el cólico hepático. <sup>47</sup>

- **Dolor referido:** que es el dolor profundo percibido en una estructura distinta de aquella que sufre la injuria. La distribución sobre la piel de un segmento neurológico se llama dermatoma, la distribución sobre el musculo miotoma y en el hueso y articulación esclerotoma. <sup>47</sup>
- **Dolor radicular:** debido a la irritación o compresión de una raíz nerviosa, producen dolor irradiado a su dermatoma y dolor profundo y dolor profundo referido a su esclerotoma y miotoma. <sup>47</sup>

## 2.8. LA INFLAMACIÓN

### 2.8.1. DEFINICIÓN

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. <sup>2</sup>

### 2.8.2. ETIOLOGÍA

Ante una agresión de cualquier etiología, se desencadena un proceso inflamatorio mediado por factores humorales y celulares, que intenta limitar y reparar la lesión producida. La inflamación localizada es una respuesta de protección estrechamente controlada por el organismo en el lugar de la lesión. La pérdida de este control local o la aparición de una respuesta hiperactivada condiciona una repuesta sistémica que se conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica o SIRS. <sup>48</sup>

### 2.8.3. PROCESO INFLAMATORIO

De forma esquemática podemos dividir la inflamación en cinco etapas:

**1- Liberación de mediadores.** Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos. <sup>49</sup>

**2- Efecto de los mediadores.** Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. <sup>49</sup>

**3- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.** Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco. <sup>49</sup>

**4- Regulación del proceso inflamatorio.** Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso. <sup>49</sup>

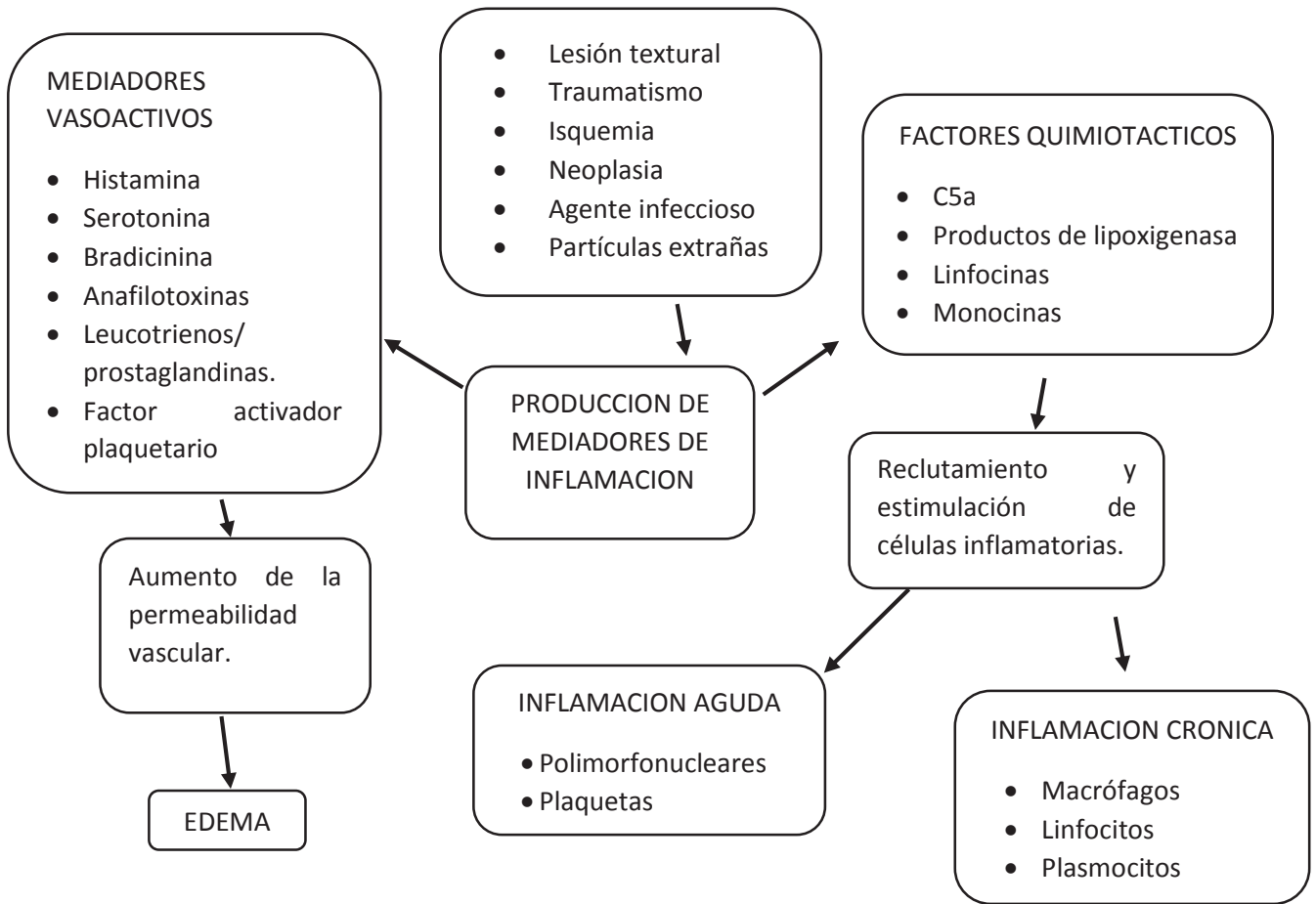
**5- Reparación.** Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria. <sup>49</sup>

#### 2.8.4. MEDIADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Los mediadores químicos de la inflamación, son los responsables de los acontecimientos que desencadenan la inflamación

- **Histamina.** Es un mediador ampliamente distribuido por el organismo, aunque se detecta principalmente en el mastocito y basófilo. Deriva, por descarboxilación, del aminoácido histidina. Actuando sobre los receptores H1 (histamina 1) de los vasos produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad. Como veremos posteriormente, cuando la histamina actúa sobre receptores H2 (histamina 2) produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación. <sup>50</sup>
- **Enzimas proteolíticas.** De las distintas enzimas proteolíticas liberadas por el mastocito, quizás la más interesante sea la kininogenasa que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre y denominadas kininógenos, produciendo su ruptura en péptidos más pequeños denominados kininas. Las kininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor. <sup>51</sup>
- **Factores quimiotácticos.** El ECF-A incluye dos tetrapéptidos de alrededor 500 d. de peso molecular que atraen eosinófilos al foco inflamatorio, induciendo simultáneamente la activación de estas células. El NCF es una proteína de un peso molecular superior a 750.000 d. con capacidad de atraer y activar al neutrófilo. <sup>52</sup>
- **Heparina.** Al inhibir la coagulación, favorece la llegada al foco inflamatorio desde la sangre de moléculas y células. Es, además, un factor regulador, por lo que será estudiado en el apartado correspondiente. <sup>49</sup>

FIGURA N° 1. Mediadores de la respuesta inflamatoria

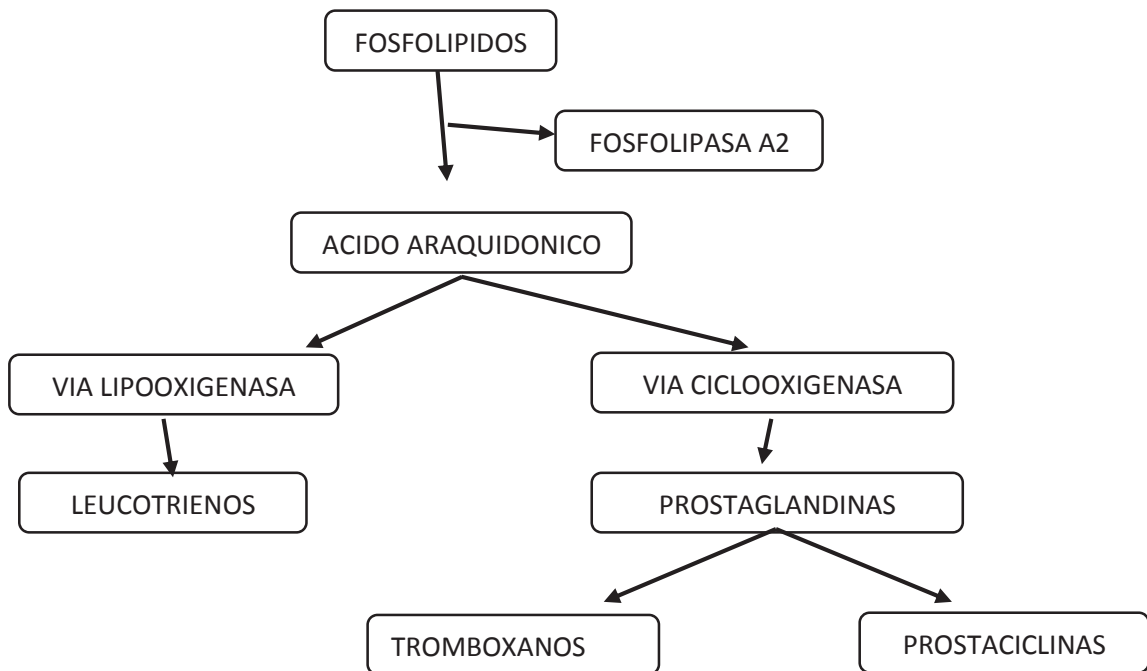


**Fuente:** Rubin Farber <sup>53</sup>

### 2.8.5. BIOSÍNTESIS DE LOS MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN

El ácido araquidónico se libera de los fosfolípidos por la activación de las fosfolipasas celulares (C, A2 o ambas). Una vez liberado, parte del ácido araquidónico es metabolizado en forma rápida hasta obtener productos oxigenados por acción de diferentes sistemas enzimáticos como la ciclooxigenasa o varias lipooxigenasas o familias de citocromo P-450. <sup>54</sup>

FIGURA N° 2. Mediadores de la inflamación derivados del ácido araquidónico



**Fuente:** Centro de Estudios De Trabajos De Investigación (CETIS) <sup>55</sup>

**La vía ciclooxigenasa:** La síntesis de prostaglandinas ocurre en forma gradual por un complejo de enzimas microsómicas de distribución muy amplia. En esta vía de síntesis, la primera enzima es la endoperóxido de prostaglandina, llamada también ciclooxigenasa. Existen 2 isoformas de la enzima que son reconocidas por sus iniciales COX-1, COX2. La primera se expresa en forma constitutiva prácticamente en todas las células y presenta gran ubicuidad, sin embargo, la COX2 no aparece en forma constitutiva en las células, pero puede ser inducida por citocinas, factores de crecimiento y endotoxinas, efecto que es bloqueado por la administración de corticosteroides. Las ciclooxigenasas actúan sobre el ácido araquidónico y provocan 2 acciones diferentes: una que oxigena y produce una estructura en anillo y forma el endoperóxido cíclico PGG<sub>2</sub> y una actividad de peroxidasa que transforma PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub>. <sup>54</sup>

**La vía de la lipooxigenasa:** Las lipooxigenasas catalizan la oxigenación de ácidos poliédricos hasta originar los hidroxiperóxidos lípidos. El ácido araquidónico, que contiene varias dobles ligaduras en su configuración, es su sustrato, el cual es metabolizado hasta dar diversos productos con el grupo hidroxiperóxido en distintas posiciones. Los metabolitos provenientes del ácido

araquidónico reciben el nombre de ácidos de hidroxiperoxieicosatetraenoicos (HPETE).<sup>54</sup>

## **2.9. ANALGESIA**

Eliminación de la sensación de dolor mediante el bloqueo artificial de las vías de transmisión del mismo y/o de los mediadores dolorosos, o por desconexión de los centros del dolor.<sup>7</sup>

### **2.9.1 TIPOS DE ANALGESIA**

- **Analgesia Tópica:**

La anestesia local tópica consiste en la aplicación directa del agente anestésico sobre la piel o mucosas, produciendo inhibición de estímulos dolorosos, táctiles y térmicos. Un buen anestésico tópico es aquel que produce un efecto anestésico del 100% en un corto período de tiempo y que es útil sobre piel intacta sin provocar efectos adversos locales o sistémicos.<sup>56</sup>

- **Analgesia local:**

La analgesia local impide la transmisión del potencial de acción a lo largo de los axones. El mecanismo de acción típico es el bloqueo de los canales del sodio que evita la despolarización del nervio produciendo analgesia limitada a una zona concreta del cuerpo. Los anestésicos locales se depositan en las inmediaciones de los nervios al bloquear mediante agujas (infiltración subcutánea, bloqueo regional), catéteres (bloqueo epidural caudal, lumbar o torácico), o de forma tópica (anestesia local de superficie).<sup>56</sup>

- **Analgesia sistémica:**

Es la aplicación de uno o varios fármacos por una vía de acceso rápido a la circulación sistémica como lo es la endovenosa, con la finalidad de suprimir el dolor.

1: DOLOR LEVE: Para el tratamiento del dolor leve el paracetamol y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son excelentes medicaciones para su uso por vía oral.<sup>56</sup>

2: DOLOR MODERADO: En el dolor moderado, según haya componente inflamatorio o no, se utilizarán los diferentes fármacos que se exponen a

continuación: metamizol, diclofenaco, codeína, naproxeno. Puede seguir utilizándose la vía oral, pero si no se controla el dolor pasaremos a la vía EV intentando evitar la vía intramuscular (IM) por ser dolorosa.<sup>56</sup>

3: DOLOR INTENSO E INSOPORTABLE: Si el dolor es intenso se puede administrar metamizol o ketorolaco y si no se controla el dolor se pasará a un opioide. Si lo que presenta es un dolor insoportable, es perentorio utilizar opioides, que asociados a metamizol o ketorolaco mejorarán la calidad de la analgesia y permitirán reducir la dosis del opioide.<sup>56</sup>

## 2.10. PIEL

La piel es un órgano complejo dinámico con muchos tipos de células y estructuras especializadas que tienen múltiples acciones cruciales para la salud y la supervivencia, la piel es la primera barrera de defensa del organismo y está expuesta a múltiples agresiones del medioambiente, tales como frío, calor, humedad, jabones, cosméticos y otros múltiples agentes fisicoquímicos entre los que destacan los medicamentos de uso tópico. La piel es uno de los órganos más grandes y versátiles que además proporciona diversas funciones únicas:<sup>57</sup>

- Protege a las células más profundas del ambiente (de la desecación, lesiones químicas, mecanizas, invasión microbiana, micótica, parasitaria y efectos dañinos de la luz ultravioleta).<sup>57</sup>
- Regula y ayuda a conservar la temperatura corporal.<sup>57</sup>
- Sirve como un órgano neuroreceptor en el control de diversos estímulos ambientales.<sup>57</sup>
- Procesa sustancias antígenas que se le presentan.<sup>57</sup>
- Proporciona un adorno cosmético con un órgano con estructuras especializadas -pelo, uñas- que también tienen una función protectora.<sup>57</sup>

### 2.10.1 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DE LA PIEL

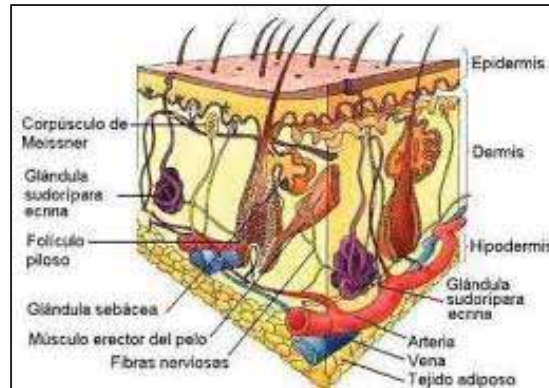
La piel está constituida por tres capas, situada horizontalmente, de superficie a profundidad:<sup>57</sup>

- Epidermis superficie.
- Dermis.
- Hipodermis profunda.



Además de otras estructuras (anexos) como: pelo, uñas, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas apocrinas y glándulas ecrinas.

### ILUSTRACIÓN N° 2. Estratificación de la piel



**Fuente:** Imagen de la piel [internet]

#### 2.10.2 EPIDERMIS

La epidermis es la parte más superficial y se encuentra constituida por dos grupos de células: queratinocitos o células no dendríticas y células dendríticas. Los queratinocitos a su vez se organizan en capas o estratos, que de la más superficial hacia adentro son: <sup>58</sup>

- Capa córnea
- Capa lúcida
- Capa granulosa
- Capa espinosa
- Capa basal

Dependiendo de las condiciones fisiológicas, la renovación de la epidermis abarca un periodo aproximado de 30 días, desde que se produce la división celular hasta llegar al desprendimiento de las células cornificadas. <sup>58</sup>

#### 2.10.3 DERMIS O CORION

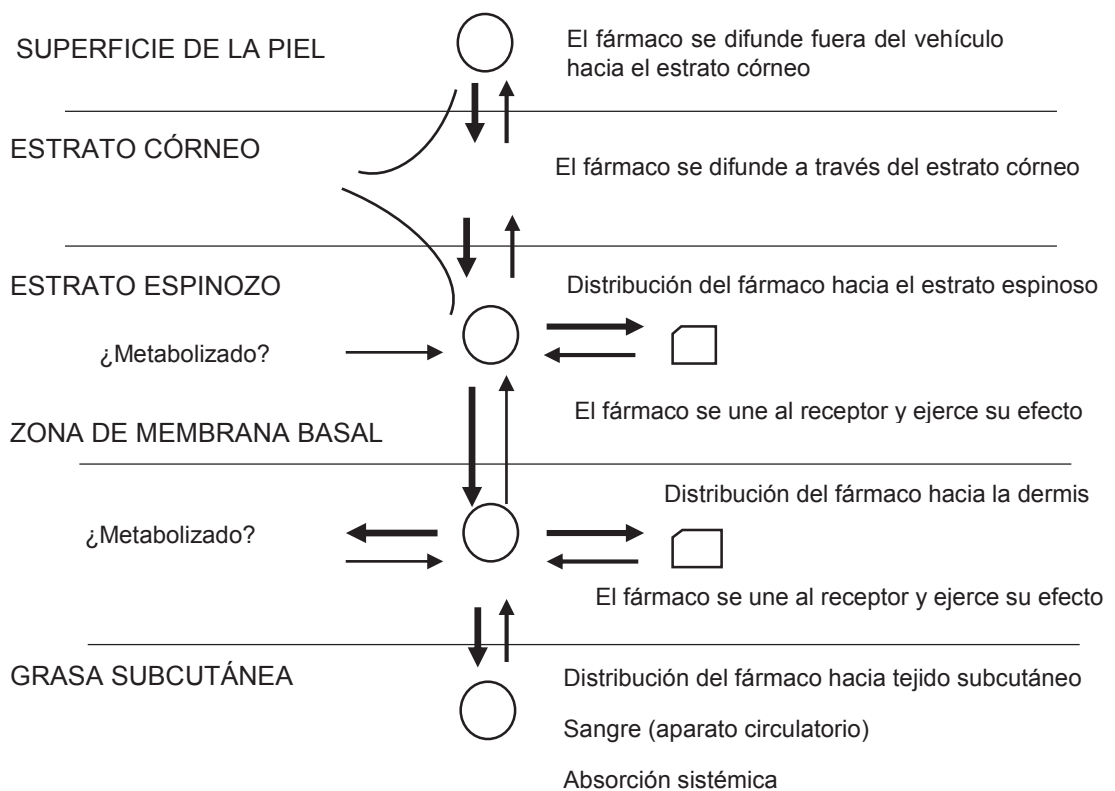
La dermis está situada por debajo de la epidermis y está constituida por tejido conectivo, sustancia fundamental y células. El tejido conectivo a su vez está formado por tres tipos de fibras: Colágenas, elásticas y reticulares. Las fibras colágenas son las más numerosas, la disposición y el grosor de las mismas, varía de acuerdo al nivel en que se encuentran: en la dermis superficial o papilar son

fibras delgadas, a diferencia de la dermis media y profunda, donde son más gruesas y se disponen en haces casi paralelos a la superficie de la epidermis. <sup>58</sup>

#### 2.10.4 FACTORES EN LA ABSORCIÓN CUTÁNEA:

La absorción cutánea se afecta por muchos factores: <sup>59</sup>

- 1) La absorción ocurre por difusión alrededor y a través de células que constituyen la piel. Hay cierta absorción a lo largo de los folículos pilosos o de los conductos sudoríparos. La colocación del fármaco no significa automáticamente que llegue al sitio pretendido de acción terapéutica.
- 2) Sustancias como solventes orgánicos pueden dañar el estrato corneo y permitir la penetración fácil por dichas sustancias químicas.
- 3) El grosor y permeabilidad de la piel son diferentes en distintas áreas.
- 4) Aplicando más cantidad de una sustancia se aumenta la cantidad absorbida. Sin embargo la absorción se detiene al saturar la piel. La absorción sistémica también se incrementa si la concentración de una sustancia es más elevada y si se expone un área mayor del cuerpo.
- 5) La piel enferma es más permeable que la de lactantes a término y adultos.
- 6) La piel enferma no necesariamente es más permeable que la normal.
- 7) La piel ocluida o bien hidratada es más permeable que piel seca o no ocluida.
- 8) El vehículo puede afectar la absorción del fármaco. Se han desarrollado muchos medicamentos para absorberse de manera óptima con vehículos específicos.



**Fuente:** Orkin "Dermatología".1994

## 2.11. DERMATITIS

Inflamación superficial de la piel, que se caracteriza histológicamente por edema epidérmico y clínicamente por la aparición de vesículas (cuando es aguda), enrojecimiento con límites mal definidos, edema, exudación, descamación, formación de costras, generalmente prurito, y liquenificación causada por el rascado y el frotamiento. <sup>60</sup>

- **DERMATITIS DE CONTACTO:** Es una inflamación aguda o crónica de la piel producida por sustancias que entran en contacto con ciertas sustancias que producen reacciones tóxicas (irritativas) o alérgicas. Según sea la patogenia se distingue una forma irritativa y otra alérgica. <sup>60</sup>
- **DERMATITIS DE CONTACTO ALÉRGICA:** Define una reacción eccematosa, en general de tipo agudo, como consecuencia del contacto de un alérgeno con la piel de un individuo previamente sensibilizado. <sup>60</sup>
- **DERMATITIS DE CONTACTO IRRITATIVA:** Define una reacción inflamatoria de la piel desencadenada por "irritantes primarios", es decir, todo agente físico o químico que aplicado a la piel a una concentración y/o

durante un tiempo determinado es capaz de ocasionar una lesión celular sin que participen mecanismos inmunológicos y, por tanto, sin necesidad de sensibilización previa.<sup>60</sup>

## 2.12. CARRAGENINAS

Las carrageninas forman parte de un grupo de polisacáridos sulfatados, que constituyen la estructura principal de ciertas variedades de algas rojas, de la clase *Rhodophyceae*. Estos polímeros son fuertemente aniónicos debido a la presencia de grupos sulfatos, lo cual facilita su interacción con moléculas catiónicas y anfotéricas, como las proteínas, a su vez, se caracterizan por ser solubles en agua, formando soluciones de alta viscosidad y/o geles, por lo que son ampliamente utilizadas en diversos productos dentro de la industria alimentaria<sup>61, 22</sup>.

Los diferentes tipos de carragenina comercial se presentan de dos formas, de acuerdo al grado de refinación que éstas tengan en su proceso de elaboración. Conforme a lo anterior, se encuentran la carragenina refinada, con un bajo contenido de impurezas y material celulósico y la semi-refinada, compuesta de carragenina y otros materiales de la pared celular. Ambos tipos se utilizan en diversas aplicaciones industriales, como en productos cárnicos, lácteos, y otros.<sup>62</sup>

### 2.12.1. Propiedades de las carrageninas

Las carrageninas son polímeros fuertemente aniónicos, de gran tamaño y peso molecular. Estas características, le confieren la capacidad de reaccionar con otras moléculas a través de diversos mecanismos, entre los que se incluyen los enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, para formar estructuras complejas que usualmente implican cambios en las propiedades físicas del sistema en que se aplican. Estas propiedades son aprovechadas ventajosamente en múltiples aplicaciones en la industria alimentaria.<sup>63</sup>

- **Viscosidad.** La funcionalidad de las carrageninas en la mayoría de sus aplicaciones, depende en gran parte de sus propiedades reológicas. Estos polímeros, tienen la propiedad de formar soluciones acuosas de alta viscosidad, debido a que poseen una estructura macromolecular lineal y a su naturaleza polielectrolítica. La repulsión entre los grupos de éster sulfato cargados negativamente alrededor de las cadenas, hace que la

molécula permanezca extendida, mientras que su naturaleza hidrofílica, hace que ésta quede cubierta por moléculas de agua. <sup>22</sup>

- **Gelificación.** Las carrageninas forman geles termorreversibles bajo las condiciones de solvente y ciclos de calentamiento y enfriamiento apropiados. <sup>22</sup>
- **Solubilidad.** El proceso de solubilización, comprende una hidratación de las moléculas de carragenina en función de la concentración, tipo de cationes presentes, temperatura del agua y medio de dispersión. <sup>22</sup>
- **Estabilidad.** La mayor estabilidad de las soluciones de carragenina se encuentra entre pH 11,0 a 4,5, mientras que el gel es estable entre pH 12,0 a 3,7. Bajos valores de pH junto a la alta temperatura causa la hidrólisis de las moléculas de carragenina, lo que a su vez, origina una baja en la viscosidad y disminución de la fuerza del gel, sin embargo, una vez formado el gel no hay hidrólisis. <sup>22, 63</sup>
- **Interacción con proteínas.** La capacidad de las carrageninas de reaccionar con las proteínas, depende de múltiples factores, tales como la concentración de carragenina, tipo de proteína, pH y punto isoeléctrico de la proteína. <sup>64</sup>

## 2.13 CREMAS

Son pomadas multifasicas constituidas por dos fases una fase lipofílica y otra hidrofílica. <sup>23</sup>

### 2.13.1 CLASIFICACIÓN

#### a) CREMAS HIDRÓFOBAS (W/O)

La fase continua o externa es la fase lipofílica debido a la presencia en su composición de tensioactivos tipo W/O. <sup>23</sup>

- Emulsión (W/O):  
Todas las bases de absorción citadas, por incorporación de agua, producen emulsión W/O, la utilización de este tipo de emulsiones para la preparación de cremas refrescantes y/o como vehículos de medicamentos tópicos o penetrantes. <sup>23</sup>

## **b) CREMAS HIDRÓFILAS (O/W):**

La fase externa es de naturaleza acuosa debido a la presencia en su composición de emulgentes tipo O/W, tales como jabones sódicos o de alcoholes grasos sulfatados y polisorbatos, a veces combinados en proporciones convenientes con emulgentes tipo W/O. <sup>23</sup>

- Emulsión (O/W)

En casos de piel normal o de ligera resequedad se recomienda el uso de una emulsión O/W ya que las gotitas oleosas de la preparación se sitúan dentro de la fase acuosa, se absorben rápidamente sin dejar un rastro oleoso, la parte acuosa se evapora generando un efecto refrescante, la fase oleosa engrasa la piel y son solo levemente oclusivas. <sup>23</sup>

## **2.14. FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS**

Tanto los antiinflamatorios esteroidales como los no esteroidales (AINES), están ligados a sus poderes inhibitorios en diferentes pasos en la cascada del ácido araquidónico.

### **2.14.1. LOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)**

Son un grupo de fármacos ampliamente empleados gracias a sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antipiréticas e inhibitoras de la función plaquetaria. En cuanto a su mecanismo de acción, actúan inhibiendo la ciclooxigenasa (COX), provocando a su vez la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas; existen dos formas distintas de COX (COX-1 Y COX-2), ambas son inhibidas por los AINES, pero codificadas por distintos genes, la COX-1 por un gen localizado en el cromosoma 9 y la COX-2 por un gen ubicado en el cromosoma 1. Los inhibidores COX-2 selectivos, actúan uniéndose a estructuras características que están ausentes en COX-1, la posición 120 de ambas isoformas poseen arginina que están ausentes en COX-1 no específicos, bloqueando de esta manera al sustrato natural de estas enzimas (ácido araquidónico) por otra parte la posición 523 de COX-1 posee isoleucina y COX-2 valina, manifestándose en esta última un receptáculo lateral, al que solo se pueden unir agentes selectivos COX-2. La COX-1 es la forma no inducible (constitutiva – mantiene la función normal de las células), posee una secuencia más corta de aminoácidos y favorece la producción de prostaciclina, que tiene efecto antitrombogénico y efecto citoprotector sobre la

mucosa gástrica. La inhibición de esta isoenzima (COX-1) está asociada con la presencia de efectos colaterales, en especial irritación de la mucosa gástrica y efectos tóxicos a nivel renal. La forma inducible (COX-2) es sintetizada cuando los macrófagos y otras células antiinflamatorias son activadas en respuesta a mediadores inflamatorios, recientemente se ha demostrado ser constitutiva en algunos órganos como pulmón, cerebro y riñones; la COX-2, en el riñón, posee función hemodinámica, como balance hidroelectrolítico renal, entonces, tanto los inhibidores de COX-2 como los AINEs no selectivos tradicionales, están asociados a cierta toxicidad renal (hiperkalemia y retención de agua). En otros tejidos, donde su producción es exagerada, su inhibición es necesaria para que los AINEs ejerzan su actividad antiinflamatoria. Compuestos como piroxicam, fenoxicam, diclofenaco sódico y ácido acetilsalicílico inhiben la quimiotaxis de los leucocitos polimorfonucleares.<sup>8</sup>

Las acciones farmacológicas de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son:

#### 2.14.1.1. Efecto analgésico:

El mecanismo de acción de los AINEs es en consecuencia directa de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Aunque se observa que muchos AINES son más efectivos como analgésicos y menos poder antiinflamatorio, o por el contrario presentar un poder antiinflamatorio y carecen de actividad analgésica; o predominar ambas acciones. La capacidad de tener la actividad analgésica y/ o antiinflamatoria depende de la selectividad del medicamento para inhibir la actividad del COX, y por ende la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas.

<sup>65</sup>

#### 2.14.1.2. Efecto antipirético:

Un signo común de los procesos febriles es la liberación de las citosinas interleucina (IL-1, IL-6), factor de necrosis tumoral alfa, producidas por los leucocitos y otros tipos de células en respuesta a los agentes invasores, que al liberarse actúan como pirógenos endógenos primarios. Estas citosinas incrementan la síntesis de prostaglandinas (PGE2) en el área hipotalámica.<sup>65</sup>

#### 2.14.1.3. Efecto sobre la función plaquetaria:

Dismuyendo la agregación plaquetaria por inhibición de la ciclooxigenasa.

#### 2.14.1.4. Efectos antiinflamatorios y antirreumáticos:

Es especialmente beneficioso en el tratamiento de enfermedades musculoesqueléticas, como artritis reumatoide, artrosis, etc., por inhibición de la síntesis de prostaglandinas.<sup>65</sup>

### 2.14.2. FÁRMACO PATRÓN

#### 2.14.2.1. DICLOFENACO

El diclofenaco es el primero de una serie de derivados del ácido fenilacético que se desarrollaron como agentes antiinflamatorios.<sup>8</sup>

**a) Propiedades farmacológicas.** El diclofenaco posee actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria; es un inhibidor de la ciclooxigenasa y su potencia es sustancialmente mayor que la de la indometacina, el naproxeno o varios otros agentes, Además el diclofenaco parece reducir las concentraciones intracelulares de araquidonato libre en los leucocitos, tal vez mediante la alteración de la liberación o captación del ácido graso.

<sup>8</sup>

**b) Usos terapéuticos.** El diclofenaco está aprobado para el tratamiento sintomático prolongado de la artritis reumatoidea, a la osteoartritis y la espondilitis anquilosante. Puede ser útil para el tratamiento breve de lesiones musculoesqueléticas agudas, hombro doloroso agudo (tendinitis bicipital y bursitis subdeltoidea), dolor posquirúrgico y dismenorrea.<sup>8</sup>

**c) Propiedades farmacocinéticas y metabolismo.** La cantidad de diclofenaco que penetra la piel depende de la dosis total y del estado de hidratación de la piel (la piel hidratada es más permeable que la piel seca); asimismo es proporcional al tiempo en que el producto es mantenido sobre la piel y a la extensión de la zona tratada. La absorción transdérmica es de aproximadamente el 6% de la dosis en comparación a los comprimidos. Difunde ampliamente por los tejidos, sufre metabolización hepática y su excreción y la de sus metabolitos es principalmente urinaria. Las concentraciones plasmáticas máximas que se obtienen a partir de la



formulación de uso externo son aproximadamente 100 veces menores que las obtenidas a partir de la forma oral comprimidos.<sup>8</sup>

**d) Preparados, vía de administración y dosis.** La dosis se ajustará según criterio médico a las características del cuadro clínico. Como posología se aconseja a adultos y niños mayores de 12 años, la aplicación de 3 ó 4 veces por día.<sup>8</sup>

**e) Efectos tóxicos.** Se ha descrito ocasionalmente dermatitis de contacto alérgica o no alérgica, con signos y síntomas de prurito, eritema, edema, enrojecimiento cutáneo, erupciones cutáneas tales como exantema bulloso o papular, vesículas o descamación; parestesias, contracciones musculares involuntarias.<sup>8</sup>

Generalmente la absorción sistémica del diclofenaco tópico es baja comparada con la administración oral y por lo tanto los efectos adversos sistémicos son menores en frecuencia. Sin embargo, cuando es aplicado sobre grandes superficies de piel y/o durante períodos prolongados, existe la posibilidad de efectos adversos a nivel gastrointestinales, se han observado hemorragia y ulceración o perforación de la pared intestinal.

Otras respuestas indeseables del diclofenaco incluyen efectos sobre el SNC, reacciones alérgicas, retención hídrica y, rara vez, deterioro de función renal, la droga no se recomienda en niños, mujeres embarazadas o que amamantan.<sup>8</sup>

# **CAPITULO III**

### 3.1. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1.1. Material

##### a) Material botánico:

- Parte aérea de la planta (aceite esencial) de *Schinus molle* “molle” (hojas).

##### b) Material biológico:

- **Para el estudio:** se utilizaron ratones albinos de la cepa balb/c entre 2 y 3 meses de edad, procedentes del Centro Nacional de Productos Biológicos Bioterio del Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú.

##### a) Material de campo:

- Bolsas de polietileno.
- Tijeras podadoras
- Etanol de 96
- Altímetro
- Cuadernos de apunte
- Cámara

##### b) Materiales de laboratorio:

- Baguetas
- Embudos
- Goteros
- Gradillas
- Matraces
- Morteros y pilones
- Papel indicador
- Papel filtro
- Pipetas
- Probetas
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado
- Guantes quirúrgicos
- Picnómetro
- Lápiz marcador
- Termómetros

- Jeringas 1cc
- Baño maría.
- Destilador de agua

**c) Instrumentos de laboratorio:**

- Balanza analítica sensible al 0.001g.
- Pletismometro Digital LE7500 (76-0220)
- Equipo de Hot Plate LE7406 (76-0113)
- Cromatógrafo de gases
- Micropipeta
- Refractómetro digital AR200
- Polarometro Atago AP-300
- Agitador Vortex
- Bioterio MG-BIOTERIO-2, Marca ORCHID-Modelo SMC01

**d) Reactivos de laboratorio**

- Carragenina 1%
- Cloruro de sodio 0.9%
- Agua destilada
- Bencina
- Metanol
- Éter etílico
- Hexano
- Éter de petróleo
- Benceno
- Acetona
- Tween 80
- Acetato de etilo

**e) fármaco patrón empleado**

- Diclofenaco 1% (Voltaren - cremigel)

**f) Insumos para preparación de la crema**

- Alcohol Cetílico
- Cera De Abeja
- Propilenglicol
- Lauril sulfato de Sodio
- Nipagin

- Nipasol
- Agua Destilada
- Aceite Mineral
- Ácido Esteárico
- Alcohol Cetílico
- Glicerina
- K(OH)
- Tween 80
- Cera Lanette
- Agua Destilada
- Trietanolamina

## **3.2. DISEÑO METODOLOGICO**

### **3.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

Presenta un diseño cronológico en grupos de experimentación con la crema base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a diferentes concentraciones con el objeto de analizar efecto analgésico mediante el método de Hot Plate en 4 series cronológicas y la inflamación con carragenina al 1% en una serie cronológica.

El estudio es prospectivo porque permite la observación de los efectos producidos (efecto analgésico y antiinflamatorio) a partir de los factores (aplicación del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”) a los que se les trata de buscar los efectos.

### **3.2.2. TIPO DE ESTUDIO**

El presente trabajo es un estudio de investigación experimental porque se manipulará deliberadamente una variable (independiente) la dosis del aceite esencial de *Schinus molle* “molle” con el objeto de analizar el efecto o causa sobre otras (dependiente) el efecto analgésico y antiinflamatorio en los animales de experimentación.

El estudio es descriptivo y observacional.

El estudio es cuantitativo porque se describirá y experimentará las variables de estudio (efecto analgésico y antiinflamatorio) a partir de la aplicación del aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a los que se les trata de buscar los efectos.

a) PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ANALGÉSICA:

Se distribuyó en 4 grupos y 1 grupo control (con medicamento control y sin aceite esencial).

G: grupo de 5 sujetos (animales de experimentación).

X: tratamiento, estímulo o condición experimental (presencia de algún nivel de la variable independiente).

O: medición a los sujetos de un grupo.

-: ausencia de estímulo (grupos controles).

G1	X1	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3
G4	X4	O4
G5	-	O5

Donde:

**G1, G2, G3, G4 Y G5=** Distintos grupos de 5 sujetos de experimentación.

**X1=** crema al 1 % de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.

**X2=** crema al 2.5 % de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.

**X3=** crema al 5% de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.

**X4=** administración de medicamento control: diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)

- = ausencia de estímulo (la crema sin aceite esencial).

**O1**= Salto o lamida de las patas del ratón mediante el método de **HOT PLATE** tras la aplicación de la crema al 1% de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**O2**= Salto o lamida de las patas del ratón mediante el método de **HOT PLATE** tras la aplicación de la crema al 2.5% de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**O3**= Salto o lamida de las patas del ratón mediante el método de **HOT PLATE** tras la aplicación de la crema al 5% de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**O4**= Salto o lamida de las patas del ratón mediante el método de **HOT PLATE** tras la aplicación de la crema patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel).

**O5**= Salto o lamida de las patas del ratón mediante el método de **HOT PLATE** la aplicación de la crema sin aceite esencial (placebo).

b) PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DOSIS ANTIINFLAMATORIA: se realizó en cuatro grupos y 1 grupo control (con medicamento control y sin aceite esencial).

G: grupo de 5 sujetos (animales de experimentación).

X: tratamiento, estímulo o condición experimental (presencia de algún nivel de la variable independiente).

O: una medición a los sujetos de un grupo.

-: ausencia de estímulo (grupos controles).

G1            X1            O1

G2            X2            O2

G3            X3            O3

G4            X4            O4

G5            -            O5

Donde:

**G1, G2, G3, G4 Y G5**= Distintos grupos de 5 sujetos de experimentación.

**X1**= crema al 1 % de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**X2**= crema al 2.5 % de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**X3**= crema al 5 % de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**X4**= administración de medicamento control: diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)

- = ausencia de estímulo (la crema sin aceite esencial).

**O1=** Edema plantar con carragenina tras la aplicación de la crema al 1% de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**O2=** Edema plantar con carragenina tras la aplicación de la crema al 2.5 % de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**O3=** Edema plantar con carragenina tras la aplicación de la crema al 5 % de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

**O4=** Edema plantar con carragenina tras la administración de medicamento control: diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel).

**O5=** Edema plantar con carragenina tras la aplicación de la crema sin aceite esencial (placebo).

### **3.2.3. MUESTRA**

- Se utilizó ratones albinos, distribuidos en 5 grupos de 5 ratones, escogidos al azar, para la determinación de la dosis analgésica y antiinflamatoria. <sup>27</sup>

### **3.2.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

#### **a) criterios de inclusión**

- **De la planta**

Se incluyeron las hojas enteras de la planta *Schinus molle* “molle”.

- **De los ratones albinos**

Se incluyó los ratones albinos de la cepa balb/c con un peso promedio de 20 a 30g, procedentes del Centro Nacional de Productos Biológicos Bioterio del Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú.

#### **b) Criterios de exclusión**

- **De la planta**

No se incluyó partes aéreas de la planta que estuviera dañada y/o maltratada, marchita u hojas secas, ni las contaminadas con hongos o las hojas que hayan enmohecido en el proceso de secado.

- **De los ratones albinos**

Se descartó el uso de ratones enfermos y aquellos que no tenían un peso promedio entre 20 y 30g.



### 3.2.5. VARIABLES IMPLICADAS

Variable independiente:

- Concentración de la crema:  
**Definición conceptual:** cantidad de principio activo presente en un preparado farmacéutico.  
**Definición operacional:**  
NATURALEZA: Cuantitativa  
MEDICION: Directa  
ESCALA DE MEDICION: Razón  
INDICADOR: Dosis del aceite esencial  
EXPRESION FINAL: % (peso/peso)

Variable dependiente:

- Efecto analgésico en los animales de experimentación  
**Definición conceptual:** El efecto analgésico de una droga es la manifestación de la acción farmacológica a la disminución del dolor, puede ser apreciado mediante aparatos sencillos. <sup>19</sup>  
**Definición operacional:**  
NATURALEZA: Cuantitativo  
MEDICION: Directa  
ESCALA DE MEDICION: Nominal  
INDICADOR: Salto o lamida de las patas del ratón  
EXPRESION FINAL: % del máximo efecto posible (MPE o % de antinocicepción)
- Efecto antiinflamatorio en los animales de experimentación  
**Definición conceptual:** Es la manifestación de una droga frente a la modificación de la respuesta inflamatoria por parte del huésped. <sup>19</sup>  
**Definición operacional:**  
NATURALEZA: Cuantitativo  
MEDICION: Directa  
ESCALA DE MEDICION: Nominal  
INDICADOR: Edema plantar inducido por carragenina  
EXPRESION FINAL: %Inhibición aguda

### 3.2.5.1. VARIABLES NO IMPLICADAS

VARIABLES INTERVINIENTES:

- De la planta en estudio:

**TABLA N° 2. VARIABLES INTERVINIENTES DE LA PLANTA EN ESTUDIO**

VARIABLE	Definición CONCEPTUAL	PARÁMETRO CONSIDERADO
Altitud de recolección	Altura en todas sus acepciones, especialmente la de un punto en la tierra con relación a nivel del mar. (SOPENA, 1965)	Altitud de la ciudad del Cusco 3300 m.s.n.m.  Coordenadas UTM de la provincia de Calca.  Longitud: 071°57'28.01" Latitud: S13°16'7.39"
PH del suelo	Representa el logaritmo de la unidad dividida por la concentración de iones de hidrogeno de una solución (BARCELO, 1982)	Acido  Alcalino
Temperatura de secado	Grado de calor de un cuerpo manifestado por la posibilidad de transmitir calor a otros que se encuentran en grado inferior. (BARCELO, 1982)	Temperatura ambiente 15 a 20°C

**Fuente:** Elaboración propia

- De los sujetos de experimentación:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL
Edad	Tiempo que ha vivido el animal	Meses
Peso	Fuerza con que la tierra atrae a los cuerpos, depende de la masa del cuerpo y de la aceleración de la gravedad en el lugar que se trata.	Gramos

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.2.6. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

TABLA N° 3. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLES		DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL				
			NATURALEZA	MEDICION	ESCALA DE MEDICION	INDICADORES	EXPRESION FINAL
INDEPENDIENTE	Concentración de la crema	Cantidad de principio activo presente en un preparado farmacéutico.	Cuantitativa	Directa	La razón	Dosis del aceite esencial	% (Peso/peso)
DEPENDIENTE	Efecto analgésico	Es la manifestación de la acción farmacológica a la disminución de dolor.	Cuantitativa	Directa	Nominal Ordinal	Salto del ratón o lamida de las patas delanteras.  Tiempo de dosificación de la crema.	% del máximo efecto posible (MPE o % de antinocicepción): % MPE = $100 \times [(L2 - L1) / (T1-L1)]$ Dónde: L1 = latencia basal, L2 = latencia postdroga, T1 = tiempo de corte.
	Efecto antiinflamatorio	Es la manifestación de una droga frente a la modificación de la respuesta inflamatoria por parte del huésped.	Cuantitativa	Directa	Nominal Ordinal	Edema plantar inducido por carragenina. Tiempo de dosificación de la crema	%Inhibición aguda=((problema-patrón)/problema) x 100

Fuente: Elaboración propia

### 3.3. PROCEDIMIENTO

El trabajo de investigación se realizó en la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias de la Salud, escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, en los laboratorios de Tecnología Farmacéutica y el Bioterio.

#### 3.3.1. MÉTODO DE PLACA CALIENTE (HOT-PLATE)

Este es un modelo de dolor somático clásico, test nocivo de calor-inducido que ha demostrado proveer un buen índice de actividad antinociceptiva de drogas en humanos. Este ensayo mide dolor agudo que es debido a la activación de nociceptores centrales en el tejido dañado, el punto de término es el salto o lamida de las patas y manos del ratón lo cual responde a un reflejo mediado por estructuras supra espinales.<sup>5</sup>

Descripción del método:

1. Los animales fueron colocados sobre una placa caliente a  $55 \pm 1^\circ \text{C}$ , que mantiene la temperatura mediante una bomba circuladora-calefactora controlada digitalmente, la latencia del signo de dolor (lamida de ambas patas delanteras o salto fuera de la superficie caliente) será registrada mediante un cronómetro.
2. Se determinó el tiempo de respuesta basal al estímulo nociceptivo térmico ( $55\text{-}60^\circ \text{C}$ ) Se realizaron 3 mediciones con un intervalo de 15 minutos para la determinación de la latencia basal y se establecerá la latencia basal como el promedio de las tres medidas.
3. Se calculó un valor de tiempo de permanencia máxima permitida (valor de cut off), según la siguiente fórmula.

*ECUACIÓN N° 1. Tiempo de cut off*

$$\text{cut off} = \frac{\text{latencia basal} \cdot 10}{4.5}$$

4. A continuación, se administró el fármaco en estudio y se determinó, en el momento de efecto máximo (previamente determinado) el tiempo que el animal tardaba en lamer ambas patas delanteras o saltar fuera de la superficie caliente
5. En ausencia de respuesta, y para evitar daño tisular en el animal, se le retiro del hot plate cuando transcurría un tiempo igual al cut off.
6. Se determinó la analgesia mediante la fórmula: % del máximo efecto posible (MPE o % de antinocicepción).

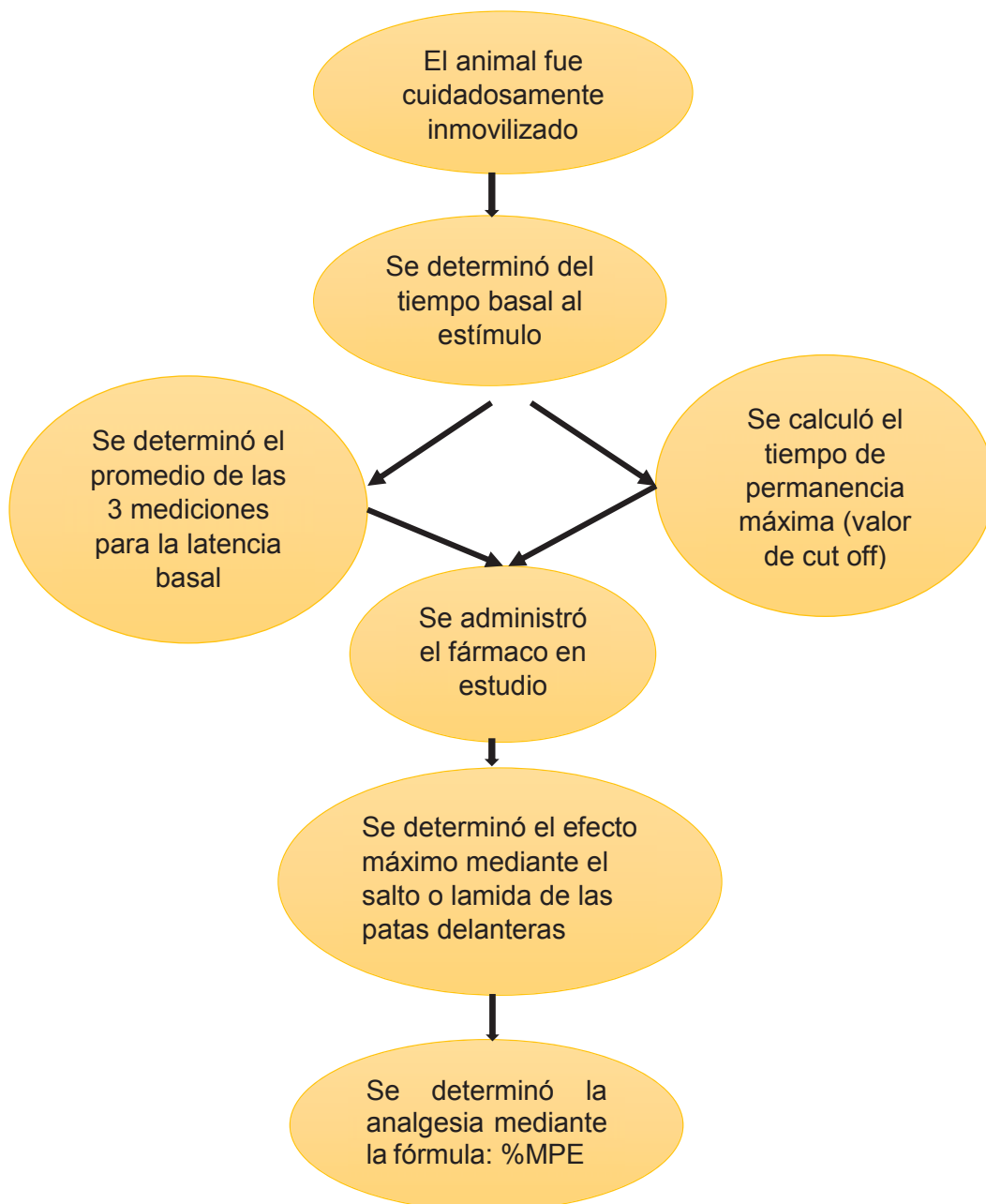
ECUACIÓN N° 2. Porcentaje del Máximo Efecto Posible

$$\%MEP = 100 \times \frac{(L2 - L1)}{(T1 - L1)}$$

**Fuente:** Bannon A., Malmberg A." Models of Nociceptor: Hot-Plate, Tail-lick and Formalin Test in Rodents" <sup>5</sup>

Donde: L1 = latencia basal, L2 = latencia postdroga, T1 = tiempo de corte.

FLUJOGRAMA N° 1. Determinación del efecto analgésico. Método de Hot Plate



**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3.2. METODO DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA. DETERMINACION EFECTO ANTIINFLAMATORIO <sup>6,66</sup>

El edema plantar causado por la aplicación de carragenina, fue elaborado por Winter et al. Siendo modificado posteriormente por Sugishita et al. (1981). <sup>66</sup>

El método de edema plantar inducido por carragenina consiste en la administración subcutánea de una solución de carragenina (un mucopolisacárido sulfatado extraído del alga marina *Chondus crispus* a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por la liberación de diversos factores del complemento que están implicados en la amplificación de la respuesta. <sup>66</sup>

Una hora después de la administración de la sustancia problema, la histamina y la serotonina tienen un papel principal como mediadores. Aproximadamente de una hora y media a dos horas y media después de la inyección de carragenina, intervienen en las cininas como mediadores. La última fase está mediada por prostaglandinas (PGE1, PGE2 y PGF2). La respuesta vascular máxima ocurre a las cuatro horas de la administración y coincide con la fase mediada por las prostaglandinas. La inflamación será medida con el Pletismómetro digital LE 7500 equipo que será utilizado en nuestro estudio. <sup>66</sup>

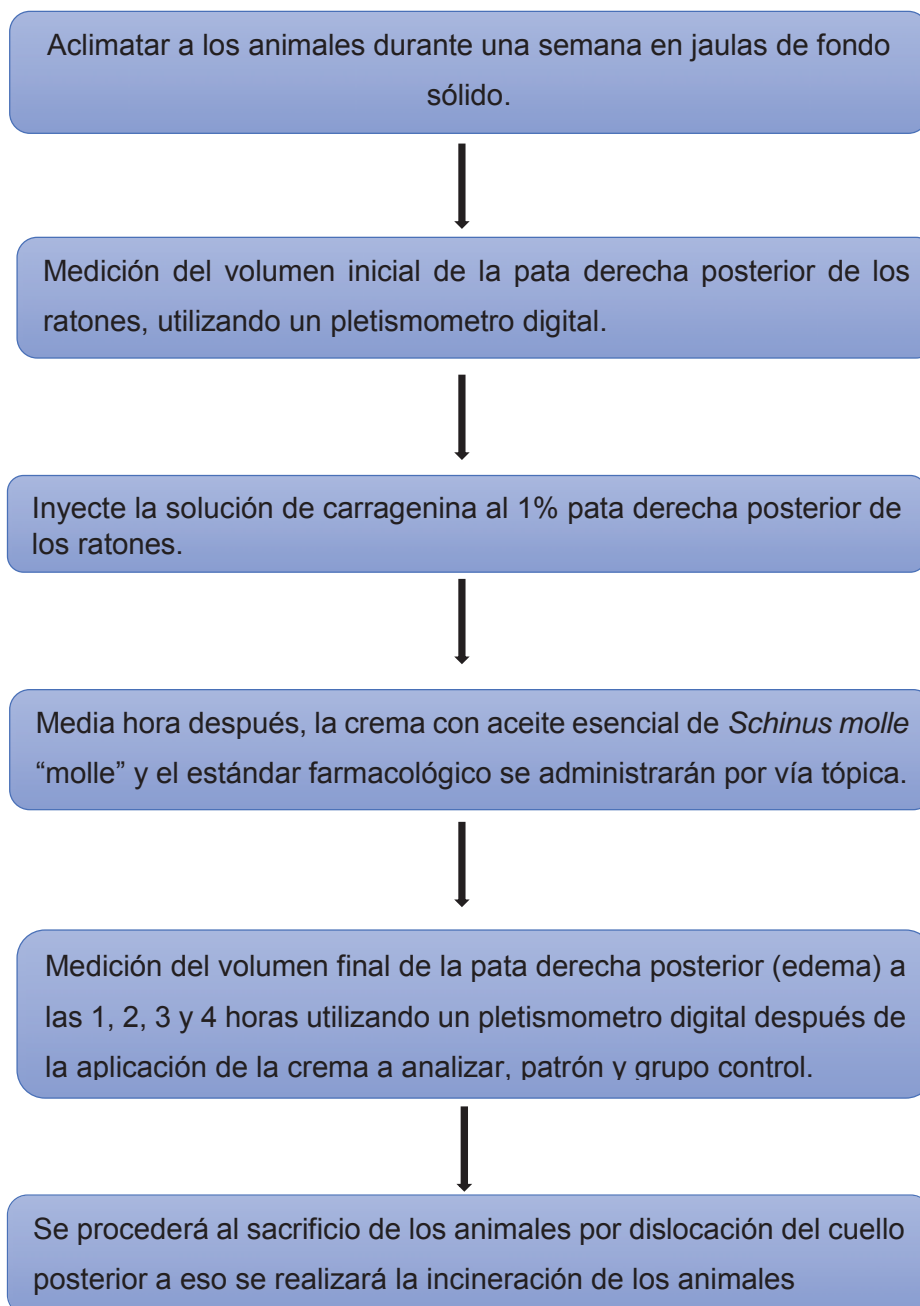
1. Se permitió a los animales aclimatarse durante 1 semana en jaulas de fondo sólido. Se usó virutas de madera en la parte inferior de las jaulas porque proporcionan una superficie más blanda. Los animales se aclimataron bajo condiciones estándar de iluminación y temperatura con alimentos y agua para eliminar los efectos del estrés.
2. Se hizo la medición del volumen inicial de la pata derecha posterior de los ratones en estudio, utilizando el pletismómetro digital.
3. Se limpió la superficie plantar de la almohadilla de pie con alcohol de 70% y se inyectó la solución (100 µl de carragenina).
4. Media hora después de la aplicación de la carragenina 1%, la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" y el estándar farmacológico se administraron por vía tópica.
5. Se hizo la medición del volumen final de la pata derecha posterior (edema) utilizando el pletismómetro digital a las 1, 2, 3 y 4 horas después de la aplicación de la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" a las concentraciones de 1%, 2.5% y 5%, patrón y el grupo control.
6. Se determinó el porcentaje de inhibición aguda (% Inhibición aguda) mediante la fórmula:

ECUACIÓN N° 3. Porcentaje de Inhibición aguda

$$\% \text{Inhibición aguda} = \frac{\text{problema} - \text{patrón}}{\text{problema}} \times 100$$

7. Se procedió al sacrificio de los animales.

FLUJOGRAMA N° 2. Determinación del efecto antiinflamatorio. Método del edema plantar inducido por Carragenina



Fuente: Elaboración propia

### 3.3.3. ESTUDIOS PRELIMINARES

#### 3.3.3.1. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE *Schinus molle* "MOLLE"

**Método gravimétrico:** Pérdida de peso por calentamiento. <sup>21</sup>

**Fundamento:** Basado en la pérdida de peso por el calentamiento a una temperatura de 50 a 100°C hasta obtener un peso constante. Por diferencia de pesos se halló la humedad y luego se determinó el porcentaje de humedad,

**Procedimiento:**

- Se pesó aproximadamente 5 gramos de la planta fresca y se traspasó a una placa de Petri previamente tarada.
- Se colocó en la estufa a una temperatura de 70°C.
- Se retiró de la estufa luego de 8 horas, se dejó enfriar para después pesar.

Cálculos:

*ECUACIÓN N° 4. Formula del porcentaje de humedad*

$$\%H = \frac{(P1 - P2)}{P1} \times 100$$

Donde:

%H: porcentaje de humedad.

P1: peso de la muestra fresca.

P2: peso de la muestra seca.

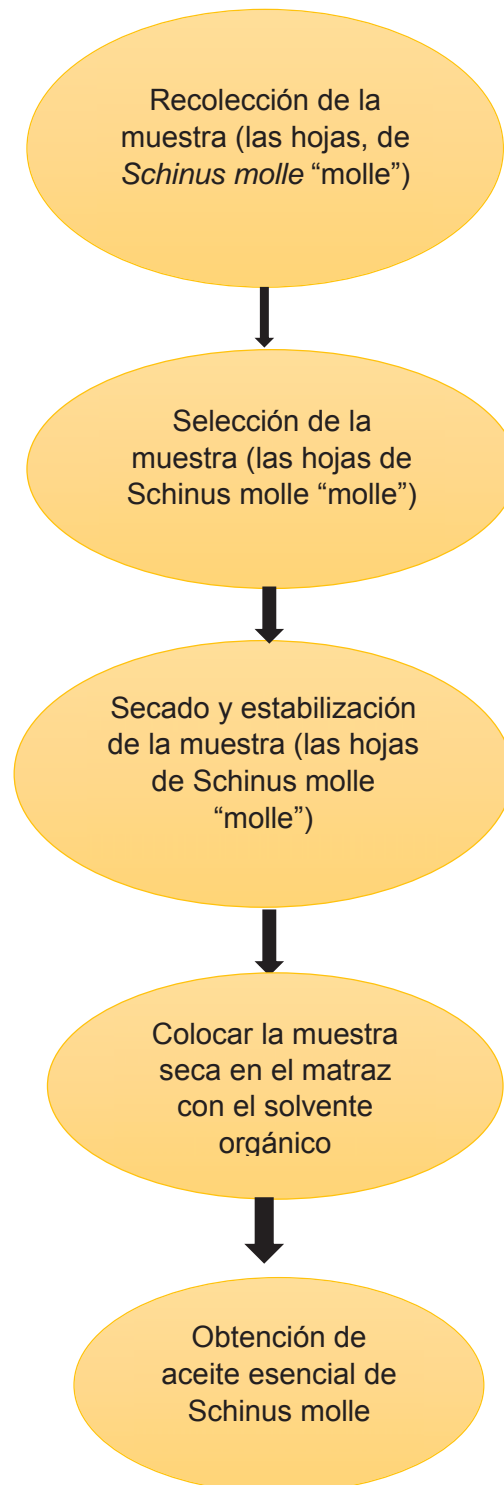
#### 3.3.3.2. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* "MOLLE"

- Recolección de la muestra: La recolección de la especie vegetal fue realizada en el departamento de Cusco - provincia de Calca (Coordenadas UTM: Longitud: O71°57'28.01", Latitud: S13°16'7.39") en su estado silvestre, en bolsas de polietileno, agregándole 10 ml de etanol al 70 % para la estabilización de los principios activos, se utilizó las hojas de la especie en estudio sanas, limpias y sin insectos. La planta se recolectó los días de sol, sin estar húmedas y cuando el rocío se evaporó.
- Selección de la muestra: se realizó antes del proceso de secado y para esto se seleccionó las hojas de la especie en estudio, se separaron las hojas partidas, marchitas o secas, malogradas, las hojas que tengan la presencia de bichos, hongos o algunas plagas que puedan evidenciarse.
- Secado y estabilización de la muestra.



- Colocar 240 gr de muestra seca en el matraz con el disolvente orgánico.
- Obtención del aceite esencial por destilación simple.

*FLUJOGRAMA N° 3. Recolección, secado y obtención del aceite de Schinus molle "Molle"*



**Fuente:** Elaboración propia.

### 3.3.3.3. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”<sup>67</sup>

Se utilizó 1kg de hojas secas de *Schinus molle* “molle”, obteniendo al final un total de 20 mL de aceite esencial. El porcentaje de extracción por arrastre de vapor, se calculó con la siguiente formula.

*ECUACIÓN N° 5. porcentaje de extracción del aceite esencial*

$$\%RAE = \frac{VAE(mL)}{Pm(g)} \times 100$$

Donde:

VAE: volumen del aceite esencial obtenido en mililitros<sup>67</sup>

Pm: peso de la muestra a destilar en gramos<sup>67</sup>

Determinación del porcentaje de extracción del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”

### 3.3.3.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL ACEITE ESENCIAL

#### 3.3.3.4.1. Preparación de la muestra

Es un matraz Erlenmeyer se adiciono aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, en una calidad no mayor al 66% del volumen total del matraz. Posteriormente se adiciono sulfato de magnesio recién desecado, neutro, igual a más o menos el 10% del peso de aceite esencial, se agito vigorosamente y luego se filtró. (Norma Técnica Peruana: NTP ISO-279:2011)<sup>68</sup>. La muestra preparada fue utilizada para los análisis respectivos.

#### 3.3.3.4.2. Densidad por el método picnométrico

La densidad y densidad relativa fueron determinados según la Norma Técnica Peruana: (NTP 319.079:1974).<sup>69</sup>

Para la determinación de la densidad se procedió a pesar el picnómetro vacío y anotar el peso (p), utilizando una balanza analítica. Luego se pesó el picnómetro conteniendo agua destilada a aproximadamente 20°C. La densidad relativa  $P_{20}$ , en gr/ml, se calculó con la siguiente formula:

*ECUACIÓN N° 6. Formula de la densidad por el método picnométrico*

$$\rho_{20} = 0,99718 \frac{P_2 - P}{P_1 - P}$$

Dónde: P es el peso en (g) del picnómetro vacío; P1 el peso en (g) del picnómetro lleno con agua destilada a 20°C; P2 el peso en (g) del picnómetro lleno con aceite esencial a 20°C

**3.3.3.4.3. Índice de refracción**

Para el análisis se usó un refractómetro digital AR200, cuyo principio es la relación de aire, sustancia medida a 20°C. a la muestra preparada se le verifico la acción del agente desecador por una serie de modificaciones del índice de refracción, después de cada desecado. (Norma Técnica Peruana: NTP-ISO 280:2011). <sup>70</sup>

**3.3.3.4.4. Poder rotatorio**

La determinación del poder rotatorio específico se realizó con un Polarometro Atago AP-300. Sobre el aceite esencial diluido en metanol 99%. El poder rotatorio específico de un aceite esencial, es el ángulo sobre el cual rotaría el plano de polarización de la luz si este atravesara un espesor de 1dm de una solución convencional de un aceite esencial que contuviera un gramo de sustancia activa por mililitro. Se expresa en grados y minutos, a una temperatura conocida, generalmente 20°C, y en relación a una longitud de onda de luz señalada. (Norma Técnica Peruana: NTP 319.076:1974). <sup>71</sup>

Está dado por la siguiente expresión:

*ECUACIÓN N° 7. Formula del poder rotatorio*

$$\alpha_D^{20^\circ C} = \frac{A \times V}{LXP}$$

Dónde: A es el ángulo de rotación observado (en grados); L es el espesor atravesado (en dm); V es el volumen de la solución (en mL); P es el peso de la sustancia disuelta (en g).

**3.3.3.4.5. Solubilidad en etanol**

Primero se realizó las diluciones de etanol de 96° hasta 40°; así mismo se preparará la solución testigo que nos dará el grado de opalescencia según la Norma Técnica Mexicana NMX-K\_081-1976. <sup>72</sup>

A una probeta se transfirió 1 mL de muestra y posteriormente se agregará etanol de 40° a 96° GI, hasta un volumen máximo de 20 mL, se agitará constantemente con un agitador Vortex. Obtenida la dilución translúcida, se anotará el volumen V de etanol que será utilizado. Si hubiese turbidez antes de haber agregado los 20 mL de etanol, se anotará el volumen V' con el que apareció la turbidez y eventualmente el volumen V'' con el cual desaparecería.

### 3.3.3.4.7. Pruebas de solubilidad en Etanol a diferentes concentraciones

*TABLA N° 4. PRUEBAS DE LA SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL A DIFERENTES CONCENTRACIONES*

Etanol al 40%
Etanol al 55%
Etanol al 70%
Etanol al 85%
Etanol al 96%

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3.3.4.8. Solubilidad en solventes orgánicos

Agua destilada	Cloroformo
Metanol	Éter etílico
Acetona	Hexano
Éter de petróleo	Benceno

**Fuente:** Elaboración propia

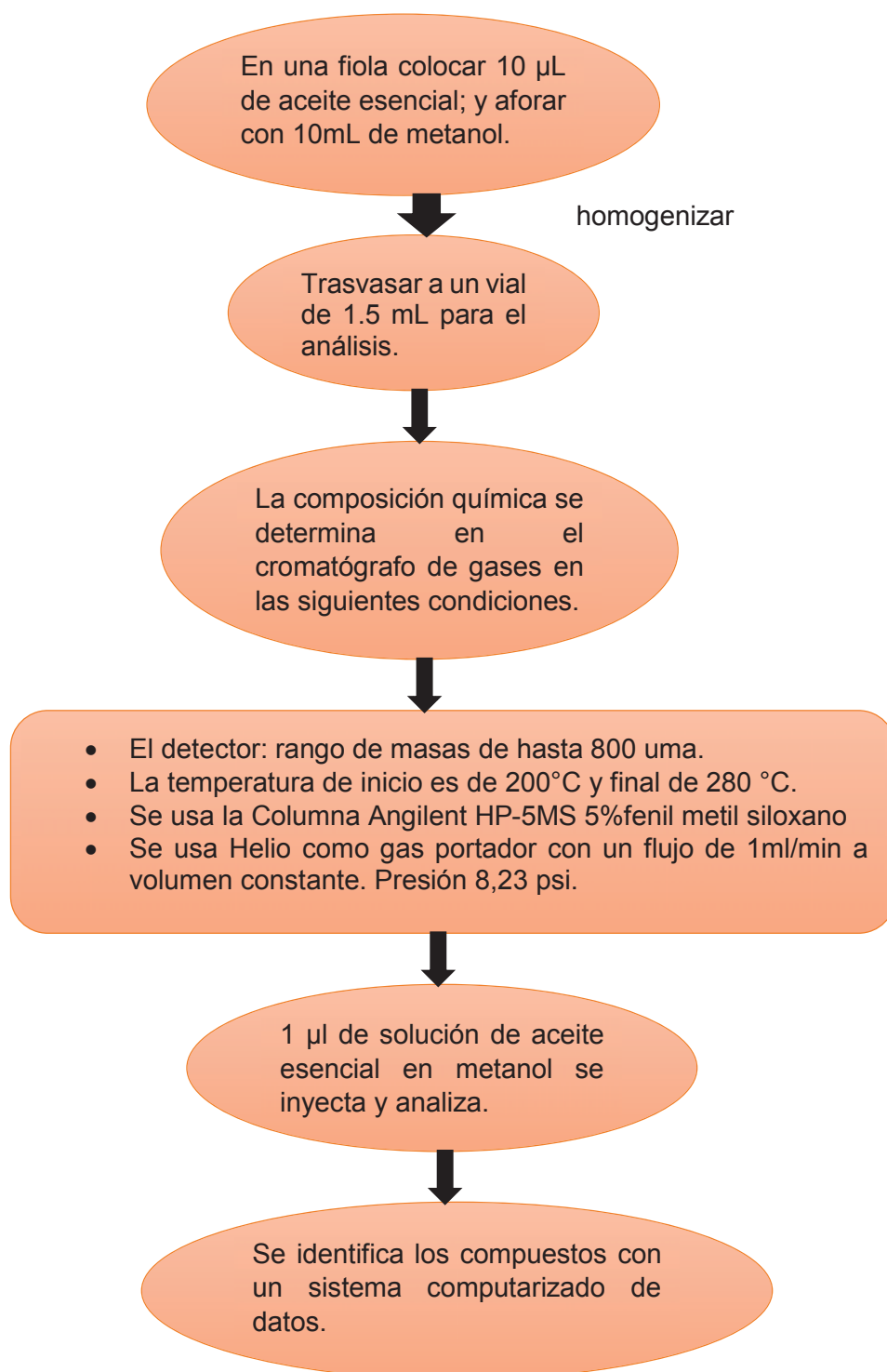
### 3.3.3.5 ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA

#### 3.3.3.5.1 DETERMINACION DE LOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFIA DE GASES

En una fiola se adiciono 10 µL de aceite esencial; aforándose con 10mL de metanol después de homogenizar; se trasvaso a un vial de 1.5 mL para el análisis. La composición química del aceite se determinó por un cromatógrafo de gases. El detector trabajara a un rango de masas de hasta 800 uma, las temperaturas de inicio y final serán de 200°C y 280 °C respectivamente. Se utilizó una columna Angilent HP-5MS 5%fenil metil siloxano (30 m x 0.25 mm de diámetro x espesor 0.5 µm). Helio que fue usado como gas portador con un flujo de 1ml/min a volumen constante. Presión 8,23 psi. La inyección fue realizada en un inyector del tipo "Split splittles" a 280 °C, 1 µl de solución de aceite esencial en metanol será inyectado y analizado. La temperatura del horno CG fue programada inicialmente a 60 °C y

luego hasta una temperatura final de 280 °C a razón de 5°C/min. La identificación de los compuestos se realizó con un sistema computarizado de datos MSD Chem Station; mediante el uso combinado de las bases de datos NIST1L y Flavor2L; pertenecientes a este sistema. <sup>30</sup>

*FLUJOGRAMA N° 4. Determinación de los componentes por Cromatografía de Gases*



**Fuente:** Elaboración propia.

### 3.3.3.6. PRE FORMULACIÓN DE LA CREMA:

#### Formulación 1: Crema agua en aceite (W/O)

INSUMO		NOMBRE INCI	CANTIDAD (100 g)
Alcohol Cetílico		Cetyl alcohol	15 gr
Cera De Abeja		Cera Alba	1gr
Propilenglicol		Propylene glicol	10gr
Lauril sulfato de sodio		Sodium Laureth Sulfate	2gr
Parabenos	Nipagin	Methylparaben	0.05 gr
	Nipasol	Propylparaben	0.022 gr
Agua Destilada		Water (Agua)	C.S.P

Fuente: Narro J. "Sistema de laboratorios para el desarrollo y la innovación" <sup>73</sup>

#### Formulación 2: Crema aceite en agua (O/W)

INSUMO	NOMBRE INCI	CANTIDAD	
		%	g
Ácido esteárico	Stearic Acid	15-20%	15-20g
Álcali (KOH)	Potassium hydroxide	0.7%	0.7g
Glicerina	Glycerin	8%	8g
Agua	Water	76.3%	76.3g
Metilparabeno	Methylparaben	c.s.p	c.s.p
Propilparabeno	Propylparaben	c.s.p.	c.s.p.

Fuente: Narro J. "Sistema de laboratorios para el desarrollo y la innovación" <sup>73</sup>

#### Formulación 3: Crema aceite en agua (O/W)

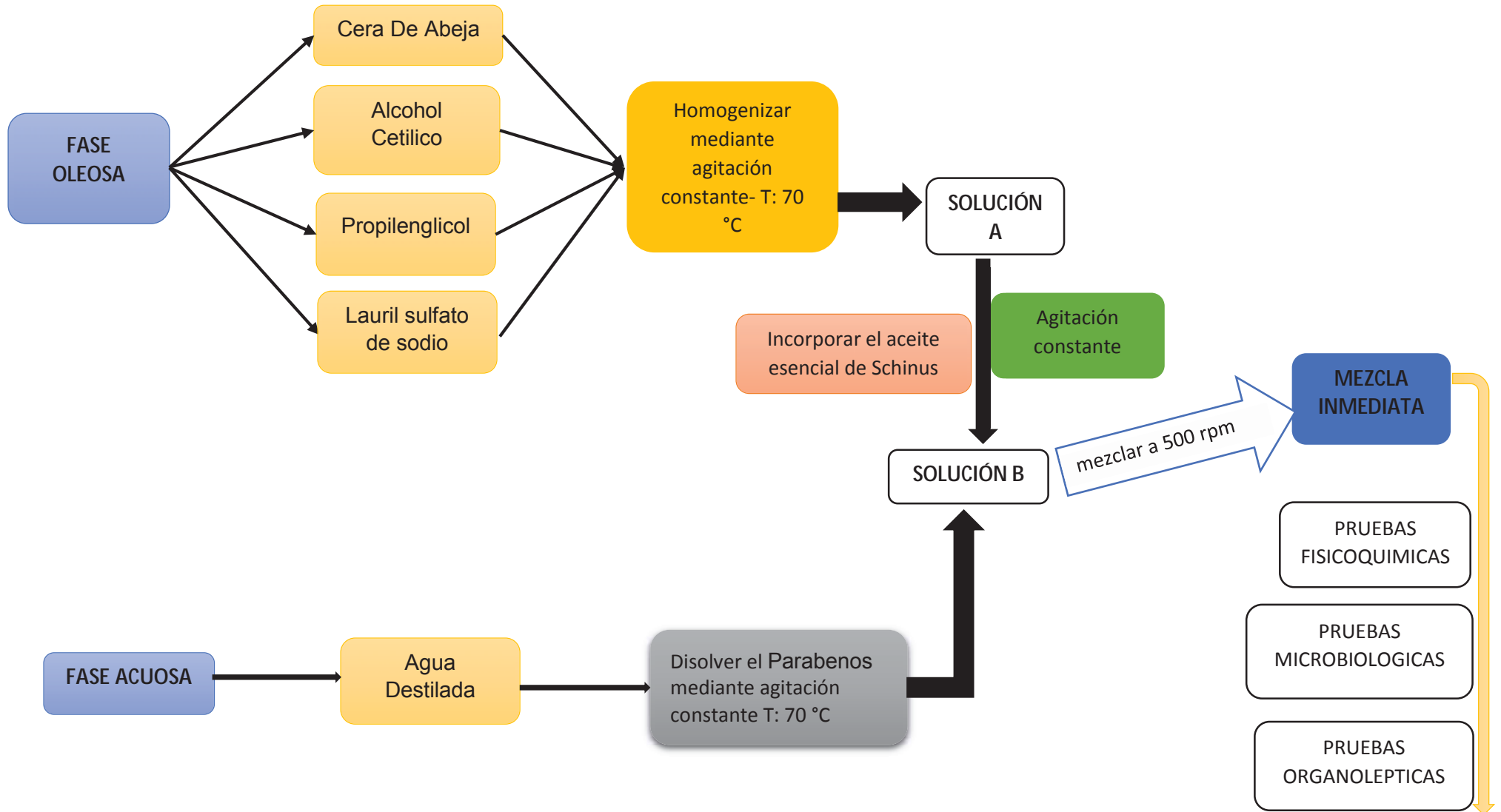
INSUMO	NOMBRE INCI	CANTIDAD	
		%	g
Cera Lanette	Sodium cetearyl sulfate	37.5g	37.5g
Tween 80	-	7.5%	7.5g
Glicerina	Glycerin	7.5%	7.5g
Metilparabeno	Methylparaben	0.225%	0.225g
Propilparabeno	Propylparaben	0.225%	0.225g
Agua Destilada	Water	c.s.p	c.s.p

Fuente: Narro J. "Sistema de laboratorios para el desarrollo y la innovación" <sup>73</sup>

<b>COMPONENTES DE LAS FORMULAS</b>	<b>FUNCIONES</b>
Alcohol Cetílico	Agente co-emulsionante, da consistencia, es emoliente y da estabilidad a las emulsiones.
Cera De Abeja	Propiedad emoliente, además de textura plástica y elástica dando consistencia a las emulsiones.
Propilenglicol	Agente humectante
Lauril sulfato de sodio	Tensioactivo y espumante
Ácido esteárico	Agente emulgente, da dureza y a la vez tiene propiedades emolientes.
Álcali (KOH)	Alcali con propiedades saponificantes
Glicerina	Agente humectante.
Cera Lanette	Da consistencia y estabilidad.
Tween 80	Co-emulsionante de aceite en agua
Agua Destilada	Poder disolvente
Metilparabeno	Propiedad fungicida y bactericida
Propilparabeno	Propiedad fungicida y bactericida

**Fuente:** Narro J. "Sistema de laboratorios para el desarrollo y la innovación" <sup>73</sup>

FLUJOGRAMA N° 5. Elaboración de la crema con aceite esencial de Schinus molle "molle" (formula N°1)



FUENTE: Elaboración propia



### **3.3.3.7. CONTROL DE CALIDAD**

En toda la industria fabricante de productos cosméticos debe existir un, independiente de los departamentos de producción, destinado a garantizar la calidad de los productos, desde el inicio de su elaboración, hasta que se encuentre listo para el expendio, mediante ensayos fisicoquímicos, microbiológicos y farmacológicos que exigen cada tipo de preparado.

#### **3.3.3.7.1. CONTROL DE CALIDAD PARA CREMAS**

Los parámetros a ser evaluados en los productos sometidos dependen de las características del producto en estudio y de los componentes usados en su formulación.

#### **3.3.3.7.2. EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA**

Proporcionan parámetros que permiten evaluar inmediatamente el estado en que se encuentra la muestra en estudio por medio de análisis comparativos, con el objetivo de verificar alteraciones como: separación de fases, precipitación y turbiedad permitiendo el reconocimiento primario del producto. Se debe utilizar una muestra de referencia, recientemente elaborada, o una muestra del producto, almacenada a temperatura adecuada, para evitar modificaciones en las propiedades organolépticas.<sup>74</sup>

Las características organolépticas determinan los parámetros de aceptación del producto por el consumidor, de un modo general se evalúan:

- Aspecto
- Color
- Olor
- Sensación al tacto

#### **3.3.3.7.3. EVALUACIÓN FISICOQUÍMICA**

Es importante para estudiar alteraciones en la estructura de la formulación que no son comúnmente perceptibles a simple vista. Estos análisis pueden indicar problemas de estabilidad entre los ingredientes o resultado del proceso de fabricación. Los análisis físico-químicos sugeridos son:<sup>74</sup>

- **Valor del pH**

Es importante recordar que el pH es una medida de acidez o alcalinidad, indica la concentración de iones hidronio presentes en determinadas sustancias. Los métodos utilizados para la verificación del valor de pH de la muestra son: <sup>74</sup>

**Determinación calorimétrica:** por medio de indicadores universales, escalas preparadas con soluciones buffers e indicadores. Presenta baja sensibilidad. Pequeñas variaciones de acidez o basicidad en las formulaciones son difícilmente observadas. <sup>74</sup>

**Determinaciones potencio métricas:** se utiliza el PH metro (peachometro) y la determinación es medida por la diferencia de potencial entre dos electrodos inmersos en la muestra de estudio. <sup>74</sup>

- **Densidad**

Es representada por la relación entre la masa de una sustancia y el volumen que ocupa y, generalmente para los líquidos, es determinada empleándose picnómetro o densímetro. En el caso de líquidos o semisólidos este parámetro puede indicar la incorporación de aire o la pérdida de ingredientes volátiles. <sup>74</sup>

- **Observación microscópica**

Se utilizó un microscopio. para observar la presencia de cristales líquidos se depositó una película fina de cada sistema en el portaobjeto. Para determinar la presencia de gotas secundarias se observó con luz ordinaria la dilución 1:10 de cada sistema. <sup>75</sup>

- **Medición del HLB**

Los agentes tensioactivos son moléculas que poseen una parte lipófila y otra hidrófila, la escala más utilizada para medir la relación entre la parte hidrófila y la lipófila de un tensioactivo es el HLB (hydrophilic-lipophilic balance) o equilibrio hidrófilo-lipófilo. La escala de HLB es una medida de la hidrofilia del tensioactivo; los valores más altos corresponden a tensioactivos mas polares, y los más bajos a compuestos menos polares.

Los aceites y ceras, que constituyen la fase oleosa de las emulsiones, tienen diferentes requerimientos de HLB para formar una emulsión O/A o A/O. estos valores se conocen como HLB requerido ( $HLB_R$ ) por la fase oleosa y sirven como criterio de selección del emulgente. El ( $HLB_R$ ) de una mezcla de excipientes se calcula utilizando la siguiente ecuación.

$$HLB_R(\text{fase oleosa}) = \sum X_A \cdot HLB_R^A$$

- **Estabilidad física**

Para determinar la estabilidad física se aplicaron los siguientes métodos, en todos los casos se realizaron por triplicado:

### **Centrifugación**

La prueba de centrifugación produce estrés en la muestra simulando un aumento en la fuerza de gravedad, aumentando la movilidad de las partículas y anticipando posibles inestabilidades. Estas podrán ser observadas en forma de precipitación, separación de fases, formación de escamas (caking), coalescencia entre otras. La muestra es centrifugada en temperatura, tiempo y velocidad estándares. En seguida se evalúa visualmente la muestra. <sup>74</sup>

Se utilizó una centrifuga Gelectronic G-42, se centrifugaron 5 g de cada emulsión durante 30 minutos a 2500 rpm.

- **Estrés térmico**

Se realizaron almacenamientos consecutivos durante 48 horas a cada una de las siguientes temperaturas:  $40 \pm 2$  °C,  $5 \pm 2$  °C y  $40 \pm 2$  °C. Al finalizar el ensayo se observaron las muestras a simple vista con el fin de detectar separación de fases, y con microscopio polarizante para detectar posibles cambios en las características líquido-cristalinas. <sup>76</sup>

- **Estabilidad física a 40 °C**

Los sistemas se almacenaron durante 1 mes a  $40 \pm 2$  °C. Luego se observó visualmente para detectar separación de fases y con microscopio polarizante para detectar posibles cambios en las características líquido-cristalinas. <sup>76</sup>

- **Extensibilidad**

El estudio del área de extensibilidad proporciona una medida de umbral de deformación del sistema y guarda estrecha relación con la apariencia de formulaciones semisólidas. Un semisólido no debe ser ni poco extensible (muy viscoso), ni demasiado extensible (muy fluido) ya que sería muy desagradable a la hora de su aplicación e incómodo para el usuario, por lo que se requiere que este en un término medio y que con el tiempo se mantenga estable. <sup>77</sup>

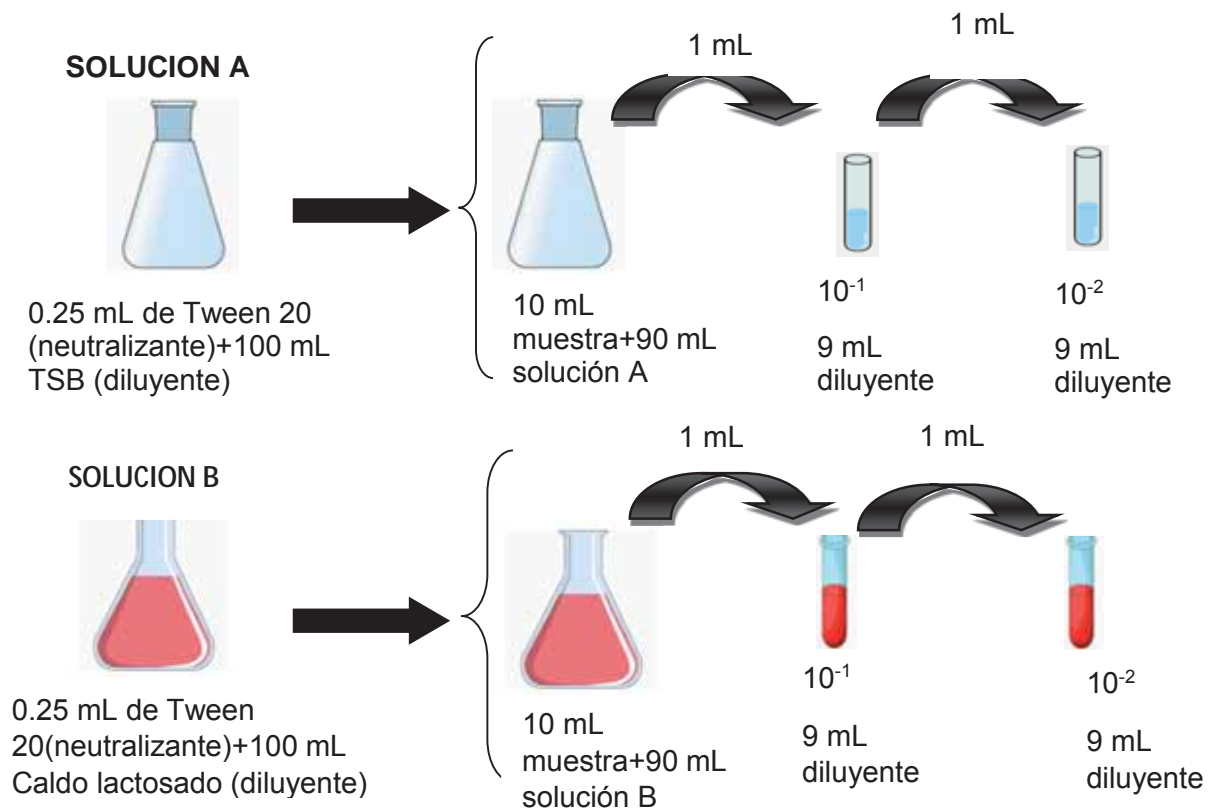
### 3.3.3.7.4. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA:

La evaluación microbiológica permite verificar si la elección del sistema conservante es adecuada, o si la incidencia de interacciones entre los componentes de la formulación podrá afectar la eficacia. <sup>74</sup>

#### 1: Preparación de la muestra <sup>78</sup>

- Se tomó 0.25 mL de Tween 20 y se mezcló con 100 mL de TSB (caseína soja) se agito hasta obtener una dilución homogénea.
- Se tomó 10mL de la muestra y se agregó 90mL de diluyente caseína soja + Tween. Se procedió a agitar 25 veces para obtener una mezcla homogénea la cual es la dilución  $10^{-1}$ . Con una pipeta estéril se tomó 1 mL de la dilución obtenida la cual se agregó en un tubo que contenía 9 mL de caldo caseína soja. Así se obtendrá una dilución  $10^{-2}$ . De esta se tomó 1 mL con una pipeta estéril se agregó en un tubo que contiene 9 mL de caldo Caso obteniéndose la dilución  $10^{-3}$ .
- Se tomó 0.25 mL de Tween 20 y se mezcló con 100 mL de caldo lactosado (caseína soja), se agito hasta obtener una dilución homogénea.
- Se tomó 10 mL de la muestra y se agregó 90 mL de caldo lactosado y se realizó las demás disoluciones ( $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ).

Esquema 1. Preparación de la muestra para el análisis microbiológico



Fuente: Elaboración propia según USP 37 <sup>78</sup>

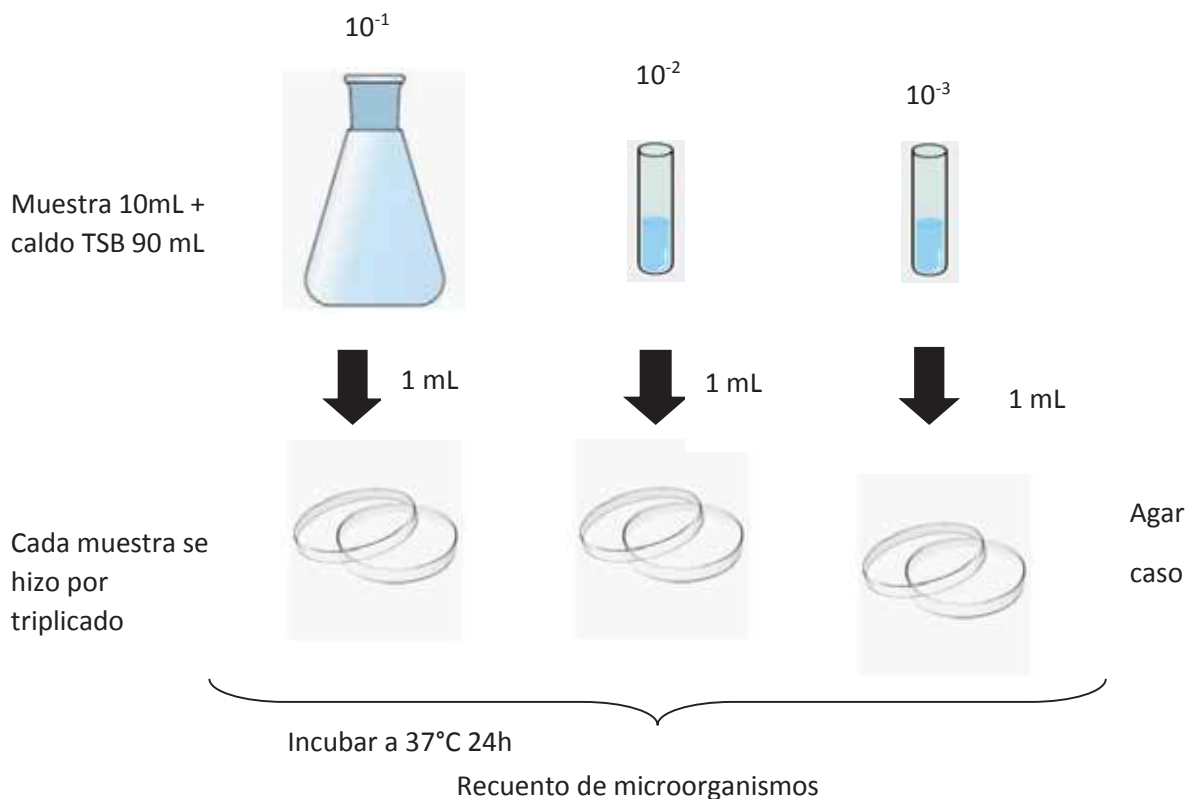
## 2: Presencia de aerobios mesófilos viables <sup>78</sup>

**Método:** Recuento en la placa por siembra en todo el medio.

### Procedimiento:

- Se pipeteo 1 mL de cada una de las diluciones realizadas en el caldo caso ( $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ) en placas Petri por triplicado.
- Luego se añadió en cada una de las placas 15 mL de agar caso (Templado a 44 -46 °C).
- Se mezcló el inóculo con el medio fundido, mediante movimiento de vaivén: moviendo la placa de arriba abajo, de derecha a izquierda en una sola dirección. Se roto la placa en el sentido de las agujas del reloj y en sentido contrario a las agujas del reloj.
- Se incubo las placas invertidas a 37°C durante 24 -48 horas.
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de las placas.
- Se expresó el número de microorganismos aerobios mesófilos por gramo de muestra (ufc/g mL), multiplicando el número de colonias por la dilución correspondiente.

*Esquema 2. Recuento de microorganismos Aerobios mesófilos*



**Fuente:** Elaboración propia según USP 37 <sup>78</sup>

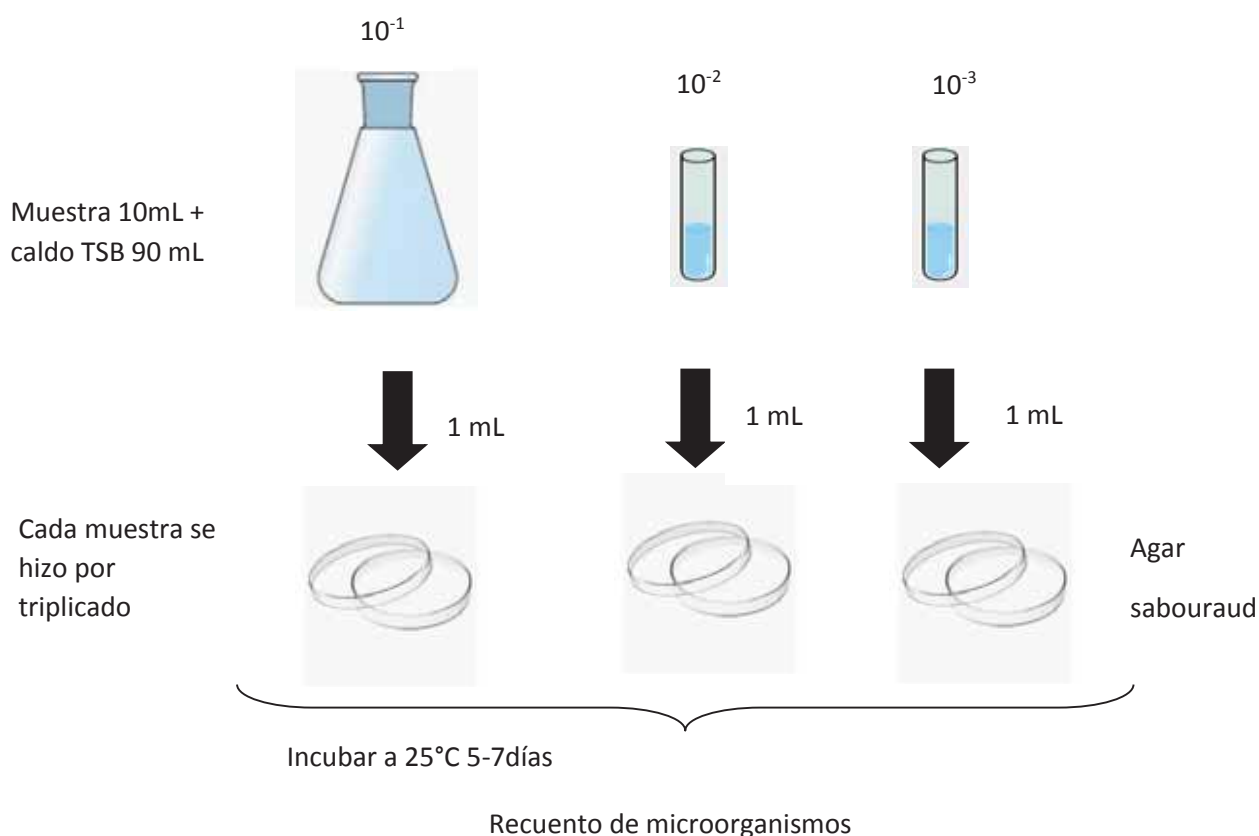
### 3: Recuento de hongos y levaduras <sup>78</sup>

**Método:** Siembra por difusión

**Procedimiento:**

- Se tomó 1 mL de cada una de las diluciones realizadas en caldo caso y se colocó en cada placa Petri, enseguida se añadió a cada placa Petri 15 mL o 20 mL de agar Sabouraud, a no más de 45°C, se preparó tres placas por dilución.
- Se incubó las placas invertidas a una temperatura de 20 °C a 25°C durante 5 a 7 días.
- Transcurrido el tiempo de incubación, se realiza el conteo, se seleccionó las placas correspondientes a una dilución que muestre el mayor número de colonias, pero no menos de 100 colonias.
- Se expresa el número de hongos y levaduras por gramo o mL de muestra (ufc/g o mL), multiplicando el número de colonias por la dilución correspondiente.

*Esquema 3. Recuento de Hongos y Levaduras*



**Fuente:** Elaboración propia según USP 37 <sup>78</sup>

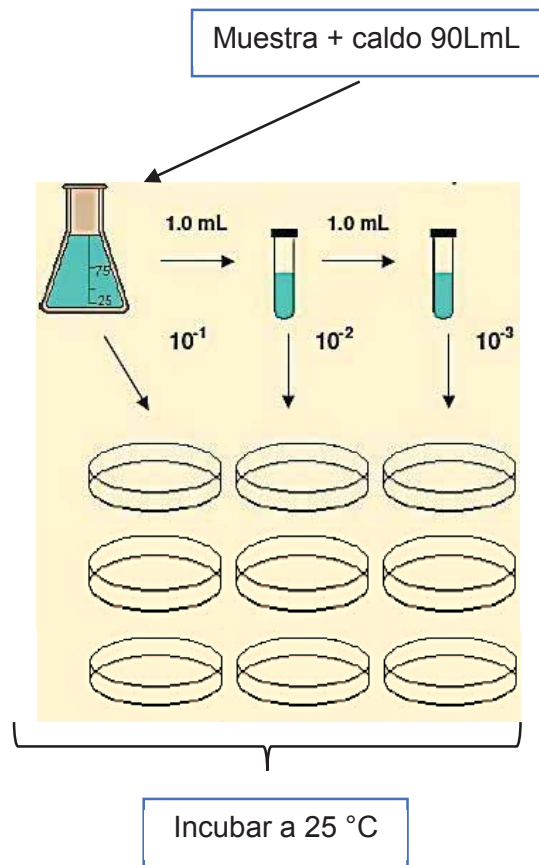
#### 4: Recuento de escherichia coli <sup>78</sup>

**Método:** recuento de placa por siembra en todo el medio.

**Procedimiento:**

1. Luego de haber sido inoculado por 24 horas a 37C° las diluciones realizadas en caldo lactosado, se realizó la siembra de cada dilución ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$   $10^{-3}$ ) mediante un asa de siembra por estrías hasta agotamiento en placas que contenían agar Mac Conkey, cada dilución se trabajó por triplicado.
2. Se incubo las placas invertidas a 37 °C durante 24-72 horas.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo de las placas correspondientes a una dilución que presentan entre 30 y 300 colonias.

*Esquema 4. Recuento de escherichia coli*



**Fuente:** Elaboración propia según USP 37 <sup>78</sup>

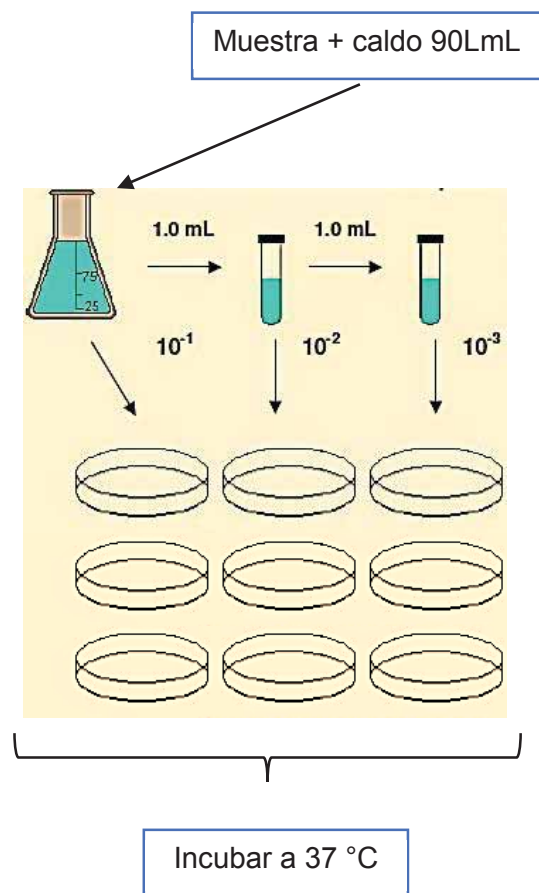
## 5: Recuento de *Pseudomona Aureginosa* <sup>78</sup>

**Método:** recuento de placa por siembra en todo el medio.

### Procedimiento:

1. Luego de haber sido inoculado por 24 horas a 37°C las diluciones realizadas en caldo lactosado, se realizó la siembra de cada dilución ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) mediante un asa de siembra por estrías hasta agotamiento en placas que contenían agar manitol salado, cada dilución se trabajó por triplicado.
2. Se incubaron las placas invertidas a 37 °C durante 24-72 horas.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizará el conteo de las placas. No debe presentar crecimiento de colonias, las lecturas se deben realizar a las 24 y 48 horas.

*Esquema 5. Recuento de Pseudomona Aureginosa*



**Fuente:** Elaboración propia según USP 37 <sup>78</sup>



## **6: Recuento de Staphylococcus aureus <sup>78</sup>**

**Método:** recuento de placa por siembra en todo el medio.

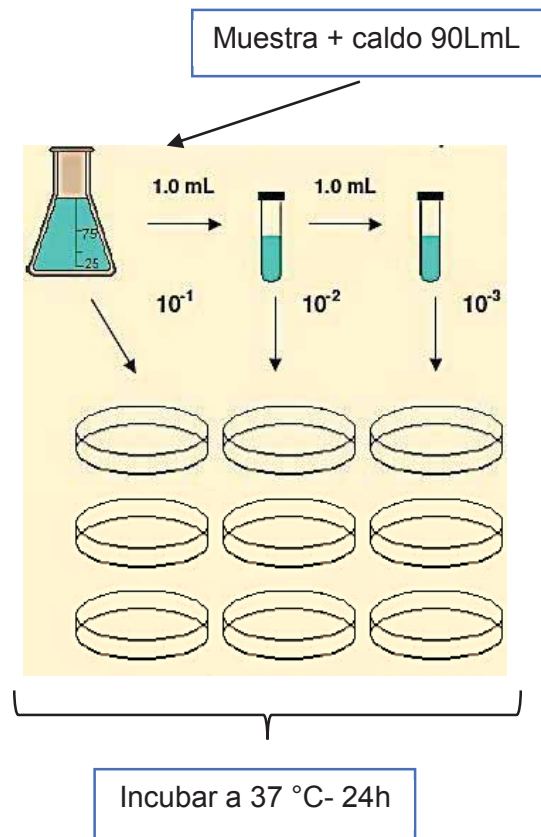
### **Procedimiento:**

1. Luego de haber sido inoculado por 24 horas a 37C° las diluciones realizadas en caldo lactosado, se realizó la siembra de cada dilución ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$   $10^{-3}$ ) mediante un asa de siembra por estrías hasta agotamiento en placas que contenían agar manitol salado, cada dilución se trabajó por triplicado.
2. Se incubo las placas invertidas a 37 °C durante 24-72 horas.
3. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo de las placas. No debe presentar crecimiento de colonias, las lecturas se deben realizar a las 24 y 48 horas.

### **Identificación de Staphylococcus aureus (coagulasa positiva):**

1. Una vez realizada el recuento, se aisló algunas colonias características (color amarillo), repicando en agar Chapman.
2. Se incubo las placas a 37 °C por 24 horas.
3. Se tomaron algunas colonias características de color amarillo para realizar la coloración de Gram (cocos gram positivos en racimos) y la prueba de la catalasa, la cual debe ser positiva.
4. Dichas colonias se repicaron en agar manitol salado y agar sangre.
5. Se incubaron las placas a 37 °C durante 24-48 horas.
6. Culminado el tiempo de incubación, se tomó en cuenta las colonias presuntivas de S. aureus (aquellas que harán virar del medio de cultivo a amarillo en agar manitol salado y presentaron B-hemolisis en agar sangre) para realizar la prueba de la coagulasa, la cual debe ser positiva para la confirmación de S. aureus

Esquema 6. Recuento e identificación de *Staphylococcus aureus*



Fuente: Elaboración propia según USP 37 <sup>78</sup>

- **Limites microbianos establecidos según la USP 37**

Las especificaciones según la USP 37 para la determinación de Límites Microbianos y Microorganismos patógenos en Productos No Estériles se indican en la Tabla N° 5 que esta a continuación:

TABLA N° 5. LIMITES MICROBIANOS SEGÚN USP 37

Microorganismo	Especificaciones según USP 37
Aerobios mesófilos viables	$\leq 10^3$
Hongos y levaduras	$\leq 10^2$
Escherichia coli	No se admite
Pseudomona Aureginosa	No se admite
Staphylococcus aureus	No se admite

Fuente: USP 37 <sup>78</sup>

### 3.3.3.8. ANÁLISIS DE DATOS

En el análisis descriptivo de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS 25 y programas estadísticos de tendencia central y de dispersión como la media, desviación estándar y los porcentajes.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos

#### **Técnicas para recolección de datos:**

- Observación en el laboratorio de la formación de edema en la pata izquierda posterior de los animales de experimentación para obtener el porcentaje de inhibición del proceso inflamatorio en la prueba in vivo del edema inducido por carragenina al 1%.
- Observación en el laboratorio del el salto o lamida de las patas y manos del ratón lo cual responde a un reflejo mediado por estructuras supra espinales, para obtener el porcentaje de máximo efecto posible
- Observación en el laboratorio para la prueba de solubilidad y análisis fitoquímico cualitativo del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.

#### **Instrumentos de recolección de datos:**

- Se utilizó la ficha de recolección de datos para la evaluación del efecto analgésico de la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle”. (Anexo N°7)
- Se utilizó la ficha de recolección de datos para la evaluación del efecto antiinflamatorio de la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle”. (Anexo N°8)
- Espectrofotometría de masas para la identificación de los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.

### **TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los resultados obtenidos fueron procesados de acuerdo a métodos estadísticos establecidos para la comparación de medias obtenidas en los grupos de experimentación según el tratamiento.

#### **PRUEBA DE NORMALIDAD.**

Esta prueba se utilizará para comprobar la hipótesis de normalidad, necesaria para que el resultado de análisis sea fiable para el ANOVA.

#### **ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)**

El análisis de varianza (ANOVA) para un factor o de una vía sirve para comparar promedios de varios grupos de una variable cuantitativa.

Esta técnica tiene como objetivo principal determinar de qué manera influye el factor (tratamiento) en la variable respuesta (eficacia de la crema a base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”).

Para este fin se plantea el modelo estadístico para un solo factor:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad i=1,2,\dots,a \quad \text{y} \quad j=1,2,3,\dots,n$$

Donde:

$Y_{ij}$ : es la variable respuesta

$\mu$ : media general

$\tau_i$ : es el efecto del tratamiento

$\varepsilon_{ij}$ : es el error aleatorio

En nuestro caso  $a=5$  y  $n=5$

A partir de este modelo estadístico, nos planteamos una hipótesis de la comparación múltiple de medias, para tal efecto en este modelo los efectos del tratamiento  $\tau_i$  se define usualmente como desviaciones con respecto a la media general ( $\mu$ ).

Entonces nos interesa probar la igualdad de las medias de los tratamientos; es decir; hay que observar la hipótesis siguiente:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_a$$

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j \text{ para cualquier } i \neq j$$

Equivalente

$H_0$ : el factor (tratamiento) no influye significativamente en la variable respuesta (eficacia de la crema con aceite esencial)

$H_a$ : el factor (tratamiento) influye significativamente en la variable respuesta (eficacia de la crema con aceite esencial)

En el Análisis de Varianza (ANOVA) el punto crítico o nivel crítico ( $\text{sig.} < 0.05$ ), juega un papel muy importante en la hipótesis. Si  $\text{sig.} < 0.05$  se rechaza la hipótesis nula, por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna.

Los datos experimentales se presentarán como la Media  $\pm$  error estándar de la Media (E.S.M) del porcentaje de inhibición. el análisis se complementa usando ANOVA de una vía seguido de análisis de Dunnet para evaluar la significancia de las diferencias de los tratamientos frente al control, para evaluar diferencias entre tratamientos.

### **PRUEBA DE TUKEY**

El test HSD (Honestly-significant-difference) de Tukey es un test de comparaciones múltiples. Permite comparar las medias de los  $t$  niveles de un factor después de haber rechazado la Hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Es, por o tanto, un test que trata de perfilar, trata de especificar, una Hipótesis alternativa genérica como la de cualquiera de los test ANOVA.

### **PRUEBA DE LEVENE**

Esta prueba se utilizó para corroborar que las medias obtenidas de las formaciones de los edemas de cada grupo de experimentación son significativamente diferentes y poder determinar que concentración es más efectiva, por lo que esta prueba nos indica:

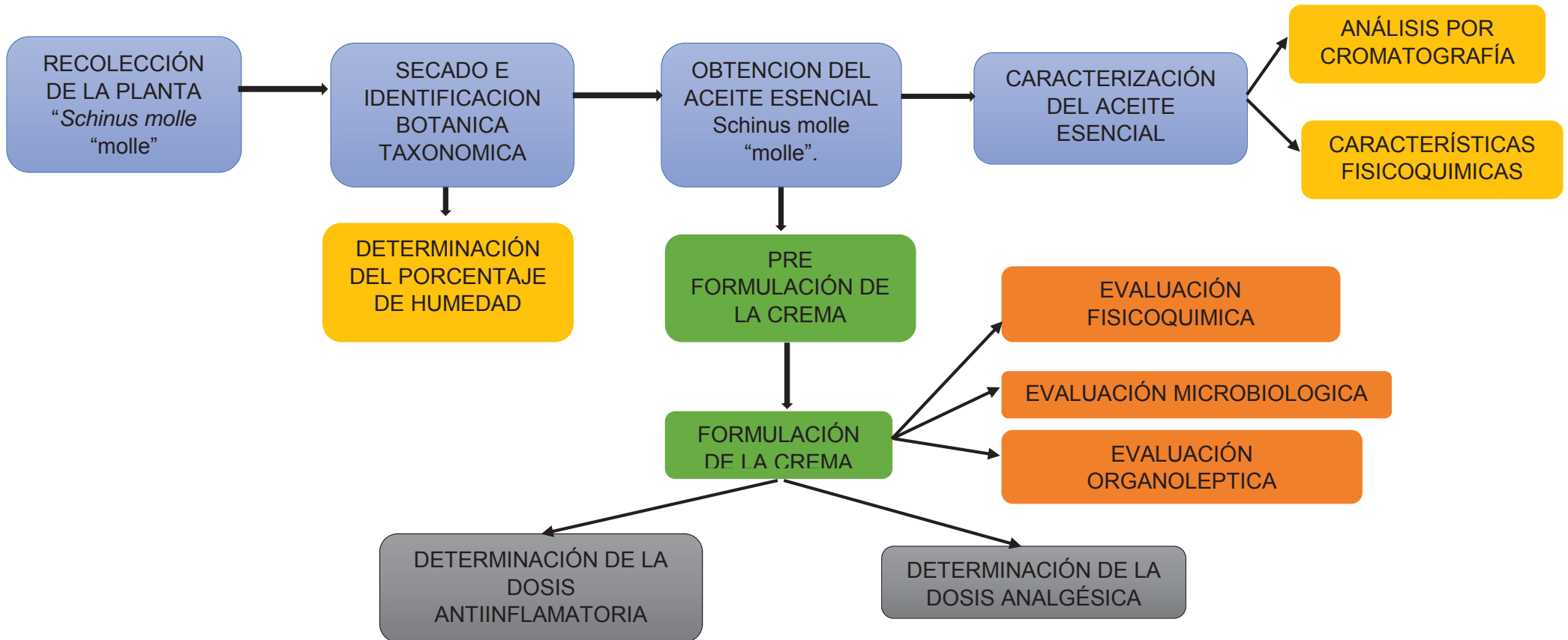
$H_0$ : las varianzas en cada grupo son homogéneas

$H_a$ : las varianzas en cada grupo son heterogéneas

### **PRUEBA DE GAMES HOWELL**

Esta prueba se utilizó para realizar comparaciones múltiples entre los grupos de estudio y saber si existe diferencia significativa entre todos los grupos comprobando si cada grupo tiene un comportamiento diferente con respecto al efecto inhibitorio del proceso de inflamación y el efecto antinocicepción.

FLUJOGRAMA N° 6. Evaluación de la actividad Analgésica y Antiinflamatoria de una crema a base de aceite esencial de *Schinus molle* "Molle" en animales de experimentación



Fuente: Elaboración propia

# **CAPITULO IV**

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS HOJAS DE *Schinus molle* “MOLLE”

TABLA N° 6. PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LAS HOJAS DE *Schinus molle* "MOLLE"

MUESTRAS	NUMERO DE MUESTRAS		
	M1	M2	M3
Peso de la muestra fresca g	5 g	5 g	5 g
Peso de la muestra seca g	1.1 g	0.75	0.9
Porcentaje de humedad %	78	85	82
Promedio del porcentaje de humedad%	81.67%		

**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

#### Análisis y discusión de resultados

El porcentaje de humedad de las hojas de *Schinus molle* “molle” de acuerdo al método gravimétrico es de 81.67% (prueba realizada por triplicado) valor que refleja un alto contenido de agua en las hojas y demuestra su propensión a la contaminación por bacterias y especialmente hongos.<sup>31, 79</sup>

Según el estudio de López R. y Caso N. “Rendimiento y composición química de aceites esenciales de *Eucalyptus archeri* y *Schinus molle* - Valle del Mantaro- 2015”<sup>80</sup> que presenta un porcentaje de humedad de 93.610%. El cual es mayor al porcentaje obtenido en nuestra planta de, 81.67%, que podría ser un valor que puede determinar cierta diferencia entre la especie por la ubicación geográfica y época de recolección.<sup>31</sup>

El porcentaje de humedad nos permite tener las consideraciones necesarias para el proceso de secado de la muestra, estabilizando la muestra en estudio, para interrumpir los procesos enzimáticos y de degradación de los metabolitos evitando el desarrollo de bacterias, hongos y putrefacción, procesos de oxidación que llevarían a inestabilidad de dichos metabolitos.



## 4.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

TABLA N° 7. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

PESO HOJAS SECAS	ACEITE EXTRAÍDO	% DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.  $\%RAE = \frac{VAE(mL)}{Pm(g)} \times 100$
204 gr.	4.1 mL	2
195gr	3.9 mL	2
202 gr	4.1 mL	1.98
204 gr	4.0 mL	1.96
195 gr	3.9 mL	2
	20 mL	1.99%

**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

### Análisis y discusión de resultados

El porcentaje de extracción permite calcular la cantidad de muestra seca necesaria para obtener el aceite esencial y así poder determinar la cantidad necesaria para realizar los diferentes ensayos en el trabajo de investigación.

Según Moncada F. “Determinación de la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. “molle” de Arequipa y Moquegua contra *klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus*”<sup>81</sup> determina un porcentaje de extracción de 1.18% del aceite esencial de los frutos *Schinus molle* “molle”, para nuestra investigación el porcentaje de extracción fue de 1.99 % siendo este más elevado, sin embargo, esto puede verse afectado por distintos parámetros entre ellos que la obtención del aceite esencial para nuestra investigación fue en base a hojas de *Schinus molle* “molle”.

### 4.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL ACEITE ESENCIAL

#### 4.3.1. DENSIDAD POR EL MÉTODO PICNÓMETRICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* "MOLLE"

Densidad 20°C	Método picnométrico
	0.8693g/ml

Fuente: Elaboración propia según los datos experimentales

#### Análisis y discusión de resultados

El método picnómetro, está incluido dentro de las exigencias de las normas ISO, para la determinación de la densidad.

Si comparamos el valor obtenido en el estudio realizado por López R. y Caso N. "Rendimiento y Composición Química de Aceites Esenciales de *Eucalyptus archeri* y *Schinus molle* - Valle del Mantaro- 2015"<sup>80</sup> el cual también realiza estudios fisicoquímicos a esta misma especie en el que se obtiene un valor para la densidad igual 0.838 g/mL. y por otro lado se tiene el estudio realizado por Ramírez R., Soto R. "Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle*) frente a cepas de *escherichia coli*" in vitro. Lima -2018"<sup>82</sup> quien obtuvo un resultado para la densidad de 0.9165 g/mL, lo que nos indica una escasa variación en los resultados obtenidos de 0.8693g/mL que podría deberse a factores externos como la técnica de manipulación, condiciones climáticas y geográficas de la recolección de la planta etc.

Siendo este el caso decimos que nuestro resultado es óptimo pues se encuentra dentro de los valores estándar para aceites esenciales referidos por Bandoni Arnaldo (2000)<sup>40</sup>, que indica "casi todas las esencias poseen una densidad menor que el agua (densidad < 1); algunas excepciones son las esencias de clavo, canela, ajo y gaulteria"

Así mismo Ortuño S.; Manuel F. (2006)<sup>83</sup>, dice que "la mayoría de los aceites esenciales, al estar compuestos fundamentalmente por terpenos y derivados, compuestos orgánicos con átomos ligeros (C, H, O) formando cadenas y anillos, tienen una densidad menor que el agua, pero hay algunos aceites esenciales con densidad mayor, como los de almendras amargas, mostaza, canela, perejil o clavo de olor".<sup>83</sup>

Entonces podemos deducir mediante los resultados obtenidos que el aceite obtenido por destilación simple cumple con lo establecido, siendo estas de calidad y pureza, así mismo se observa una mínima diferencia que puede deberse a la técnica y las condiciones ambientales.

#### 4.3.2. ÍNDICE DE REFRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

Se obtuvo el siguiente resultado:

ÍNDICE DE REFRACCIÓN	1, 7052
----------------------	---------

Fuente: Elaboración propia según los datos experimentales

#### Análisis y discusión de resultados

En el estudio realizado por Ramírez R., Soto R. “Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle*) frente a cepas de *Escherichia coli*” in vitro. Lima - 2018”<sup>82</sup> obtuvo un valor de 1,477; para la misma especie.

El libro “Curso de análisis farmacéutico” nos indica que “el índice de refracción es una cantidad importante al establecer la identidad de los compuestos orgánicos puros, así como también de envejecimiento o ranciamiento; si no se dispone de un modelo o patrón auténtico, hay que compararlo con un valor aportado por los textos de la materia, por ejemplo, los índices de tablas y farmacopeas”.<sup>84</sup>

El índice de refracción tiene como aplicación ser usado como criterio de pureza. Monografías para muchos líquidos, de la USP, especifican los intervalos dentro de los cuales se ha de mantener el índice de refracción de una muestra para que esté de acuerdo con los requerimientos oficiales. Estas especificaciones son de ayuda en la detección de adulteraciones de mezclas complejas, tales como aceites esenciales.<sup>78</sup>

El índice de refracción así mismo es característico dentro de ciertos límites para cada aceite por lo que es un indicador de pureza del aceite; este valor está relacionado con el grado de saturación, con la razón cis/trans de los dobles enlaces y puede estar influenciado, por los diferentes aceites esenciales. Los aceites esenciales poseen un índice de refracción elevado, con un promedio de 1.5 y generalmente presentan actividad óptica.<sup>85</sup>

Por ende, los resultados entre ambos estudios demuestran una diferencia insignificante, estos resultados podrían ser influenciados por la concentración de los componentes del aceite esencial en estudio y esta prueba también nos estaría confirmando la alta calidad y pureza del aceite en estudio.

#### 4.3.3. PODER ROTATORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

Se obtuvo el siguiente resultado:

PODER ROTATORIO	0,403°
-----------------	--------

Fuente: Elaboración propia según datos experimentales

#### Análisis y discusión de resultados

Comparando con el estudio de Tineo F. “Estudio experimental y modelamiento matemático para el proceso de extracción por lotes por arrastre con vapor de agua del aceite esencial libre del *Schinus molle*. Lima -2012”<sup>32</sup>; que obtuvo un valor de 4,924°.

Entonces podríamos decir que nuestros resultados podrían estar influenciados por los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, como también el método y las condiciones ambientales a las cuales se obtuvo el aceite. Mas este resultado se encuentra dentro de los valores establecidos para aceites esenciales en diferentes especies por la farmacopea americana<sup>78</sup> y podríamos decir que esto influye dentro de la pureza del aceite en estudio, además es muy difícil determinar mediante este procedimiento si el aceite está mezclado con otros productos puesto que los valores cambiaran apenas se desvié la luz polarizada por efecto de otras sustancias en la muestra a trabajar.

#### 4.3.4. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

Para las pruebas de solubilidad del aceite esencial de *Schinus molle* “molle” se usaron diferentes solventes de diferente polaridad obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA N° 8. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* "MOLLE"

SOLVENTES	Aceite esencial de <i>Schinus molle</i> "molle"
Agua destilada	-
Metanol	-
Etanol al 40%	-
Etanol al 55%	-
Etanol al 70%	-
Etanol al 85%	+ +
Etanol al 96%	+ +
Acetona	+ + +
Éter etílico	+ + +
Éter de petróleo	+ + +
Cloroformo	+ + +
Hexano	+ +
Benceno	+ +

Fuente: Elaboración propia según datos experimentales

LEYENDA:

SIGNO	+ + +	+ +	+	-
SIGNIFICADO	Totalmente soluble	Parcialmente soluble	Muy poco soluble	Insoluble

Fuente: Elaboración según la información recopilada de Kuklinski C. 2000 y Bruneton J. 2001.<sup>31, 79</sup>

### Análisis y discusión de resultados

La solubilidad de las esencias en alcohol da una idea de su contenido en monoterpenos, cuanto mayor sea la solubilidad, menor será el contenido de estos en la esencia, o mayor será su contenido de compuestos oxigenados, como alcoholes o fenoles.<sup>40</sup>

En la tabla N° 8, se puede apreciar que el aceite esencial de *Schinus molle* "molle" es parcialmente soluble en etanol al 85° y 96°, lo que nos indica la presencia mayoritaria de compuestos oxigenados; haciendo una comparación con el estudio realizado por Tineo F. "Estudio experimental y modelamiento matemático para el proceso de extracción por lotes por arrastre con vapor de agua del aceite esencial libre del *Schinus molle*. Lima - 2012"<sup>32</sup>; quien obtuvo un valor similar ya que encontró solubilidad entre el aceite en estudio y los siguientes solventes: Etanol al 90%, cloroformo, éter, Benceno, n-hexano.

Entonces podríamos deducir que nuestro aceite es rico en monoterpenos oxigenados, por otro lado, nos indica el grado de pureza de nuestro aceite esencial.

Los aceites esenciales son solubles en alcoholes de alto grado y en disolventes orgánicos habituales, como éter o cloroformo.<sup>20</sup>

Se observa que nuestro aceite esencial es insoluble en agua destilada y metanol, parcialmente soluble en hexano y benceno, y totalmente soluble en acetona, éter etílico, éter de petróleo y cloroformo.

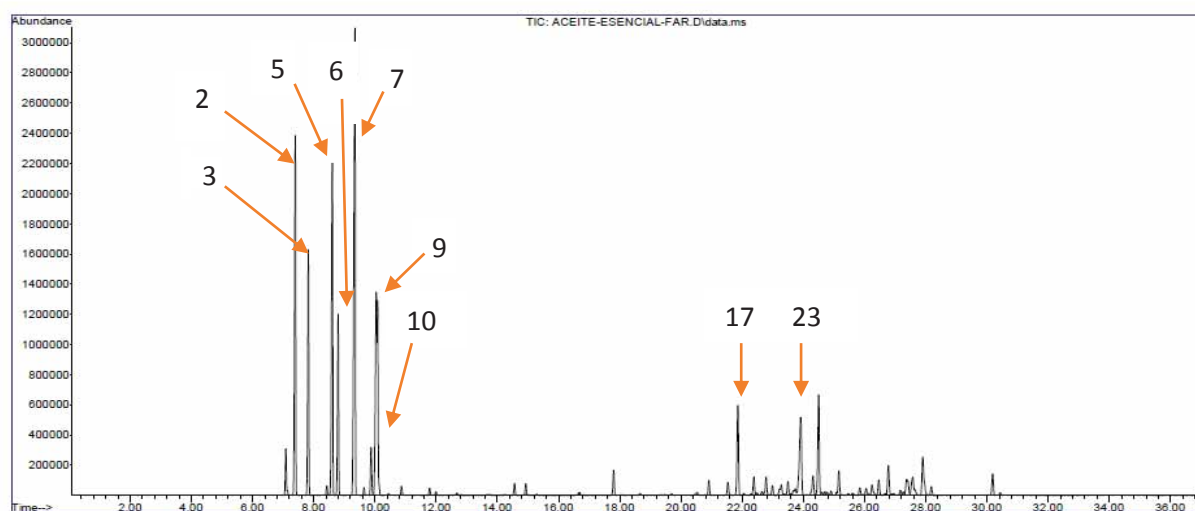
Se puede decir que según estos resultados el aceite esencial de *Schinus molle* “molle” es muy soluble en solventes orgánicos.

#### 4.4. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

La identificación por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo comparando los tiempos de retención del analito y el espectro UV-Vis.

GRÁFICO N° 1. PERFIL CROMATOGRÁFICO – DETECTOR ESPECTROMETRO DE MASAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

MUESTRA: ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “molle”



Fuente: HPLC UNSAAC

TABLA N° 9. DATOS DE LA CROMATOGRAFÍA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* "MOLLE"

NUMERO DE PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	NOMBRE DEL COMPUESTO	%COINCIDENCIA (Qual)
2	7.3945	Alfa-Pineno	96
3	7.8216	Campheno	98
5	8.6039	Beta-pineno	97
6	8.7942	Beta – mirceno	95
7	9.3439	Alfa-felandreno	90
9	10.0417	d-limoneno	97
10	10.0882	b-felandreno	91
17	21.8607	Cariofileno	99
23	23.9116	Biciclogermacreno	91

Fuente: Elaboración propia: reporte de datos biblioteca NIST1.L, del equipo de CG-EM

### Análisis y discusión de resultados

Para la elaboración de la tabla N°9 se tomó en cuenta la coincidencia a partir del 90%, en relación de componentes en concordancia con la Biblioteca NIST11.L brindada por el laboratorio de cromatografía y espectrofotometría de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, la que se obtuvo de la base de datos del equipo de CG-EM.

En el gráfico N° 1, se observa el cromatograma del aceite esencial de *Schinus molle* "molle"; en el tiempo de retención 7.3945, se identificó el pico N°2 eluido que corresponde al  $\alpha$ -Pineno, pueden observarse asimismo otros picos importantes, que corresponden a los compuestos que están en mayor proporción en el aceite esencial de *Schinus molle* "molle".

Como se ve en los resultados obtenidos en las dos bases de datos, podemos observar coincidencia de componentes con iguales concentraciones y tiempos de retención, lo que se confirma en el cromatograma brindado por el equipo de CG-EM.

En el estudio realizado por Cortez A. "Identificación de metabolitos secundarios en hojas de *Schinus molle* (*molle*) procedente del caserío de Huañimba-Cajabamba. Trujillo – Perú 2018" <sup>15</sup>. Encontró en el análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* "molle" la presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, taninos, fenoles, resina, lactonas, cumarinas, azúcares reductores, saponinas, glucósidos cardiotónicos, catequinas, triterpenos y esteroides. En nuestros resultados se encontró la principal presencia de terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos, esta variación es debido a que la muestra usada fue aceite esencial y en el estudio realizado por Cortez se usó extracto etanólico.

La espectrofotometría de gases demostró la presencia de terpenos, entre ellos se encontraron en un contenido relativo al mirceno, pineno y felandreno, los que tiene evidencia científica sobre la inflamación y analgesia.

El beta- mirceno, es un carbohidrato monoterpénico lineal que resulta como el principal componente del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, siendo el 5.46 % de su composición. El mirceno actúa como antiinflamatorio interfiriendo en la vía de señalización inflamatoria de las prostaglandinas.

El pineno es el terpeno más ampliamente distribuido en la naturaleza. Tienen una ampliamente actividad antibiótica, incluso frente a patógenos resistentes a los antibióticos. Una de las mayores actividades terapéuticas que tiene es la de antiinflamatorio, interfiriendo la vía de señalización inflamatoria de las prostaglandinas de manera similar al mirceno.<sup>86, 87</sup>

El aceite esencial de *Schinus molle* “molle”; es rico en monoterpénos en especial del alfa-pineno., que se demostró mediante la cromatografía de gases con aplicación de cromatografía de masas el que arrojó un resultado para este quimiotipo de 11.4157, seguido de Campheno (7.3984), Beta-Pineno (1.3619) además, el reporte de cromatografía reveló la presencia del monoterpénico mirceno en una cantidad de 5.4609 esta cantidad es relativamente baja.

*TABLA N° 10. COMPONENTES EN MAYOR PROPORCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE Schinus molle “MOLLE” CG-EM*

<b>NUMERO DE PICO</b>	<b>Tiempo De Retención (Min)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>NOMBRE DEL COMPUESTO</b>	<b>GRUPO AL QUE PERTENECE</b>
<b>2</b>	<b>7.3945</b>	11.4157	Alfa-Pineno	Terpeno
<b>3</b>	<b>7.8216</b>	7.3984	Campheno	Terpeno
<b>5</b>	<b>8.6039</b>	1.3619	Beta-Pineno	Monoterpénico
<b>6</b>	<b>8.7942</b>	5.4609	Beta – Mirceno	Monoterpénico
<b>7</b>	<b>9.3439</b>	19.1723	Alfa-felandreno	Monoterpénico
<b>9</b>	<b>10.0417</b>	8.3268	d-Limoneno	Terpeno
<b>10</b>	<b>10.0882</b>	5.3353	b-felandreno	Monoterpénico
<b>17</b>	<b>21.8607</b>	3.5943	Cariofileno	Sesquiterpeno
<b>23</b>	<b>23.9116</b>	4.6992	Biciclogermacreno	Sesquiterpeno

**Fuente:** Elaboración propia: reporte de datos biblioteca NIST1L, del equipo de CG-EM



## **Análisis y discusión de resultados**

En el análisis de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, mostro una composición predominante de terpenos.

En el trabajo realizado por Taylor A. “Evaluación del efecto Analgésico y Antiinflamatorio y sedante del extracto de diclorometano extraído del *Schinus molle*. USA.2016”<sup>27</sup>, donde encontró mediante cromatografía dos compuestos constituyentes isomasticadieno y Masticatrienonato concluyendo que uno de ellos contribuye al efecto analgésico o antiinflamatorio, en nuestros resultados no se encontraron dichos componentes debido a que se usó aceite esencial y no un extracto.

En el trabajo realizado por Steider P. “Composición química del aceite esencial de *Schinus molle* y sus actividades biológicas”. Rev. Cubana Farm. 2015”<sup>14</sup> en cuyo trabajo separo 19 sustancias entre las que se encontró el biciclogermacreno (20.5%), beta-cariofileno (19.7%) y espatulenol (19.2%). El biciclogermacreno presente en el aceite esencial de *Schinus molle*, actúa como un potencial agente antiinflamatorio, antioxidante, protector de la mucosa gástrica, anestésico local, anti-acné y anticancerígeno, en nuestros resultados podemos encontrar la presencia de biclogermacreno en un porcentaje de 4.69%, este porcentaje es menor lo cual puede deberse a la región donde fue recolectada la planta.

En el estudio realizado por Tineo F. “Estudio experimental y modelamiento matemático para el proceso de extracción por lotes por arrastre con vapor de agua del aceite esencial libre del *Schinus molle*. Lima-2012”<sup>32</sup> que encontró principalmente : alfa- felandreno 32,73%, beta- mirceno 23,33%, beta-felandreno 11,38%, D- limoneno 11,34%, m-cimeno 3,88%, a-pineno 2,93% y en otro estudio realizado por López R. y Caso N. “Rendimiento y composición química de aceites esenciales de *Eucalyptus archeri* y *Schinus molle* - Valle del Mantaro- 2015”<sup>80</sup> se encontró como componentes mayoritarios en el aceite esencial de *Schinus molle* “molle”:  $\beta$ -mirceno (30,1%),  $\alpha$ - felandreno (26,4%),  $\beta$ -pineno (13,5%),  $\alpha$ -pineno (11,9%), limoneno (9,9%) y  $\beta$ -felandreno (5,7%).

Si hacemos las comparaciones de estos estudios con los resultados obtenidos, se observa como componente mayoritario en nuestro estudio al Alfa-felandreno con un porcentaje de 19.17%, este porcentaje tiene una diferencia significativa, por el entorno en el cual se recolecto la planta, las estaciones y métodos de extracción, es así que se observa la principal presencia de terpenos en abundancia como también en los otros estudios, entonces podemos decir que nuestro estudio es de un alta calidad y pureza y es apto para realizar los estudios terapéuticos.

## 4.5 PREFORMULACIÓN Y ENSAYOS DE FORMULACIÓN

TABLA N° 11. ENSAYOS DE PREFORMULACIÓN

FÓRMULA N°1 (W/O)	FÓRMULA N°2 (O/W)	FÓRMULA N°3 (O/W)
Alcohol cetílico	Ácido esteárico	Cera Lanette
Cera de abeja	Álcali (KOH)	Tween 80
Propilenglicol	Glicerina	Glicerina
Lauril sulfato de sodio	Agua	Metilparabeno
Nipagin	Metilparabeno	Propilparabeno
Nipasol	Propilparabeno	Agua Destilada
Agua destilada	-	-
Aceite esencial de <i>Schinus molle</i> "molle"	Aceite esencial de <i>Schinus molle</i> "molle"	Aceite esencial de <i>Schinus molle</i> "molle"

Fuente: Narro J. "Sistema de laboratorios para el desarrollo y la innovación" <sup>73</sup>

### Análisis y discusión de resultados

Para la determinación de la forma farmacéutica se evaluó las características de preparaciones semisólidas teniendo como referencia, el aspecto final, facilidad de fabricación, estabilidad, costos entre otros.

Se realizó la elección de la forma farmacéutica mediante el proceso de pre formulación, con ayuda bibliográfica dentro del ámbito de formulaciones magistrales. Así mismo la elección de la forma farmacéutica se dio por ser más compatible con el aceite esencial, lo que nos ayudaría durante el proceso de acoplamiento, del principio activo (aceite esencial de *Schinus molle* "molle").

Teniendo en cuenta los tipos de emulsiones, la fórmula N°1 es agua en aceite (W/O), por lo que el medio de dispersión es el aceite. Florez J. <sup>88</sup>, indica que la absorción puede facilitarse mezclando drogas con sustancias grasas y friccionarlas con la piel.

Las formulas N°2 y N°3 son de tipo aceite en agua O/W estas tienden a ser no grasas, y se eliminan fácilmente de la piel, se usan externamente para producir un efecto refrescante, siendo su medio de dispersión el agua, no permitiendo una buena acoplación al aceite esencial de *Schinus molle* "molle". Viendo las formas farmacéuticas a escoger y viendo nuestro principio activo se escogió la crema W/O (Formula N°1).

Dentro de la etapa de pre-formulación y formulación se tomó en cuenta los procedimientos de buenas prácticas de fabricación, para tener un estricto control y usando los excipientes con calidad necesaria para garantizar su acción terapéutica, así como la vida útil de la crema elaborada durante el proceso experimental.

Por otro lado la elección de los excipientes nos ayudó a determinar nuestra forma farmacéutica adecuada, como también, otorgaron su estabilidad, compatibilidad entre

ellos, así mismo fue conveniente añadir un humectante para evitar su desecamiento por evaporación de agua <sup>89</sup>, por lo que se eligió al propilenglicol por los beneficios brindados y observados durante el proceso de pre formulación; por otro lado en el proceso de pre formulación se observaron incompatibilidades con las formulas N°2 y N°3 con los componentes del aceite esencial donde se observó mala fluidez; también se observó la oxidación del producto final de estas fórmulas esto atribuido a la presencia de terpenos y en especial a sus derivados alfa y beta pinenos en contacto con el oxígeno del medio ambiente <sup>90</sup>. La fórmula N° 1 fue la que mejor compatibilidad tuvo con el aceite esencial de *Schinus molle* “molle, siendo elegida para el estudio.

La elección de los excipientes nos da ciertas ventajas ya que nuestra parte oleosa nos permitirá una fase continua con la piel (que es de naturaleza lipídica) que facilitara el ingreso de nuestro principio activo y por otro lado la fase acuosa nos proporcionó mayor estabilidad a la formación de micelas de aceite esencial suspendidas en la formulación <sup>91</sup> por consiguiente, los excipientes elegidos mejoraron el aspecto y estabilidad del producto final. Lo que se terminó por envasar en pote de polietileno de alta densidad, rígido, resistente de color denso y menos duro y que está recomendado por la USP 37.

#### 4.5.1. RESULTADOS DEL CONTROL FISICOQUÍMICO DE LA PREFORMULACIÓN Y ENSAYOS DE FORMULACIÓN

TABLA N° 12. RESULTADOS DEL CONTROL FISICOQUÍMICO DE LAS PREFORMULACIONES

PARÁMETROS	FÓRMULA N°1	FÓRMULA N°2	FÓRMULA N°3
pH	6.5	6	6
Densidad	0.9909 g/mL	1.7045 g/mL	1.7047g/mL
Extensibilidad	49,639 cm <sup>2</sup>	20,67 cm <sup>2</sup>	35.84 cm <sup>2</sup>
HLB	8.07	13.33	11.515
Centrifugación	estable	Separación de fases	estable
Estrés térmico	estable	Separación de fases	Separación de fases
Estabilidad física a 40C°	estable	Separación de fases	Separación de fases

**Fuente:** Elaboración propia según datos experimentales

#### Análisis y discusión de resultados

Se realizaron 3 formulaciones para poder determinar los componentes y las concentraciones, quedando como formulación final la Formula N°1 demostrando características fisicoquímicas y organolépticas aceptables, el cual permite una buena

incorporación del aceite esencial de *Schinus molle* "molle", dando humectación a la piel, evitando el resecamiento y con una elaboración rápida.

Haciendo una comparación con los estudios realizados por Malpartida S. denominado "Evaluación del cumplimiento de los parámetros organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos en cremas y geles elaborados a base de baba de caracol expendidos en casas o centros naturistas de la ciudad de Cusco-2013" <sup>92</sup> en la que realiza el control de calidad de cremas y geles a base de baba de caracol encontrando valores de pH entre 4.5 y 8.5. En sus ensayos determina el pH con un límite mínimo de 6 y máximo de 7. En nuestro estudio se obtuvo un pH de 6.5, 6 y 6 para las formulaciones 1, 2 y 3 respectivamente. Comparando nuestros resultados podemos decir que las formulaciones a distintas concentraciones se encuentran dentro del rango establecido para el pH.

La mayoría de los terpenos son ácidos débiles con un pKa aproximadamente de 5. Desde el punto de vista farmacocinético esto significa que necesitan un medio a pH ligeramente ácido para que el equilibrio químico se desplace a su forma no ionizada y puedan atravesar las membranas biológicas <sup>93</sup>. Los triterpenoides pueden atravesar las membranas como por ejemplo la BHE y por lo tanto absorberse tanto por vía tópica como oral, alcanzado con relativa facilidad concentraciones detectables en el LCR de los ratones en estudio <sup>94</sup>. Si tenemos en cuenta que nuestro aceite esencial este compuesto principalmente por terpenos, podemos decir que existe una buena absorción, gracias al PH, de la crema formulada.

La densidad realizada por el método del picnómetro muestra que la formulación 2 y 3 no se encuentran dentro del rango establecido por la USP 37 (De 0.9 a 1.01 g/mL), dando un resultado de 1.7045 g/mL y 1.7047g/mL respectivamente, sin embargo, la Formulación N° 1 tiene una densidad de 0.9909 encontrándose dentro del rango establecido por la USP 37.

Respecto al área de extensibilidad se obtuvo para la Formulación N° 1 (49,639 cm<sup>2</sup>), Formulación N° 2 (20,67 cm<sup>2</sup>) y formulación N° 3 (35.84 cm<sup>2</sup>). Teniendo como referencia un valor de 40-90 cm<sup>2</sup> según la USP 37, usando el método del porta objeto con pesas continuas de 50, 100, 200, 500 gr, mismas que fueron puestas durante 1 minuto <sup>95</sup>, en los que vemos que la Formulación N°1 está dentro del parámetro establecido según la USP 37, y las Formulas N°2 y N°3 no se encuentran dentro de los parámetros, esto podría ser por la incompatibilidad de los componentes de la formulación a la presencia del aceite esencial *Schinus molle* "molle", por lo que podemos decir que la Formulación N° 1 cumple con los parámetros de extensibilidad.

La formulación N°1 observado al microscopio óptico con luz ordinaria y un aumento de 100<sup>95</sup>, mostro una fase interna homogénea en cuanto al tamaño de los glóbulos de la fase oleosa; mientras que las Formulas N° 2 y N° 3, el tamaño de los glóbulos de la fase interna presentaron mayor diámetro, por lo que muestra una menor estabilidad.

Cuando se utilizan tensioactivos con un HLB similar al HLB de la fase oleosa. se obtienen emulsiones con glóbulos pequeños de fase interna, baja viscosidad y una gran estabilidad.<sup>95</sup>

Los resultados muestran un HLB de 8.07, para la Formulaci3n N° 1, siendo este bajo con respecto al requerido<sup>95</sup>; pero la presencia de cristales líquidos y de gotas secundarias, contribuyeron a la estabilidad, sin embargo la Formulaci3n N°2 y N°3 presentaron un HBL de 13.3 y 11.51 respectivamente, adecuado para una formulaci3n estable.

Los resultados obtenidos en la tabla N° 12 muestran que las Formulas N°2 y N°3 mostraron separaci3n de fases en los ensayos de estabilidad realizados (Centrifugaci3n, Estrés térmico y Estabilidad física a 40C°) pese a que tuvieron un HLB adecuado. Sin embargo, la Formula N°1 resulta ser estable a los ensayos de estabilidad física, pese a que presento un HLB bajo con respecto al requerido, siendo la formulaci3n N°1 la que cumple con los parámetros óptimos y la fórmula elegida para las demás pruebas.

#### 4.6. FORMULACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

TABLA N° 13. FORMULACIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

EXCIPIENTES	FÓRMULA N° 1				
	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 1%	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 2.5%	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 5%	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 10%	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 20%
Alcohol cetílico	15g	15g	15g	15g	15g
Cera de abeja	1g	1g	1g	1g	1g
Propilenglicol	10g	10g	10g	10g	10g
Lauril sulfato de sodio	2g	2g	2g	2g	2g
Aceite esencial de molle	1 ml	2.5 ml	5 ml	10 ml	20 ml
Nipagin	0.05g	0.05g	0.05g	0.05g	0.05g
Nipasol	0.022g	0.022g	0.022g	0.022g	0.022g
Agua destilada	c.s.p	c.s.p	c.s.p	c.s.p	c.s.p

Fuente: Elaboraci3n propia seg3n los datos experimentales

## **Análisis y discusión de resultados**

Para la elaboración de la forma farmacéutica se tomó en cuenta diferentes estudios sobre formulación para así poder obtener una crema optima que no interfiera en la evaluación del efecto analgésico y antiinflamatorio, así mismo se usó libros y material bibliográfico. Para esta parte se describió un análisis descriptivo que nos ayudó a la determinación de nuestros componentes.

Los aceites esenciales no son utilizados en una forma farmacéutica definida y con una dosis precisa <sup>31</sup>. Hay que tener en cuenta no obstante que algunas esencias pueden ser muy peligrosas si no son manipuladas con un criterio profesional, en la forma, la dosis y circunstancias apropiadas <sup>31</sup>. Por lo que las concentraciones elegidas para ser incorporadas fueron de 1%, 2.5% y 5%, de tal manera que se pueda evitar una toxicidad dérmica, asimismo se formuló la crema al 10% y 20 %, para evaluar la estabilidad que presenta encontrándose que estas tienden a perder la viscosidad adecuada.

El aceite esencial de *Schinus molle* “molle” se incorporó de manera adecuada, a las formulaciones elegidas de 1%, 2.5% y 5% presentando mejores características organolépticas y con un olor característico al aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, de color blanco y de muy buena consistencia en comparación a las formulaciones de 10% y 20%, que no presentaron buenas características.

Se considera que el aceite obtenido debió favorecer la posterior incorporación en una forma farmacéutica (crema W/O) y a su vez garantiza que los activos presentes en el aceite se mantuvieran y no precipitaran en la formulación, para esto se realizaron revisiones bibliográficas sobre los excipientes utilizados y se encontró que los excipientes no muestran incompatibilidad con los metabolitos secundarios encontrados (terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos).

Los parabenos son incompatibles con polisorbato 80, bentoina, tricilicato de magnesio, talco, goma tragacanto, alginato de sodio, sorbitol, atropina. Por lo que no presenta incompatibilidad con ninguno de los componentes de la formulación <sup>96</sup>. Así mismo se acompañó de humectantes como el propilenglicol.

Los factores que están asociados con la absorción de los medicamentos tras la absorción tópica son: la barrera cutánea, barrera natural para la penetración de estos preparados, el estrato corneo en cantidades importantes. También depende de la preparación tópica que favorecen su difusión, el tipo de piel en relación al contenido de agua, el PH del lugar de aplicación, el espesor y la vasodilatación facilitan la difusión y penetración <sup>57</sup>. Todos estos factores fueron corregidos de acuerdo a la formulación de la crema en estudio, para

ello se utilizó propilenglicol como humectante y para ayudar con la circulación cutánea local y se froto la zona a aplicar durante un minuto.

#### 4.6.1. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ORGANOLEPTICA DE LA CREMA ELABORADA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

TABLA N° 14. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ORGANOLÉPTICA

PARAMETROS	FORMULA N°1		
	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 1%	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 2.5%	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 5%
Aspecto	Semisólido homogéneo - uniforme	Semisólido homogéneo - uniforme	Semisólido homogéneo - uniforme
Color	Blanco	Blanco	Blanco
Olor	A aceite esencial de molle	A aceite esencial de molle	A aceite esencial de molle
Sensación al tacto	Refrescante	Refrescante	Refrescante
Consistencia	Buena	Buena	Buena
Compatibilidad de excipientes	Si	Si	Si

**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

#### **Análisis y discusión de resultados**

El objetivo de este ensayo es de averiguar si realmente la formula elaborada tiene una óptima calidad. <sup>97</sup>

La agencia nacional de vigilancia sanitaria (ANVISA), nos dice que los parámetros a ser evaluados en los productos sometidos a pruebas de estabilidad deben ser definidos por el formulador e independiente de las características del producto en estudio y de los componentes utilizados en la formulación.

En la tabla N°14 se observa la crema formulada a diferentes concentraciones, la cual presento características organolépticas adecuadas con un aspecto semisólido homogéneo- uniforme, de color blanco, con olor característico al aceite esencial de *Schinus molle* “molle” de buena consistencia y que al aplicar sobre la piel tiene una sensación refrescante.

#### 4.6.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA CREMA ELABORADA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

TABLA N° 15. PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS PARA CREMAS

pH	DENSIDAD	EXTENSIBILIDAD
De 6 a 7	De 0.9 a 1.01 g/mL	99.26 cm <sup>2</sup>

FUENTE: Malpartida S.<sup>92</sup>

TABLA N° 16. RESULTADOS DEL CONTROL FÍSICOQUÍMICO DE LA CREMA TÓPICA A DISTINTAS CONCENTRACIONES

PARÁMETROS	FÓRMULA N° 1		
	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 1%	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 2.5%	CREMA CON ACEITE ESENCIAL AL 5%
pH	6.5	6.5	6.5
densidad	0.9905 g/mL	0.9902 g/mL	0.9874 g/mL
HLB	8.7	8,7	8,7
Centrifugación	estable	Estable	estable
Estrés térmico	estable	Estable	estable
Estabilidad física a 40C°	estable	Estable	estable

Fuente: elaboración propia según los datos experimentales

#### Análisis y discusión de resultados

En el diseño de una crema es importante seleccionar la formulación con las características organolépticas, fisicoquímicas para su administración, es decir con extensibilidad y textura apropiadas. Es indispensable asegurarse que la preparación se estéticamente aceptable y fácil de usar. La Formula N°1, evaluada a distintas concentraciones presentaron una buena consistencia, necesaria para garantizar una adecuada aplicación y permanencia en el sitio de acción.

En las preparaciones tópicas el PH debe ser neutro o débilmente ácido, lo más parecido a de la piel, el pH de todas las concentraciones de la crema presentó un valor de 6.5, lo anterior garantiza que la crema no provoque irritación al momento de la aplicación.

En el estudio realizado por Mujica V. "Formulación de un producto Cosmético con propiedades antiarrugas a partir del aceite de semilla de Meroy" <sup>99</sup> en el que obtiene para su formulación una densidad de 1,2468 g/ml, lo que nos permite corroborar el análisis



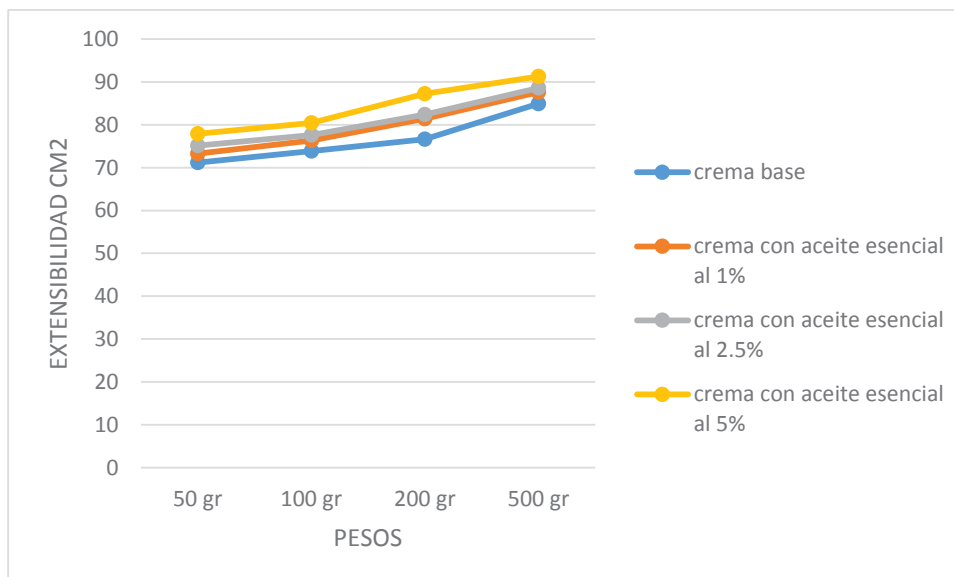
precedente a las muestras de nuestro estudio, en el cual obtuvimos una densidad de 0.9905 g/mL, para la formulación al 1%, 0.9902 g/mL para la formulación al 2.5% y 0.9874 g/mL para la formulación al 5%.

**TABLA N° 17. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXTENSIBILIDAD DE LA CREMA TÓPICA A DISTINTAS CONCENTRACIONES**

<b>EXTENSIBILIDAD A DIFERENTES PESOS</b>				
<b>MUESTRA</b>	<b>50 gr</b>	<b>100 gr</b>	<b>200 gr</b>	<b>500 gr</b>
Crema base	71.2 cm <sup>2</sup>	74.6 cm <sup>2</sup>	76.7 cm <sup>2</sup>	85.5 cm <sup>2</sup>
Crema con aceite esencial al 1%	73.3 cm <sup>2</sup>	76.4 cm <sup>2</sup>	81.4 cm <sup>2</sup>	87.6 cm <sup>2</sup>
Crema con aceite esencial al 2.5%	75.1 cm <sup>2</sup>	77.6 cm <sup>2</sup>	82.4 cm <sup>2</sup>	88.6 cm <sup>2</sup>
Crema con aceite esencial al 5%	77.9 cm <sup>2</sup>	80.4 cm <sup>2</sup>	87.3 cm <sup>2</sup>	91.3 cm <sup>2</sup>

**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

**GRÁFICO N° 2. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXTENSIBILIDAD DE LA CREMA TÓPICA A DISTINTAS CONCENTRACIONES**



**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

## **Análisis y discusión de resultados**

En la tabla N° 17 se observa que la forma farmacéutica a diferentes concentraciones, sometidos a pesos de 50, 100, 200 y 500 gr en intervalos de un minuto, presentan valores de extensibilidad aceptables, siendo el límite máximo 99.26 cm<sup>2</sup>.

En nuestro estudio se observa que la extensibilidad a 500 gr de la crema base tiene 85.5 cm<sup>2</sup>, la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" al 1% tiene 87.6 cm<sup>2</sup>, la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" al 2.5% tiene 88.6 cm<sup>2</sup>, la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" al 5% tiene 91.3 cm<sup>2</sup>, siendo mayor que la crema base, pero que no exceden los límites de aceptación siendo un máximo de 99.26 cm<sup>2</sup> el área de aceptación.

Se concluyó que la crema posee características fisicoquímicas (extensibilidad) óptimas para una crema.

En el estudio realizado por Omonte A. "Actividad antioxidante de la crema elaborada a base de los compuestos fenólicos aislados de las flores de *Mutisia acuminata* R&P "chinchilcoma". Ayacucho, 2013" <sup>100</sup>. La extensibilidad bajo 500 g de peso ejercido fue: al 1%, con mayor extensibilidad (91.1 cm<sup>2</sup>), seguida de la crema al 2% (90,3 cm<sup>2</sup>) y finalmente la de 5% (86,1 cm<sup>2</sup>) Ligeramente mayor que la crema base (84,3 cm<sup>2</sup>).

En nuestro estudio se observa que la extensibilidad a 500 gr de la crema base tiene 85.5 cm<sup>2</sup>, la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" al 1% tiene 87.6 cm<sup>2</sup>, la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" al 2.5% tiene 88.6 cm<sup>2</sup>, la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" al 5% tiene 91.3 cm<sup>2</sup>, estos resultados son mayores que la crema base, pero no exceden los límites de aceptación siendo un máximo de 99.26 cm<sup>2</sup> el área de aceptación.

Se concluye que la crema posee características fisicoquímicas (extensibilidad) óptimas para una crema.

En el estudio por Pérez, T. "Comportamiento reológico y extensibilidad de una formulación semisólida a partir del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L." <sup>77</sup>. La extensibilidad proporciona una medida del umbral de deformación del sistema y guarda estrecha relación con la apariencia de formulaciones semisólidas, donde indica que no deben ser poco extensibles ni demasiado extensibles ya que sería desagradable en la aplicación por lo tanto incómodo para el usuario, por lo que se requiere que estén en punto medio y que tenga estabilidad en el tiempo. <sup>77</sup>

En el estudio realizado por Signorelli, L. Isla, M. "Elaboración de una crema para uso tópico a base de *Urtica dioica* L. Revista de la Facultad de Farmacia; 2005; 47 (2)" <sup>101</sup> se observó que la extensibilidad es inversamente proporcional a la consistencia de las

muestras y aproximadamente proporcional al peso aplicado (a mayor peso, mayor extensibilidad), lo cual sugiere que sólo una medición sería suficiente para caracterizarlas. Respecto al área de extensibilidad, todas las concentraciones se mantuvieron dentro del límite establecido, donde a mayor concentración de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” mayor será la extensibilidad. Este parámetro y la densidad adecuada permite una buena incorporación del aceite esencial, dando humectación a la piel, evitando el resecamiento y con una elaboración rápida.

#### 4.6.3. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LA CREMA ELABORADA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE”

Las cremas tópicas a las concentraciones de 1%, 2.5% y 5% fueron sometidas a pruebas microbiológicas necesarias para cumplir con los requisitos establecidos por United States Pharmacopeia (USP 37).<sup>78</sup>

TABLA N° 18. RESULTADOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LA CREMA TÓPICA

CRITERIOS	CREMAS	MICROORGANISMO	RESULTADOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Criterio imperativo</li> <li>• Criterio indicativo de higiene</li> <li>• Criterio de alerta o límite crítico</li> </ul>	Al 1%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pseudomona Aureginosa</li> <li>• Staphylococcus aureus</li> <li>• Coliformes fecales (E. coli)</li> <li>• Mesófilos Aerobios</li> <li>• Hongos y levaduras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausente</li> <li>• Ausente</li> <li>• Ausente</li> <li>• &lt;10<sup>3</sup> UFC</li> <li>• &lt;10<sup>2</sup> UFC</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Criterio imperativo</li> <li>• Criterio indicativo de higiene</li> <li>• Criterio de alerta o límite crítico</li> </ul>	Al 2.5%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pseudomona Aureginosa</li> <li>• Staphylococcus aureus</li> <li>• Coliformes fecales (E. coli)</li> <li>• Mesófilos Aerobios</li> <li>• Hongos y levaduras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausente</li> <li>• Ausente</li> <li>• Ausente</li> <li>• &lt;10<sup>3</sup> UFC</li> <li>• &lt;10<sup>2</sup> UFC</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Criterio imperativo</li> <li>• Criterio indicativo de higiene</li> <li>• Criterio de alerta o límite crítico</li> </ul>	Al 5%	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pseudomona Aureginosa</li> <li>• Staphylococcus aureus</li> <li>• Coliformes fecales (E. coli)</li> <li>• Mesófilos Aerobios</li> <li>• Hongos y levaduras</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausente</li> <li>• Ausente</li> <li>• Ausente</li> <li>• &lt;10<sup>3</sup> UFC</li> <li>• &lt;10<sup>2</sup> UFC</li> </ul>

Fuente: Elaboración propia según los datos experimentales y USP 37<sup>78</sup>

## **Análisis y discusión de resultados**

La crema tópica al 1%, 2.5% y 5% formulado a base del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, fueron evaluados de acuerdo a los criterios imperativo, indicativo y criterios de alerta; en la tabla N° 18 se ve que todos los criterios evaluados en el análisis se encontraban dentro de los límites permisibles establecidos por la Unites States Pharmacopeia (USP 37) <sup>78</sup>. Estos resultados indican que las cremas tópicas al 1%, 2.5% y 5% se encuentran libre de contaminación por microorganismos patógenos, calificando al producto “crema tópica” sin deficiencia y apto para la realización de los diferentes ensayos de la investigación.

### **4.7 RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANALGÉSICO POR EL METODO DE HOT PLATE**

Para la evaluación del efecto analgésico de la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, se usó el test nocivo de calor-inducido hot plate que mide dolor agudo debido a la activación de nociceptores centrales en el tejido dañado, el punto de término es el salto o lamida de las patas y manos del ratón.

**TABLA N° 19. MEDICIÓN DEL TIEMPO DE NOCICEPCIÓN DEL DOLOR DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CREMA CON ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE” A DIFERENTES CONCENTRACIONES A LOS GRUPOS EXPERIMENTALES**

GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN	Latencia (tiempo)						
	N (ratón)	Promedio (latencia basal)	Tiempo de cut off	Primer estímulo 15min	Segundo estímulo 30 min	Tercer estímulo 45 min	Cuarto estímulo 60 min
GRUPO N°1 ACEITE ESENCIAL 1%	R1	15.08	33.51	19.47	24.50	18.41	17.50
	R2	16.89	37.53	22.37	28.31	23.66	20.81
	R3	17.55	39.00	25.43	29.51	24.10	23.42
	R4	15.78	35.07	21.78	27.04	20.96	18.73
	R5	16.89	37.53	21.73	25.09	19.95	17.64
	<b>PROMEDIO</b>	16.44	36.53	22.16	26.89	21.42	19.62
GRUPO N°2 ACEITE ESENCIAL 2.5%	R1	17.45	38.78	25.03	31.72	27.41	20.87
	R2	15.97	35.49	26.57	30.69	29.40	20.56
	R3	16.76	37.24	26.57	29.56	27.43	23.78
	R4	16.34	36.31	27.17	30.45	25.70	16.89
	R5	15.89	35.31	26.17	29.26	23.79	19.56
	<b>PROMEDIO</b>	16.48	36.63	26.30	30.34	26.75	20.33
GRUPO N°3 ACEITE ESENCIAL 5%	R1	17.68	39.29	33.40	36.99	32.09	29.68
	R2	15.78	35.07	29.06	32.47	31.04	27.76
	R3	16.56	36.80	29.61	33.62	32.41	25.89
	R4	15.16	33.69	24.51	31.16	24.97	21.78
	R5	16.87	37.49	29.06	33.11	27.65	24.89
	<b>PROMEDIO</b>	16.41	36.47	29.13	33.47	29.63	26.00
GRUPO N°4 PATRON DICLOFENACO 1% (VOLTAREN-CREMIGEL)	R1	16.87	37.49	30.09	36.82	32.22	28.67
	R2	15.68	34.84	28.34	33.69	30.32	24.98
	R3	16.47	36.60	34.06	36.23	29.86	26.87
	R4	17.39	38.64	28.45	37.01	34.16	27.78
	R5	15.79	35.09	30.82	34.64	30.25	28.09
	<b>PROMEDIO</b>	16.44	36.53	30.35	35.68	31.36	27.28
GRUPO N°5 CONTROL - CREMA SIN ACEITE ESENCIAL	R1	16.78	37.29	17.24	16.27	17.24	17.78
	R2	16.81	37.36	16.94	17.96	16.45	16.56
	R3	16.41	36.47	15.92	15.81	15.36	15.02
	R4	15.95	35.44	15.34	15.84	16.16	16.78
	R5	15.47	34.38	15.15	16.88	15.47	16.04
	<b>PROMEDIO</b>	16.28	36.19	16.12	16.55	16.14	16.44

**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

### **Análisis y discusión de resultados**

En la tabla N° 19 se puede observar el tiempo de antinocicepción obtenidos experimentalmente mediante el método de Hot plate de cada grupo de experimentación.

El dolor agudo es producido por un daño tisular importante y su duración depende del lapso estimado como suficiente para que los tejidos sanen y generalmente desaparece cuando la afección que lo origina llega a término. Constituye un mecanismo fisiológico de alarma para limitar el daño e iniciar los procesos de reparación. Su curso temporal es propio de la lesión que lo originó. <sup>102</sup>

Las estructuras periféricas comprometidas en el desencadenamiento del dolor son las terminales nerviosas sensibles a estímulos nocivos o nociceptores, pertenecientes a las fibras sensoriales especializadas de los tejidos periféricos llamadas A $\delta$  y C, activadas solo por estímulos nocivos mecánicos, térmicos o químicos. Estas fibras conducen el estímulo eléctrico a una gran velocidad hasta el ganglio sensorial craneal y hasta llegar al asta dorsal de la médula. <sup>26</sup>

El receptor VR1 (vanilloide), responde a la estimulación térmica dolorosa cuando éste es estimulado repetidamente, generando una corriente iónica de sodio en el terminal axónico, lo que provoca una hipersensibilidad en el receptor provocando cambios en las moléculas receptoras o en los canales de sodio en el terminal axónico sensibilizando las fibras del dolor (Stander et al., 2005) <sup>103</sup>. La activación del receptor VR1 induce la formación de eicosanoides y la liberación de otros mediadores inflamatorios en los terminales, modulando así la señalización nociceptiva en las terminaciones cutáneas por efecto hiperalgésico (Southall et al., 2003) <sup>104</sup>. La prostaglandina E2 (PGE2) es la principal prostaglandina (PG) presente en la piel, y aumenta la liberación de sustancia P por parte de las neuronas sensitivas por activación del receptor VR1 (Stander et al., 2005) <sup>103</sup> que por otra parte es modulado también por receptores opioides periféricos.

La latencia de la respuesta es el tiempo que transcurre desde el inicio del estímulo periférico, transducción de éste en un estímulo eléctrico que es conducido por las fibras A $\delta$  (mielinizadas) y C (no mielinizadas) desde la periferia hasta el SNC y se mide en segundos. Las fibras A $\delta$  tipo I se activan a temperaturas comprendidas entre los 42 a 44°C, a diferencia de las de A $\delta$  tipo II, que son sensibles a temperaturas mayores de 52°C <sup>103</sup>. Esta latencia es la suma de una serie de latencias fisiológica, física y del comportamiento o reacción del animal.

Para que los AINEs puedan producir sus efectos terapéuticos deben concentrarse en el sitio apropiado y así lograr el paso a través de las membranas biológicas <sup>105</sup>. La capacidad

de una sustancia para atravesar membranas biológicas es uno de los aspectos fundamentales dentro de las características farmacocinéticas de una droga, ya que le permite acceder al sitio de acción y así, generar el efecto biológico (terapéutico o tóxico). Las propiedades fisicoquímicas como la constante de disociación pKA, el coeficiente de partición o reparto (Log P), y sus propiedades estéricas y electrónicas, tienen un impacto decisivo en la velocidad de absorción, transporte de una droga y su afinidad por el receptor. <sup>106</sup>

Para que una sustancia presente efecto analgésico in vivo, ésta debe ser capaz de atravesar membranas biológicas y este paso es favorecido cuando se presenta al estado no ionizado. El pKA de una sustancia representa el log negativo de la constante de disociación según la variación del pH del medio donde ella se encuentre. Dependiendo de la naturaleza de un compuesto, cuando este se distribuye en una mezcla de líquidos inmiscibles, como por ejemplo el sistema octanol-agua, se produce un reparto de las fracciones ionizadas y no ionizadas en ambos líquidos, de la siguiente manera: la fracción ionizada permanecerá en la fase acuosa en su mayor parte, y bajo condiciones normales solamente la fracción no ionizada de dicho compuesto penetrará la fase orgánica. <sup>107</sup>

El conocimiento del grado de lipofilia de una determinada sustancia permite relacionar algunas propiedades biológicas como la unión a enzima receptor, absorción, distribución, metabolismo, penetración al SNC, unión a proteína plasmática y la unión a tejidos. <sup>105</sup>

#### 4.7.1 PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA LA EVALUACION DEL EFECTO ANALGÉSICO DE LA CREMA ELABORADA CON ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* "MOLLE"

TABLA N° 20. PRUEBA DE NORMALIDAD PARA PROBAR SI LAS MEDICIONES SE APROXIMAN A UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL

Pruebas de normalidad							
	Crema con aceite esencial de molle	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
efecto	Crema al 1%	,203	5	,200*	,945	5	,699
	Crema al 2.5%	,187	5	,200*	,954	5	,768
	Crema al 5%	,272	5	,200*	,913	5	,488
	Patrón diclofenaco 1 % (Voltaren-cremigel)	,248	5	,200*	,888	5	,346
	control	,223	5	,200*	,875	5	,285

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.  
a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

#### Análisis y discusión de resultados

La prueba que se utilizó para verificar la normalidad de los datos en cada grupo fue la de Kolmogorov-Smimov y Shapiro-Wilk para confirmar la normalidad y probar si las mediciones se aproximan a una distribución normal esto debido a que esta última se utiliza muestras pequeñas (menores de 50 casos por grupo)

La hipótesis planteada.

Ho: los datos provienen de una población normal.

Ha: Los datos no provienen de una población normal.

Como el sig > 0.05 para todos los casos se acepta la hipótesis nula, afirmando así que cada muestra de cada grupo proviene de una distribución normal. Como el análisis de normalidad nos indica que dichos datos son normales podemos aplicar la prueba paramétrica análisis de varianzas de un factor (ANOVA) para comparar los grupos en nuestro experimento.

**TABLA N° 21. ANOVA PARA PROBAR SI EXISTE DIFERENCIA DE MEDIAS ENTRE LOS GRUPOS**

<b>ANOVA</b>					
<b>EFFECTO ANALGESICO</b>					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1124,530	4	281,132	107,739	,000
Dentro de grupos	52,187	20	2,609		
Total	1176,717	24			

**Fuente:** Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

### **Análisis y discusión de resultados**

En la Tabla N°21 se observa los resultados del análisis de varianza de un factor, que nos proporciona un nivel de confianza al 95%, para ver si las diferentes concentraciones de la crema elaborada con aceite esencial de *Schinus molle* "molle", aplicados por vía tópica tienen diferencia con respecto al efecto analgésico.

Las hipótesis planteadas para ANOVA son las siguientes:

Ho: el efecto analgésico es igual en todos los grupos

Ha: el efecto analgésico no es igual en todos los grupos

Como el sig = 0.000 < 0.05 se rechaza la hipótesis nula, entonces afirmamos que existe diferencias significativas en el efecto analgésico de cada grupo de experimentación con la crema elaborada del aceite esencial de *Schinus molle* "molle", a diferentes concentraciones.



**TABLA N° 22. DETERMINACIÓN DE HOMOGENEIDAD ENTRE LOS GRUPOS – PRUEBA DE TUKEY**

TRATAMIENTO					
HSD Tukey					
Crema con aceite esencial de molle	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Grupo control	5	16,5520			
Crema al 1%	5		26,8900		
Crema al 2.5%	5			30,3360	
Crema al 5%	5				33,4700
Patrón diclofenaco 1% (Voltaren- cremigel)	5				35,6780
Sig.		1,000	1,000	1,000	,234
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					

**Fuente:** Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

### **Análisis y discusión de resultados**

Para determinar la homogeneidad de los grupos se utilizó la prueba de Tukey en la que se muestra que el grupo patrón diclofenaco 1% (Voltaren - cremigel) y la crema con aceite esencial al 5% se encuentra en el cuarto subconjunto, demostrando un mayor efecto analgésico no homogéneo al de los demás grupos de experimentación, asimismo se observa que los subconjuntos 2 y 3, presentan diferencias estadísticamente significativas. El grupo control presenta diferencias estadísticamente significativas, formando un solo subconjunto.

**TABLA N° 23. PRUEBA DE LEVENE PARA PROBAR LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE LAS MEDICIONES DE LOS GRUPOS**

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,270	4	20	,315

**Fuente:** Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

### **Análisis y discusión de resultados**

Para corroborar que las medias obtenidas del efecto analgésico de cada grupo de experimentación son significativamente diferentes y así poder determinar que concentración es la más efectiva por lo que esta prueba nos indica:

Ho: Las varianzas en cada grupo son homogéneas.

Ha: Las varianzas en cada grupo son heterogéneas

Como el sig= 0.314>0.05 aceptamos la hipótesis nula y concluimos que las varianzas en cada grupo son homogéneas.

TABLA N° 24. GAMES HOWELL – COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA VER SI EXISTEN DIFERENCIAS MÚLTIPLES

Games-Howell Variable dependiente Efecto Analgésico						
(I) Crema con aceite esencial de molle	(J) Crema con aceite esencial de molle	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Crema al 1%	crema al 2.5%	-3,44600	1,04089	,087	-7,4360	,5440
	crema al 5%	-6,58000*	1,35525	,008	-11,2629	-1,8971
	Patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	-8,78800*	1,14604	,001	-12,8748	-4,7012
	control	10,33800*	1,02671	,001	6,3410	14,3350
Crema al 2.5%	crema al 1%	3,44600	1,04089	,087	-,5440	7,4360
	crema al 5%	-3,13400	1,06518	,133	-7,2386	,9706
	Patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	-5,34200*	,78187	,002	-8,1386	-2,5454
	control	13,78400*	,59333	,000	11,7307	15,8373
Crema al 5%	crema al 1%	6,58000*	1,35525	,008	1,8971	11,2629
	crema al 2.5%	3,13400	1,06518	,133	-,9706	7,2386
	Patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	-2,20800	1,16815	,400	-6,3920	1,9760
	control	16,91800*	1,05132	,000	12,8046	21,0314
Patrón Voltaren	crema al 1%	8,78800*	1,14604	,001	4,7012	12,8748
	crema al 2.5%	5,34200*	,78187	,002	2,5454	8,1386
	crema al 5%	2,20800	1,16815	,400	-1,9760	6,3920
	control	19,12600*	,76288	,000	16,3586	21,8934
Grupo control	crema al 1%	-10,33800*	1,02671	,001	-14,3350	-6,3410
	crema al 2.5%	-13,78400*	,59333	,000	-15,8373	-11,7307
	crema al 5%	-16,91800*	1,05132	,000	-21,0314	-12,8046
	Patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	-19,12600*	,76288	,000	-21,8934	-16,3586

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

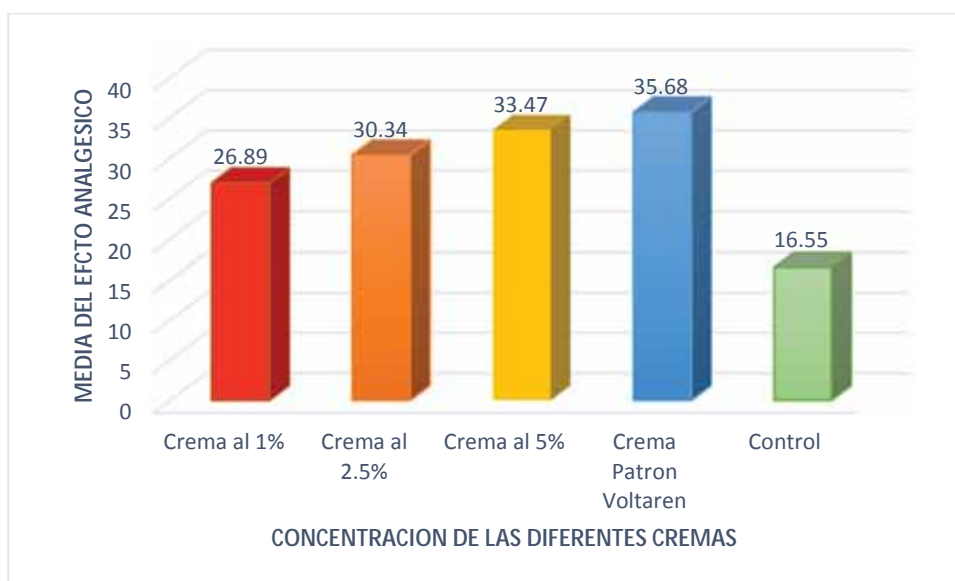
Fuente: Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

## Análisis y discusión de resultados

Según la prueba de comparación múltiple de Games-Howell para varianzas diferentes, nos permitió corroborar que las medias del efecto analgésico, son significativamente diferentes y que la crema elaborada al 5% se asemeja más al fármaco patrón

Por lo tanto, se concluye que la crema elaborada al 5% de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, aplicado por vía tópica tuvo un mejor efecto, en comparación con las otras cremas formuladas.

GRÁFICO N° 3. TIEMPO DE RESPUESTA NOCICEPTIVA EN RELACIÓN AL TRATAMIENTO



**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

## Análisis y discusión de resultados

El gráfico N°3, muestra el tiempo de la activación de nociceptores centrales en el tejido dañado, el cual fue medido con el salto o lamida de las patas y manos del ratón, se encontró un valor de 35.68s para la crema patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel), siendo este el tiempo máximo de efecto, seguido por la crema al 5% de *Schinus molle* “molle”, con un tiempo de 33.47, seguido de la crema al 2.5% de *Schinus molle* “molle” con un tiempo de 30.34, y la crema al 1% de *Schinus molle* “molle”, 26,89 s.

Podemos decir entonces que existe una diferencia significativa en cuanto al tiempo de latencia de actividad anti-nociceptiva, si comparamos con el grupo control que tuvo un tiempo de 16.55 s.

TABLA N° 25. PRUEBA INTERSUJETOS

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: EFECTO ANALGESICO					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	3575,842 <sup>a</sup>	19	188,202	43,190	,000
Intersección	63086,369	1	63086,369	14477,406	,000
CONCENTRACION	2850,046	4	712,511	163,511	,000
TIEMPO	556,474	3	185,491	42,568	,000
CONCENTRACION * TIEMPO	169,322	12	14,110	3,238	,001
Error	348,606	80	4,358		
Total	67010,817	100			
Total corregido	3924,448	99			
a. R al cuadrado = .911 (R al cuadrado ajustada = .890)					

Fuente: Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

#### Análisis y discusión de resultados

Esta prueba nos permite comparar dos factores en función de la variable dependiente (el efecto analgésico), al observar el cuadro con la prueba intersujetos, observamos que la concentración y el tiempo se encuentran por debajo de 0.05, lo que nos indica que el efecto analgésico del aceite esencial de *Schinus molle* "molle", depende de los factores del tiempo y la concentración de la crema.

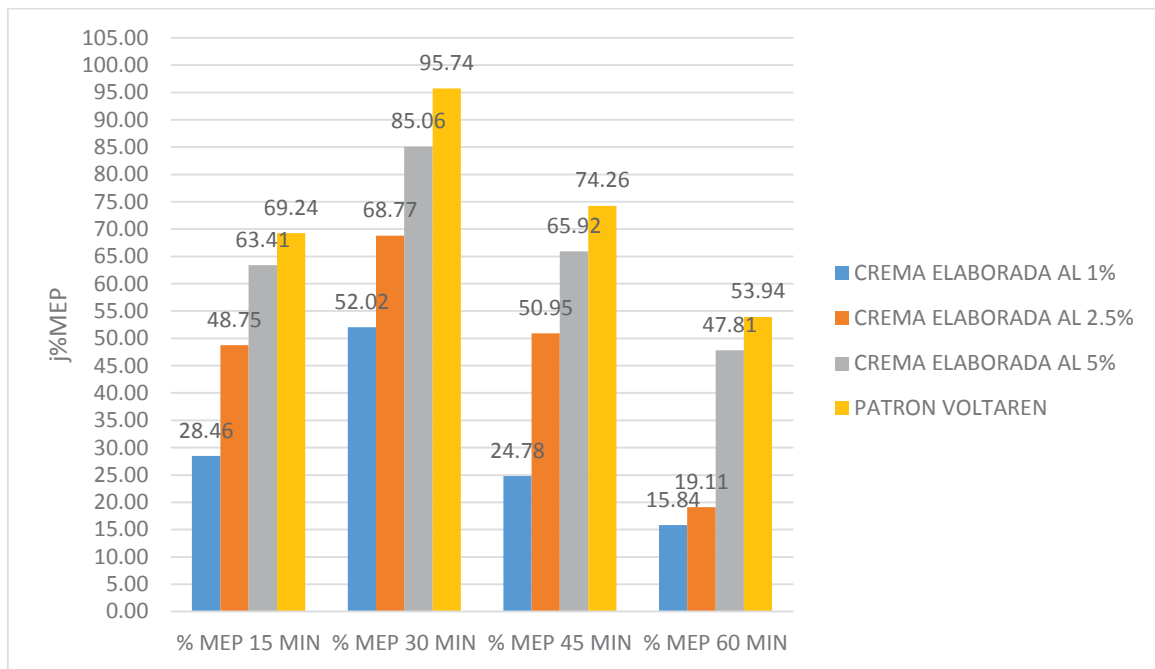
#### 4.7.2 PORCENTAJE DE MAXIMO EFECTO POSIBLE (%MEP)

TABLA N° 26. PORCENTAJE DEL MAXIMO EFECTO POSIBLE (MEP) EN CADA GRUPO DE ESTUDIO

$\%MEP = 100 \times \frac{(L2 - L1)}{(T1 - L1)}$				
CONCENTRACIÓN DE LA CREMA	15 MIN	30 MIN	45 MIN	60 MIN
CREMA ELABORADA AL 1%	28.46	52.02	24.78	15.84
CREMA ELABORADA AL 2.5%	48.75	68.77	50.95	19.11
CREMA ELABORADA AL 5%	63.41	85.06	65.92	47.81
PATRON DICLOFENACO 1% (VOLTAREN-CREMIGEL)	69.24	95.74	74.26	53.94

Fuente: Elaboración propia según los datos experimentales

GRÁFICO N° 4. PORCENTAJE DEL MAXIMO EFECTO POSIBLE (MEP)



**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

#### **Análisis y discusión de resultados**

De acuerdo al porcentaje de máximo efecto posible (%MEP) calculado la crema elaborada con aceite esencial de *Schinus molle* "molle" al 5% presenta valores de 63.41%, 85.06%, 65.92, 47.81%, a los tiempos de 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente, presentando un efecto máximo a los 30 minutos para después presentar una disminución progresiva del porcentaje de máximo efecto posible (%MEP).

La crema patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel) presentó un porcentaje de máximo efecto posible (MEP) de 69.24%, 95.74%, 74.26%, 53.94% a los tiempos de 15, 30, 45 ,60 minutos respectivamente, siendo el que tuvo mayor porcentaje de máximo efecto posible (MEP)

Al comparar los resultados de las cremas elaboradas al 1% y 2.5%, podemos decir que el porcentaje de máximo efecto posible (%MEP), que presentan ambas están por debajo del porcentaje de la crema patrón.

El estímulo térmico de la prueba de Hot Plate está focalizado tanto en la piel del animal, activando nociceptores ubicados en las capas superficiales de la piel como también en estructuras centrales. <sup>108</sup>

Stander <sup>103</sup> ha demostrado que los AINES no suben el umbral del dolor en los modelos térmicos en ratones, sin embargo, normalizarían la respuesta exagerada producida por la injuria térmica tisular y el mecanismo inflamatorio.

Se puede postular que debido a la condición de liposolubilidad de nuestro aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, este atravesaría fácilmente la barrera la piel del animal, este hecho también se refuerza por lo descrito por Paduch et al. (2007) <sup>11</sup>, que afirma que compuestos terpenoides apolares son utilizados con éxito en la cosmética para promover la absorción de otras sustancias a través de la piel. La explicación de este hallazgo se basa en que provocarían alteraciones reversibles en la capa lipídica del estrato córneo, facilitando así su absorción.

Arrau S., <sup>94</sup> encontró en su estudio que las diferencias en la capacidad antinociceptiva de las muestras de su estudio, podrían estar relacionadas con la capacidad inhibitoria de las COXs y adicionalmente por la inhibición de los receptores periféricos. Podemos postular entonces que la capacidad analgésica de nuestro aceite está relacionada con la capacidad de inhibir las COXs.

Se puede decir que la crema elaborada con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” al 5% presenta similar efecto que la crema patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel), si tenemos en cuenta el estudio realizado por Steider P. denominado “Composición química del aceite esencial de *Schinus molle* y sus actividades biológicas 2015” <sup>14</sup> donde encontró el metabolito terpeno denominado biciclogermacreno en una proporción de (20.5%), el cual es agente potencial antiinflamatorio, antioxidante, protector de la mucosa gástrica, anestésico local anti-acné y anticancerígeno, si tenemos en cuenta nuestro análisis por cromatografía de gases, encontramos el mismo componente en una proporción de (4.7%), lo que nos puede indicar que nuestro aceite esencial si presenta el efecto analgésico debido a este metabolito.

En el estudio realizado por Takaki I. “Efecto antiinflamatorio y antinocicepción del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en animales de experimentación” <sup>109</sup> encontró en su estudio la presencia de diferentes compuestos químicos presentes en el aceite esencial tales como linalol (14,15%), mirceno (36,37%) y 1,8-cineol (32%), en donde concluyen que estos pueden ser responsables de los efectos antinociceptivos, siendo el mirceno un monoterpeno que ha mostrado efectos antinociceptivos significativos en la placa caliente (Hot plate) y pruebas de retorcimiento inducidas por ácido acético, además demostraron que los efectos antiinflamatorios y antinociceptivos de su aceite esencial podrían ser parcialmente relacionado con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas o a la liberación de otros mediadores endógenos.

En el estudio realizado por Pergentino de Sousa D. "Actividad analgésica de los componentes de aceites esenciales" <sup>110</sup> demuestra que las moléculas bioactivas como  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, y (+) - limoneno que contienen átomos de C y H en sus estructuras químicas, han mostrado actividad farmacológica en diversos modelos de dolor y por diferentes vías de administración, los datos muestran que la mayoría de las clases químicas de compuestos que se encuentran en los aceites esenciales son efectivos en modelos de dolor. Deben actuar por diferentes mecanismos de acción que merecen más investigación. Las perspectivas de futuro para el desarrollo de nuevos analgésicos derivados de medicamentos esenciales.

Se puede concluir que la crema al 5% comparado con los resultados de la crema patrón presenta un %MEP similar al patrón, presentando un efecto antinociceptivo significativo. haciéndonos suponer que a mayor tiempo de aplicado el tratamiento seguirá presentando analgesia por lo que se elige la crema al 5% del aceite esencial de *Schinus molle* "molle", como la que más se aproxima a la crema patrón.

#### **4.8 EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA CREMA CON ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* "MOLLE"**

Para la evaluación del efecto antiinflamatorio de la crema con aceite esencial de *Schinus molle* "molle", el máximo efecto de la carragenina al 1% (agente inflamatorio) se obtiene al minuto de ser administrada, por lo que la evaluación de los grupos será a partir de este momento mediante la observación de la formación de edema.

**TABLA N° 27. MEDICIÓN DEL VOLUMEN PLANTAR ANTES Y DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA CARRAGENINA 1%, OBTENCIÓN DE LA DISMINUCIÓN FINAL DEL VOLUMEN DE EDEMA PLANTAR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.**

GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN	VOLUMEN PLANTAR SIN CARRAGENINA	VOLUMEN PLANTAR CON CARRAGENINA	MEDICIÓN DESPUES DE LA APLICACIÓN DE CARRAGENINA				
			1H	2H	3H	4H	
GRUPO N°1 ACEITE ESENCIAL 1%	R1	0.25	0.55	0.49	0.48	0.44	0.41
	R2	0.23	0.56	0.48	0.46	0.44	0.42
	R3	0.22	0.54	0.49	0.45	0.42	0.4
	R4	0.19	0.59	0.5	0.46	0.44	0.42
	R5	0.2	0.57	0.54	0.5	0.48	0.46
	<b>PROMEDIO</b>	0.22	0.56	0.50	0.47	0.44	0.42
GRUPO N°2 ACEITE ESENCIAL 2.5%	R1	0.20	0.54	0.48	0.38	0.36	0.33
	R2	0.18	0.57	0.49	0.38	0.35	0.3
	R3	0.22	0.58	0.45	0.43	0.38	0.34
	R4	0.20	0.55	0.43	0.38	0.32	0.29
	R5	0.18	0.55	0.38	0.35	0.31	0.28
	<b>PROMEDIO</b>	0.20	0.56	0.45	0.38	0.34	0.31
GRUPO N°3 ACEITE ESENCIAL 5%	R1	0.17	0.56	0.48	0.37	0.32	0.2
	R2	0.18	0.52	0.40	0.36	0.26	0.24
	R3	0.18	0.55	0.34	0.3	0.27	0.25
	R4	0.23	0.55	0.4	0.34	0.3	0.24
	R5	0.18	0.54	0.38	0.32	0.26	0.21
	<b>PROMEDIO</b>	0.19	0.54	0.40	0.34	0.28	0.22
GRUPO N°4 PATRON DICLOFENAC O 1% (VOLTAREN- CREMIGEL)	R1	0.18	0.57	0.38	0.26	0.21	0.19
	R2	0.2	0.58	0.34	0.29	0.25	0.20
	R3	0.18	0.52	0.32	0.28	0.22	0.21
	R4	0.19	0.51	0.35	0.24	0.20	0.19
	R5	0.17	0.58	0.36	0.24	0.22	0.18
	<b>PROMEDIO</b>	0.19	0.55	0.35	0.26	0.22	0.19
GRUPO N°5 CONTROL - CARRAGENINA 1%	R1	0.18	0.58	0.58	0.57	0.57	0.56
	R2	0.23	0.57	0.57	0.57	0.57	0.56
	R3	0.25	0.52	0.52	0.51	0.51	0.51
	R4	0.21	0.59	0.58	0.58	0.58	0.57
	R5	0.22	0.53	0.53	0.52	0.52	0.52
	<b>PROMEDIO</b>	0.22	0.56	0.56	0.55	0.55	0.54

**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales.

### **Análisis y discusión de resultados**

En la tabla N° 27 se puede observar el volumen plantar sin carragenina obtenidos experimentalmente (pata posterior derecha) y volumen plantar con carragenina (pata posterior derecha) de cada uno de los ratones, así como también las formaciones del edema plantar de cada grupo de experimentación.

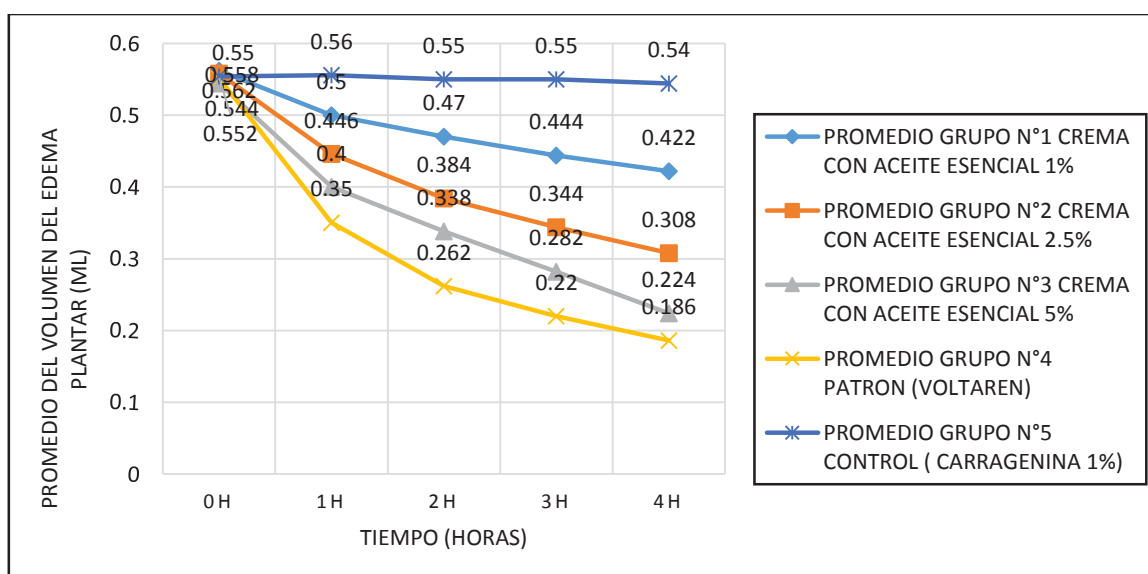


Se observa la formación de edema plantar con carragenina al 1% con un valor promedio 0.56 lo que muestra un grado de irritación elevada, provocando un edema agudo y demostrando la permeabilidad vascular y la inflamación en la pata posterior derecha de los animales de experimentación.

La inflamación es la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células por cualquier agresor de naturaleza biológica, química y física o mecánica. En ella participan numerosas células del sistema inmunitario y mediadores, se suele acompañar por enrojecimiento, calor tumefacción y dolor. Si bien el desarrollo del proceso inflamatorio representa una función de primer orden en la defensa del cuerpo, en ocasiones transcurre hacia una situación crónica que suele ser dañina, en donde el agente inflamatorio persiste por la incapacidad de un sistema inmunitario deficiente. Al persistir este proceso puede ocurrir la pérdida de la función del órgano afectado y dar lugar a enfermedades degenerativas. <sup>9</sup>

Los AINES constituyen un grupo farmacológico muy heterogéneo que tienen en común su mecanismo de acción, caracterizado por inhibir la síntesis de PG, las cuales se liberan cuando hay daño tisular y están presentes en los exudados inflamatorios, ejerciendo así un papel tanto en la sensibilización de los nociceptores, como en la mediación de procesos de inflamación, fiebre e interferencia en los mecanismos de agregación plaquetaria. <sup>111</sup>

GRÁFICO N° 5. PROMEDIO DEL VOLUMEN DE EDEMA PLANTAR



**Fuente:** Elaboracion propia según los datos experimentales

## **Análisis y discusión de resultados**

El gráfico N° 5 nos muestra la formación del volumen del edema plantar desde el inicio de la administración de la carragenina hasta las 4 horas, el cual es indicado en el protocolo; el edema a cabo de las 4 horas para la carragenina 1% se encontró un resultado de 0.54 siendo este el edema máximo, lo que indicaría una respuesta local evidenciada, este seguido de la crema a una concentración de 1%, que demuestra que no hubo una inhibición antiinflamatoria optima, luego está la crema a una concentración al 2.5%, y a la concentración de 5% que fue el que menor volumen de edematización tuvo en comparación al fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel) en la que se observa una mínima formación de edema plantar; los resultados obtenidos demuestran la acción inflamatoria de la carragenina al 1% que provoco un edema agudo en las pata posterior derecha de los ratones tratados.

Haciendo una comparación con el estudio realizado por Zeng Yuequin M. denominado "Aislamiento de dos triterpenoides y una biflavanona con actividad Antiinflamatoria de los frutos de *Schinus molle*"<sup>28</sup> donde se encontraron que los Triterpenos 1 y 2 son los más activos, inhibiendo el edema en 39% a y 48% respectivamente. Por otro lado, los triterpenos 1 y 2 inhiben el neutrófilo de infiltración en un 57% y 50 % respectivamente se demuestra que la planta en estudio tiene un buen efecto antiinflamatorio. En nuestro estudio una concentración de 5% fue el que menor volumen de edematización tuvo en comparación al fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel) en la que se observa una mínima formación de edema plantar.

**TABLA N° 28. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL VOLUMEN DE LOS EDEMAS DE CADA GRUPO EN ESTUDIO**

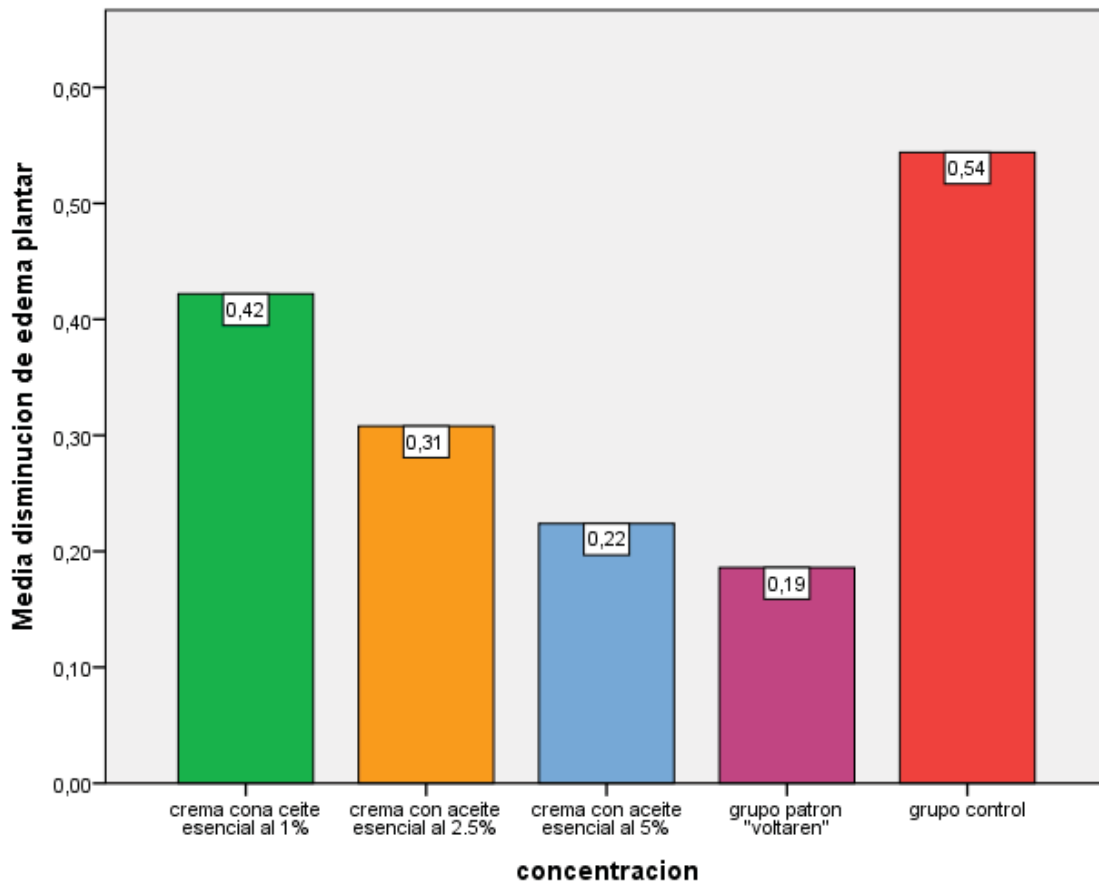
TRATAMIENTO	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Crema con aceite esencial al 1%	5	,4220	,02280	,01020	,3937	,4503	,40	,46
Crema con aceite esencial al 2.5%	5	,3080	,02588	,01158	,2759	,3401	,28	,34
Crema con aceite esencial al 5%	5	,2240	,02074	,00927	,1983	,2497	,20	,25
Grupo patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	5	,1860	,00894	,00400	,1749	,1971	,18	,20
Grupo control	5	,5440	,02702	,01208	,5105	,5775	,51	,57
Total	25	,3368	,13573	,02715	,2808	,3928	,18	,57

**Fuente:** Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

### **Análisis y discusión de resultados**

En cuanto a la disminución del edema respecto al tiempo frente a los tratamientos a distintas concentraciones, se observa que el grupo de la crema con aceite esencial al 1% fue quien demostró menor porcentaje de disminución de edema plantar, lo que indica que no tiene buena inhibición antiinflamatoria, a diferencia de la crema con aceite esencial al 5% que fue el grupo que demostró mayor porcentaje de disminución de edema plantar respecto al tiempo y con un buen efecto inhibitorio de inflamación.

GRÁFICO N° 6. DISMINUCIÓN DEL EDEMA PLANTAR (mL) EN RELACIÓN AL TRATAMIENTO



**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

### Análisis y discusión de resultados

En el gráfico N° 6 nos muestra la media del edema plantar al cabo de las 4 horas que indica la técnica, en el estudio realizado por Martel J. <sup>29</sup> denominado "Efecto citoprotector del aceite de molle (*Schinus molle*)" en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas". En el cual el aceite esencial de molle (*Schinus molle*) extraído, a dosis 0,15 ul tiene efecto citoprotector en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas, sobre todo con citoprotección de cada 8 horas. Evidenciando una menor inflamación a nivel de la mucosa gástrica.

En nuestro estudio se encontró un resultado de 0.54 para la carragenina al 1% siendo este el edema máximo, lo que indicaría una respuesta local evidenciada, este seguido de la crema a una concentración de 1%, que demuestra que no hubo una inhibición antiinflamatoria optima, luego está la crema a una concentración al 2.5%, y a la concentración de 5% que fue el que menor volumen de edematización tuvo en comparación al fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel).

#### 4.8.1 PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LA CREMA CON ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “MOLLE” A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

TABLA N° 29. PRUEBA DE NORMALIDAD PARA PROBAR SI LAS MEDICIONES SE APROXIMAN A UNA DISTRIBUCIÓN NORMAL

PRUEBAS DE NORMALIDAD							
TRATAMIENTO		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DISMINUCIÓN DE EDEMA PLANTAR	crema con aceite esencial al 1%	,335	5	,069	,860	5	,228
	crema con aceite esencial al 2.5%	,221	5	,200*	,915	5	,501
	crema con aceite esencial al 5%	,180	5	,200*	,952	5	,754
	grupo patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	,349	5	,046	,771	5	,046
	grupo control	,323	5	,096	,840	5	,166

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.  
a. Corrección de significación de Lilliefors

Fuente: Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

#### Análisis y discusión de resultados

La prueba que se utilizó para verificar la normalidad de los datos en cada grupo, fue la Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk para confirmar la normalidad y probar si las mediciones se aproximan a una distribución normal; esto debido a que esta última utiliza muestras pequeñas (menores de 50 casos por grupo).

H<sub>0</sub>: los datos provienen de una población normal.

H<sub>a</sub>: los datos no provienen de una población normal.

Como el sig.>0.05 para todos los casos se acepta la hipótesis nula, afirmando así que cada muestra de cada grupo proviene de una distribución normal.

Como el análisis de la normalidad nos indica que dichos datos son normales, podemos aplicar la prueba paramétrica análisis de varianzas de un factor (ANOVA) para comparar los grupos en nuestro experimento.

**TABLA N° 30. ANOVA PARA PROBAR SI EXISTEN DIFERENCIAS DE MEDIAS ENTRE LOS GRUPOS**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,432	4	,108	222,440	,000
Dentro de grupos	,010	20	,000		
Total	,442	24			

**Fuente:** Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

### **Análisis y discusión de resultados**

En la tabla N°30 se observa los resultados del análisis de varianza de un factor, que nos proporciona el nivel de confianza al 95% para ver si las diferentes concentraciones de la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” aplicado por vía tópica tienen diferencia con respecto a su efecto antiinflamatorio. Las hipótesis planteadas para ANOVA son las siguientes:

H<sub>0</sub>: el efecto antiinflamatorio es igual en todos los grupos.

H<sub>a</sub>: el efecto antiinflamatorio no es igual en todos los grupos.

Como el sig.<0.05 se rechaza la hipótesis nula, entonces afirmamos que existen diferencias significativas en el efecto antiinflamatorio de cada grupo de experimentación con la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a diferentes concentraciones.

**TABLA N° 31. DETERMINACIÓN DE HOMOGENEIDAD ENTRE GRUPOS- PRUEBA DE TUKEY**

<b>DISMINUCIÓN DE VOLUMEN DE EDEMA PLANTAR (mL)</b>					
HSD Tukey <sup>a</sup>					
<b>TRATAMIENTO</b>	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Grupo Patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	5	,1860			
Crema con aceite esencial al 5%	5	,2240			
Crema con aceite esencial al 2.5%	5		,3080		
Crema con aceite esencial al 1%	5			,4220	
Grupo control	5				,5440
Sig.		,085	1,000	1,000	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5.000.					

**Fuente:** Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

## **Análisis y discusión de resultados**

Para la determinación de la homogeneidad de los grupos se utilizó la prueba de Tukey en la que se muestra que el grupo patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel) se encuentra en el primer subconjunto demostrando un mayor efecto antiinflamatorio, así como también podemos ubicar en este subconjunto a la crema con aceite esencial al 5% el cual indica que no presenta diferencias significativas, lo cual no son homogéneos al de los demás grupos de experimentación, así mismo se observan que los subconjuntos 2, 3, presentan diferencias significativas estadísticamente.

El grupo control presenta diferencias estadísticamente significativas, formando un solo subconjunto.

Se puede visualizar a simple vista que el grupo de la crema con aceite esencial al 5% es el que mejor resultado obtuvo frente al edema plantar, después de la crema patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)

*TABLA N° 32. PRUEBA DE LEVENE PARA PROBAR LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE LAS MEDICIONES DE LOS GRUPOS*

<b>Estadístico de Levene</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
2,121	4	20	,116

**Fuente:** Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25

## **Análisis e discusión de resultados**

Para corroborar que las medias obtenidas de las formaciones de edema plantar de cada grupo de experimentación son significativamente diferentes y así poder determinar que concentración es más efectiva, por lo que esta prueba nos indica:

H<sub>0</sub>: las varianzas en cada grupo son homogéneos.

H<sub>a</sub>: las varianzas en cada grupo son heterogéneos.

Como el sig.= 0.116 >0.05 aceptamos la hipótesis nula, entonces concluimos que las varianzas en cada grupo son homogéneas.

TABLA N° 33. PRUEBA DE GAMES HOWELL- COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA VER SI EXISTE DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
crema con aceite esencial al 1%	crema con aceite esencial al 2.5%	,11400*	,01543	,001	,0605	,1675
	crema con aceite esencial al 5%	,19800*	,01378	,000	,1503	,2457
	grupo patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	,23600*	,01095	,000	,1927	,2793
	grupo control	-,12200*	,01581	,000	-,1770	-,0670
crema con aceite esencial al 2.5%	crema con aceite esencial al 1%	-,11400*	,01543	,001	-,1675	-,0605
	crema con aceite esencial al 5%	,08400*	,01483	,004	,0322	,1358
	grupo patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	,12200*	,01225	,001	,0726	,1714
	grupo control	-,23600*	,01673	,000	-,2938	-,1782
crema con aceite esencial al 5%	crema con aceite esencial al 1%	-,19800*	,01378	,000	-,2457	-,1503
	crema con aceite esencial al 2.5%	-,08400*	,01483	,004	-,1358	-,0322
	grupo patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	,03800	,01010	,056	-,0012	,0772
	grupo control	-,32000*	,01523	,000	-,3735	-,2665
grupo patrón "voltaren"	crema con aceite esencial al 1%	-,23600*	,01095	,000	-,2793	-,1927
	crema con aceite esencial al 2.5%	-,12200*	,01225	,001	-,1714	-,0726
	crema con aceite esencial al 5%	-,03800	,01010	,056	-,0772	,0012
	grupo control	-,35800*	,01273	,000	-,4096	-,3064
grupo control	crema con aceite esencial al 1%	,12200*	,01581	,000	,0670	,1770
	crema con aceite esencial al 2.5%	,23600*	,01673	,000	,1782	,2938
	crema con aceite esencial al 5%	,32000*	,01523	,000	,2665	,3735
	grupo patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	,35800*	,01273	,000	,3064	,4096

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**Fuente:** Elaboración propia según los datos obtenidos del SPSS 25



## Análisis y discusión de resultados

Según la prueba de comparación múltiple de Games Howell para varianzas diferentes, nos permitió corroborar que las medias de los edemas plantares (efecto antiinflamatorio) son significativamente diferentes y que la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a la concentración de 5% obtuvo una menor formación de edema plantar a las 4 horas (mejor efecto antiinflamatorio) y es el que más se asemeja al fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel).

Por lo tanto, se concluye que la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a la concentración de 5% aplicado por vía tópica obtuvo un mejor efecto antiinflamatorio en comparación con las demás formulaciones.

### 4.8.2 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN INFLAMATORIA

TABLA N° 34. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN			
	$\% \text{Inhibición aguda} = \frac{\text{problema} - \text{patrón}}{\text{problema}} \times 100$			
	1H	2H	3H	4H
GRUPO N°1 CREMA CON ACEITE ESENCIAL 1%	16.57	24.10	31.93	37.42
GRUPO N°2 CREMA CON ACEITE ESENCIAL 2.5%	26.04	43.37	55.42	65.64
GRUPO N°3 CREMA CON ACEITE ESENCIAL 5%	37.28	54.82	71.69	88.96
GRUPO N°4 PATRON (VOLTAREN)	50.89	76.51	89.16	96.93
GRUPO N°5 CONTROL (CARRAGENINA 1%)	-	-	0	0

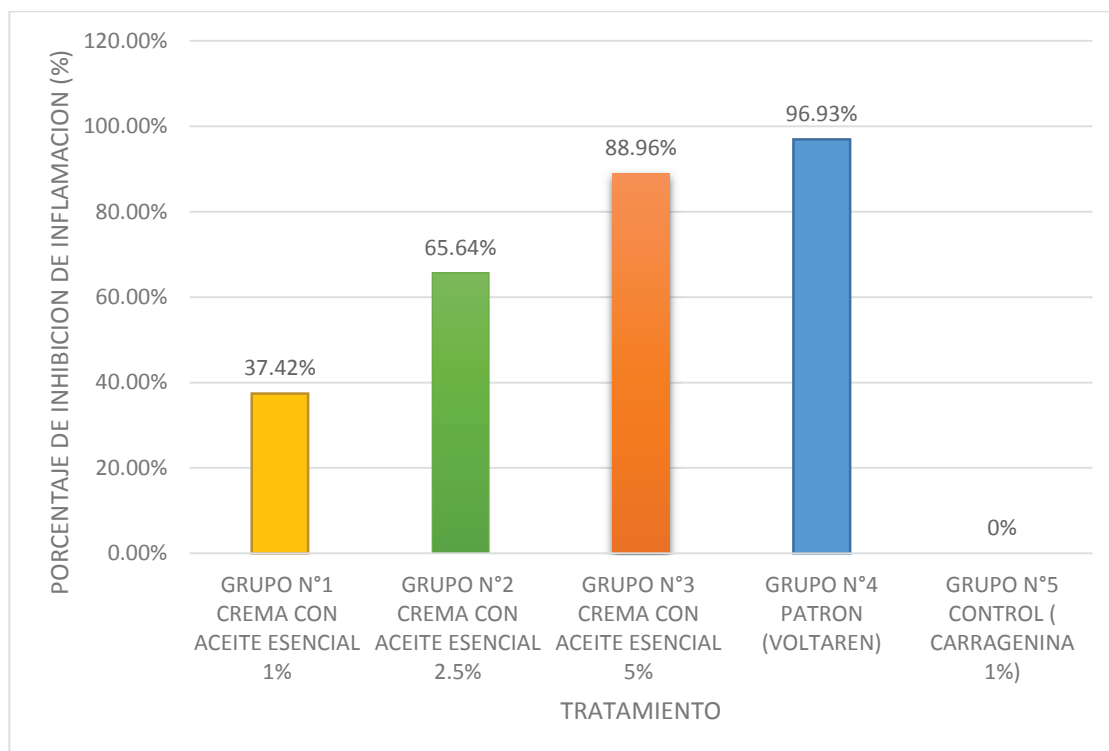
Fuente: Elaboración propia según los datos experimentales

## Análisis y discusión de resultados

De acuerdo a la evaluación farmacológica en la tabla N° 34, se demuestra el porcentaje de inhibición de las cremas a diferentes concentraciones, se observa que la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a la concentración de

5% obtuvo un mejor efecto a diferencia del resto de las concentraciones, ya que su valor obtenido fue de 88.96%, siendo el más cercano al fármaco patrón que fue el diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel).

GRÁFICO N° 7. PORCENTAJE DE INHIBICIÓN



**Fuente:** Elaboración propia según los datos experimentales

### Análisis y discusión de resultados

En el grafico N° 7 se puede observar que a medida que aumenta la concentración de la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” mayor es el porcentaje de inhibición de inflamación, la crema con aceite esencial a la concentración de 5% tiene mayor porcentaje de inhibición de la inflamación (88.96%), y es el que se aproxima más al fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel) que tiene un porcentaje de inhibición de inflamación de (96.93 %).

Estos resultados demuestran que la crema con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” tiene propiedades analgésicas y antiinflamatorias, que apoya el uso de esta planta en la medicina popular <sup>112</sup>. Haciendo las comparaciones respectivas se observa que en nuestro estudio se tiene porcentajes menores de mirceno y pineno, los cuales demuestran porcentajes de inhibición de la inflamación significativos bajo una forma farmacéutica “crema”. Confirmando así la actividad

analgésica y antiinflamatoria del mirceno y pineno presentes es el aceite esencial del *Schinus molle* “molle”.

Haciendo una comparación con el estudio realizado por Zeng Yuequin M. denominado “Aislamiento de dos triterpenoides y una biflavanona con actividad Antiinflamatoria de los frutos de *Schinus molle*”<sup>28</sup> donde se encontraron que los Triterpenos 1 y 2 son los más activos, inhibiendo el edema en 39% a y 48% respectivamente. Por otro lado, los triterpenos 1 y 2 inhiben el neutrófilo de infiltración en un 57% y 50 % respectivamente, se demuestra que la planta en estudio tiene un buen efecto antiinflamatorio.

Así mismo tenemos estudios relacionados con el porcentaje de inhibición en el estudio realizado por Esteban V., Rodríguez E., en su estudio titulado “Actividad analgésica del extracto y antiinflamatoria de una crema formulada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de *Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg “Pan de árbol” en ratones” 2016, Lima – Perú”<sup>113</sup>. Donde se observó que la actividad antiinflamatoria del diclofenaco al 1% en gel comparado con el efecto de la crema formulada a base del extracto al 10% presenta un 67% y 65% respectivamente de inhibición de la inflamación, demostrando que la crema formulada a base del extracto al 10% posee actividad antiinflamatoria. Observando este estudio se observa que nuestra crema al 5% de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” fue el más efectivo obteniendo un porcentaje de inhibición de (88.96%), con una comparación al fármaco patrón el cual tuvo un porcentaje de inhibición de (96.93 %).

En los animales de laboratorio están claramente demostrado que los terpenos tienen propiedades sedantes, hipnóticas, analgésicas y de relajante muscular. Su mecanismo de acción no está totalmente descubierto, pero podría tener efectos adrenérgicos y/u opioides, ya que el efecto analgésico es bloqueado por un antagonista opioide. Se ha demostrado también que el mirceno altera la barrera hematoencefálica. Favoreciendo la entrada al cerebro de los cannabinoides y produciendo un aumento de los efectos.<sup>86, 87</sup>

El pineno es el terpeno más ampliamente distribuido en la naturaleza. Tienen una ampliamente actividad antibiótica, incluso frente a patógenos resistentes a los antibióticos. Una de las mayores actividades terapéuticas que tiene es la de antiinflamatorio, interfiriendo la vía de señalización inflamatoria de las prostaglandinas de manera similar al mirceno.<sup>86, 87</sup>

## CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo de investigación se determinó que la crema elaborada a base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a la concentración de 5% presentó un máximo efecto posible de 85.06 % a los 30 min y un porcentaje de inhibición de la inflamación de 88.96%.
2. En la prueba de solubilidad del aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, se demostró que dicho aceite presenta una polaridad intermedia debido a que es parcialmente soluble en etanol al 85% y 96% y totalmente soluble en acetona, éter etílico, éter de petróleo y cloroformo. La densidad obtenida por el método picnométrico fue de 0.8693 gr/mL, el índice de refracción calculado fue de 1.7052 y el poder rotatorio fue de 0.403°.
3. En la identificación y cuantificación de los componentes del aceite esencial de *Schinus molle* “molle” por cromatografía de gases –espectrofotometría de masas, se encontró como principales componentes: Alfa-Pineno (11.4157%), Campheno (7.3984%), Beta-Pineno (1.3619%), Beta – Mirceno (5.4609%), Alfa-felandreno (19.1723%), d-Limoneno (8.3268%), beta-felandreno (5.3353%), Cariofileno (3.594%).
4. La forma farmacéutica semisólida de aplicación tópica (crema) elaborada a las concentraciones de 1%, 2.5% y 5% usando el aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, está compuesta por parabenos, propilenglicol, lauril sulfato de sodio, cera de abeja, glicerina, agua estéril, y el aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.
5. En el proceso de control de calidad organoléptico, físico-químico y microbiológico de la crema formulada a base de aceite esencial de *Schinus molle* “molle”, se demostró resultados óptimos que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la USP 37.
6. Para la determinación del efecto analgésico de la crema elaborada con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a las concentraciones de 1%, 2.5% y 5% se encontró un porcentaje de máximo efecto posible (MEP) de 52,02%, 68.67%, 85,06% respectivamente a los 30 min y el fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren- cremigel) obtuvo un porcentaje de máximo efecto posible de 95.75%, determinándose que la crema a la concentración del 5% presenta mayor efecto analgésico.

7. Para el efecto antiinflamatorio de la crema elaborada con aceite esencial de *Schinus molle* “molle” a las concentraciones de 1%, 2.5% y 5% se encontró un porcentaje de inhibición de la inflamación de 37%, 42%, 65.64% y 88.96% respectivamente a la cuarta hora y el fármaco patrón diclofenaco 1% (Voltaren- cremigel) obtuvo un porcentaje de inhibición de inflamación de 96.93%, determinándose que la crema a la concentración del 5% presenta mayor efecto antiinflamatorio.

## **SUGERENCIAS**

### **A LAS AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

Promover la creación e implementación de centros de investigación y producción que abarquen estándares de calidad exigidos a nivel internacional para el área de farmacia y bioquímica

### **PARA LOS DOCENTES UNIVERSITARIOS**

Fomentar incentivar la realización de proyectos de investigación en el área de plantas medicinales con el objetivo de descubrir nuevas alternativas terapéuticas, y dar a conocer el conocimiento científico a las comunidades que practican a través de talleres y exposiciones.

### **A LOS INVESTIGADORES**

- Realizar investigaciones sobre el tratamiento analgésico y antiinflamatorio por vía oral de la especie *Schinus molle* “molle”, realizar más estudios preclínicos, como estudios de farmacodinamia y farmacocinética de la crema elaborada con aceite esencial de *Schinus molle* “molle”.
- Realizar estudios de toxicidad del aceite de la especie *Schinus molle* “molle”.
- Se sugiere estudios de biomasa de la especie *Schinus molle* “molle” en las diferentes regiones de la ciudad.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Villar M., Villavicencio O. Uso clínico de las plantas medicinales. Manual de Fitoterapia Lima: Organización Panamericana de Salud; 2001.
2. Delgado A., Minguillon C. Introducción a la Química Terapéutica. Segunda ed.: Editorial Díaz de Santos; 2004.
3. Lopez A., Iturralde F., Sierra M., Ortiz J. [Online]. [citado 16 Ene 2019]. Disponible en: [http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-doc/dolor\\_1.pdf](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/rehabilitacion-doc/dolor_1.pdf).
4. OMS. Estadísticas sanitarias mundiales. 2014.
5. Bannon A., Malmberg A. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-lick and Formalin Test in Rodents. Current protocols in Neuroscience. 2007.
6. Fehrenbacher J, Vasko M, Duarte D. Models of inflammation: Carrageenan-or complete Freund's adjuvant-induced Edema and Hypersensitivity in the rat. HHS Public Access - Curr Protoc Pharmacol. 2012.
7. Universidad de Navarra. Diccionario Médico. [Online]. [citado 02 Feb 2019]. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/analgesia>.
8. Goodman y Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Undécima edición ed.: McGraw - Hill Interamericana; 2006.
9. Castro I. Actualidad de la medicina tradicional herbolaria. Rev. Cubana Plant Med. 2006.
10. Cea R. Fitofarmacos. Dirección de Innovación y Calidad. [Online]. [citado 20 Feb 2019]. Disponible en: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Cea2013.pdf>.
11. Paduch R., Kandefer-Szerszeń M., Trytek M., Fiedurek J. Terpenes: substances useful in human healthcare. Arch. Immunol. 2007; 55.
12. Prieto J. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). ¿Donde estamos y hacia donde nos dirigimos?; 2007.
13. Palacios V. Plantas Medicinales Nativas del Perú. 2nd ed. Lima; 1997.
14. Steider P., Ferreira H., Calil J., Palermo M. Composición química del aceite esencial de *Schinus molle* L. y sus actividades biológicas. Rev Cubana Farm. 2015 Enero - Marzo; 49(01).
15. Cortez A. Identificación de metabolitos secundarios en hojas de *Schinus molle* (molle) procedente del cacerío de Huañimba-Cajabamba. Facultad

- de ciencias de la salud, escuela profesional de Farmacia y Bioquímica. Universidad catolica de los Angeles Chimbote. Trujillo - Perú; 2018.
16. Boletin latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromaticas. Publicacion electronica bimestral registrada en LATINDEX ISSN 0717 7917. BLACPMA. 2005 Mayo; 4.
  17. Ramos-Niembro F. Criterios para la clasificación de las enfermedades reumáticas. In Tratado Hispanoamericano de Reumatología Bogota-Colombia: Nomos S. A.; 2006.
  18. Flores M, Castro A. Analgesicos topicos. Rev Bras Anesthesiol. 2012;; p. 224-255.
  19. Anguiano C. Diccionario de ciencias médicas. 9th ed. Argentina: El Ateneo; 1992.
  20. Uso industrial de plantas aromaticas y aceites esenciales. Facultad de ingenieria agroforestal. Universidad politecnica de Madrid-España; 2012
  21. Barcelo J. Diccionario terminológico de química. 2nd ed.: Alambra.; 1982.
  22. Gelymar. Determinacion de rendimiento en carrageninas- Manula de metodos fisicoquimicos. 01st ed.; 2005.
  23. Viia J. Tecnologia farmaceutica Madrid: Sintesis S.A.; 2001.
  24. The free dictionary. [Online]. [citado 20 Jun 2019]. Disponible en: <https://es.thefreedictionary.com/farmacopea>.
  25. Bustamante P. "Tratado de farmacia galénica" Madrid: Luzan S.A.; 1993.
  26. Le Bars D, Gozariu M, Caddens S. Animal models of nociception. Pharmacol. Rev. 2001.
  27. Taylor A., Oyedeji O., Aremu O., Oyemitan I., Gwebu E., Nkheh-Chungag B. Evaluación del efecto analgesico , antiinflamatorio y sedantes del extracto de diclorometano extraído del *Schinus molle*. Revista Europea de Ciencias Médicas y Farmacológicas. 2016.
  28. Zeng Yuequin M., Recio M., Giner M. Aislamiento de dos triterpenoides y una biflavona con actividad antiinflamatoria de los frutos *Schinus molle*. Planta Medica. 2003.
  29. Martel J. Efecto citoprotector del aceite de molle "*Schinus molle*" en lesiones gastricas inducidas con etanol en ratas. Universidad Nacional "Hermilio Valdizan". Escuela de post grado. Huanuco-Perú; 2017.
  30. Peña R. Elaboracion y evaluacion de la actividad antiinflamatoria de un gel a base de aceite esencial de Senecio Graveolens Wedd (Wiskataya) en animales de experimentacion Cusco; 2016.



31. Bruneton J. Farmacognosia- Fitoquímica plantas medicinales. Segunda ed. España: Acribia S.A.; 2002.
32. Tineo F. "Estudio experimental y modelamiento matemático para el proceso de extracción por lotes por arrastre con vapor de agua del aceite esencial libre del *Schinus molle*" Lima; 2012.
33. Temas de Farmacognosia. Plantas medicinales, productos naturales.. [Online]. [citado 20 Agosto 2019]. Disponible en: <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/lipidos/>.
34. Muñoz R., Ros A. Investigación y ciencia. Peroxidasas Vegetales. [Online]. [citado 23 Agosto 2019]. Disponible en: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/mirador-csmico-55/peroxidasas-vegetales-5273>.
35. Doleski P., Ferreira C, Calil J. Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Schinus molle* L. Revista Cubana de Farmacia. 2015; 1(49).
36. Alba A., Bonilla P., Arroyo J. Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. "molle" en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. Ciencia e Investigación. 2009; 1(12).
37. Castillo S., Pérez C., Martínez D., Guillén F., Serrano M., Valero D. The essential oils timol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage. Food Control. Food Control. 2014;(35).
38. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. Food Chem Toxicol. 2008;(46).
39. Doterra. Aceites esenciales. [Online]. [citado 20 febrero 2019]. Disponible en: <https://sites.google.com/site/aceitesterapeuticosdoterra/home/aceites-esenciales/historia-de-los-aceites-esenciales>.
40. Bandoni A. Los recursos vegetales aromaticos en latinoamerica. 2002.
41. Boletín I. Oficina Sanitaria Panamericana, 108 (5-6): 637-641.
42. Quezada A. El animal como sujeto de experimentación. Aspectos técnicos y eticos. Universidad de Chile Santiago de Chile; 2007.
43. Morales D. Bioética de la investigación preclínica en las ciencias biomédicas. Rev Cubana Estomatol. 2015 octubre; 52(4).
44. Ministerio de Salud del Peru Instituto Nacional de Salud. Guia de manejo y cuidado de animales de laboratorio: raton. 2008.

45. Montoya M., Rondón E., Cardona A. Reglamento del comité institucional de Bioética en Investigación. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco - Vice Rectorado de Investigación. [Online].; 2018. Disponible en:  
<http://transparencia.unsaac.edu.pe/links/disposiciones/documentos/resCU/REGLAMENTO%20DEL%20COMITE%20INSTITUCIONAL%20DE%20BIOETICA%20EN%20INVESTIGACION%20DE%20LA%20UNSAAC.pdf>.
46. Torregrosa S. Mecanismos y vías de dolor. Boletín de la escuela de medicina. 1994; 23(3).
47. Ricard F. Tratamiento osteopático de las algias del raquis torácico España: Editorial médica Panamericana; 2007.
48. García de Lorrenzo A., López J., Sánchez M. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. Medicina Intensiva. 2000; 24(8).
49. Bordes R., Martínez M., García E., Guisado R. El proceso inflamatorio. [Online]. [citado 20 Feb 2019]. Disponible en: <https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/266/1994-5.pdf?sequence=1>.
50. Gallin J. Fundamental Immunology. Raven Press, New York: 721-733. [Online].; 1989.
51. Gallin J, Goldstein I, Snyderman R. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Raven Press, New York. [Online].; 1988.
52. Snyderman R, Pike M. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. Ann. Rev. Immunol. 1984; 257 (2).. [Online].; 1984.
53. Rubin Farber E. Patología "proceso de inflamación". 1st ed. México: Médica Panamericana S.A.; 1990.
54. Pérez A., Cartaya L., Valencia V., Sanjurjo V., Ilisástigui T. Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. Revista Cubana de Estomatología. 1998 Mayo-Agosto; 35(2).
55. Franco A., Matiz E., Calle J., Pinzon R., Ospina L. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de calices de *Phisales Peruviana* L. (Uchuca). Departamento de Farmacia. facultad de Farmacia. Universidad Nacional Bogotá. Revista Biomedica. 2007.
56. Adrian J., Aldecoa V., Alonso M., Baraibar M., Bartoli D. Manual de Analgesia y Sedación España: CEDRO; 2009.
57. Milton O., Howard I., Maibach H., Dahl M. Dermatología. Primera ed. México; 1994.

58. Navarrete G. Histología de la piel. Rev Fac Med UNAM. 2003 Julio-agosto; 46(4).
59. Mazzei E., Rozman C. Semiología y Fisiopatología. 5th ed. Buenos Aires: El Ateneo; 1998.
60. Loomis T. Fundamentos de toxicología España: Editorial Acribia; 1984.
61. Whistler B. Industrias Gums: Polisacaridos y sus derivados. 3rd ed. E.E.U.U.; 2005.
62. Review International Migration. Perfil de Carragenina. IMR International. 1999.
63. Glicksman. Gum Technology in the food industry New York: Ed. Academic; 1969.
64. Organization Food A. Produccion y utilizacion de productos algas comerciales. FAO FISHERIES TECHNICAL PAPER. 1987.
65. Rivera-Ordóñez A. AINES: Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. Rev Mex Anest. 2006.
66. Sugishita E., Amagaya S., Ogihara Y. Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. J Pharmacol Biodyn. 1981; 4(565-575).
67. Mutis J. Curso de aceites esenciales. Química y procesos de producción. Jardín botánico de Bogota.; 2011.
68. Norma Técnica Peruana NTP 319.091:1974. [Online]. [citado 20 Feb 2019]. Disponible en: <https://www.deperu.com/normas-tecnicas/NTP-319-077.html>.
69. Norma Técnica Peruana: NTP 319.079:1974. [Online]. [citado 23 Feb 2019]. Disponible en: <https://www.deperu.com/normas-tecnicas/NTP-ISO-279.html>.
70. Norma Técnica Peruana: NTP-ISO 280:2011. [Online]. [citado 23 Feb 2019]. Disponible en: <https://www.deperu.com/normas-tecnicas/NTP-ISO-280.html>.
71. Norma Técnica Peruana: NTP 319.076:1974. [Online]. [citado 24 Feb 2019]. Disponible en: <https://www.deperu.com/normas-tecnicas/NTP-319-076.html>.
72. NMX-K-081-1976. Determinacion de la solubilidad en etanol de aceites esenciales y productos aromaticos. [Online]. [cited 17 Ene 2019]. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-K-081-1976.PDF>.

73. Narro J. Sistema de elaboración para el desarrollo y la innovación. UNAM. CCH AZPOTZALCO. 2013.
74. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA). Guía de estabilidad de productos cosméticos. Serie Calidad en cosméticos. 2005; 1.
75. Pascuali R., Bregni C. Emulsiones líquida-cristalinas estabilizadas con estearato de trietanolamina y ácido esteárico: influencia del método de preparación en las propiedades y en la formación de gotas secundarias. *Ars Pharm.* 2006; 2(47): p. 219-237.
76. Gaston L., Pasquali R., Pedemonte C. Estudio de estabilidad de emulsiones con estructuras líquido cristalinas y su aplicación farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol. *Colombia Química Farmacia.* 2016 Agosto; 45(1).
77. Perez T. Comportamiento reológico y extensibilidad de una formulación semisólida a partir del extracto acuoso de *Rhizophora mangle* L. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. Sistema de información Científica.* ; 2(26).
78. USP 37. United States Pharmacopeia Convention.
79. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural Barcelona: Omega; 2000.
80. Lopez R., Caso N. Rendimiento y composición química de aceites esenciales de *Eucalyptus archeri* y *Schinus molle* - Valle del Mantaro Huancayo; 2015.
81. Moncada F. Determinación de la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. "molle" de Arequipa y Moquegua contra *klebsiella pneumoniae*, *pseudomona aeruginosa* y *staphylococcus*. Universidad Católica de Santa María. Arequipa; 2013.
82. Ramirez R., Soto R. "Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle*) frente a cepas de *escherichia coli* in vitro". Lima; 2018.
83. Ortuño S. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. I ed. España: Aiyana; 2006.
84. Connors K. Curso de análisis farmacéutico ( Ensayo del medicamento) Barcelona- España: Reverte; 1981.
85. Perez T. Efectividad de los vapores de aceites de tomillo y orégano como agentes antibacterianos. Tesis de Maestría. Universidad de las Américas. Mexico; 2006.
86. Fundación C. Los terpenos España; 2015.

87. Garcia P. Terpenos y Cannabis, THC Terapeutico España; 2013.
88. Florez J., Armijo J. Farmacologia humana. cuarta ed. Barcelona- España: Masson; 2003.
89. Marquez I., Vallas M. Apuntes juridicos : Elaboracion de medicamentos oficinales y magistrales. RD 175/2001. Rev. Farmacia profesional España. 2001 Julio.
90. Foral. Fitoterapia. Formulas alternativas S. A.
91. Fauli T. Tratado de farmacia Galenica. Primera ed. Madrid: Luzan 5; 2000.
92. Malpartida S. "Evaluacion del cumplimiento de los parámetros organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos en cremas y geles elaborados a base de baba de caracol expandidos en casas o centros naturistas de la ciudad de Cusco-2013" UNSAAC Cusco; 2013.
93. Chen X., Levine J. Inhibitor antagonism of PGE2-induced mechanical Sensitization of cutaneous C-Fiber nociceptors in the rat J. Neurophysiol. 1999;(81).
94. Arrau S. Evaluación del efecto analgésico y tóxico del extracto acuoso de corteza de Quillay, Ácido Quillaico y derivados. Universidad de Chile; 2012.
95. Lillini G., Pasquali R., Pedemonte C. Estudio de la estabilidad de emulsiones con estructuras liquido-cristalinas, y su aplicacion farmacéutica mediante el agregado de un principio activo liposoluble: Econazol. Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm. 2015 Agosto; 45(1).
96. Darr A. Tecnología farmacéutica-Emulsiones España.: Editorial Acribia; 1981.
97. Tarno M. Formulación magistral Lima- Perú; 2009.
98. Fernandez M. Formulacion magistral, Control de calidad: Formulas dermatológicas. Farmacia Profesional. 2003 Febrero; 17(2).
99. Mujica V. Formulación De Un Producto Cosmético Con Propiedades Antiarrugas a partir del aceite de semilla de Meroy. .
100. Omonte A. Actividad antioxidante de la crema elaborada a base de los compuestos fenólicos aislados de las flores de Mutisia acuminata R&P "chinchilcoma" Ayacucho-Perú; 2013.
101. Signorellil L., Isla M. Elaboración de una crema para uso tópico a base de Urtica dioica L. Revista de la Facultad de Farmacia. 2005; 2(47).
102. Warner T., Mitchell J. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. J. Faseb. 2004; 18.

103. Stander S., Moormann C., Schumacher M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp. Dermatol.* 2005.
104. Southall M., Li T., Gharibova L. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J. Pharmacol.* 2003;(304).
105. Noguez N., Rubio C. Determinación del coeficiente de partición y del pKa de la 4,4'-diaminodifenilsulfona a partir de datos de solubilidad. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 2009; 1(40).
106. Brzezinska E., Stolarska J. Determination of the Partition and Distribution Coefficients of Biologically Active Compounds by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography, *J. Plan. Chromatograp.* 2005;(18).
107. Neubert R. Ion pair transport across membranes. *Pharm. Res.* 1989; 40(1).
108. Benoist J., Pincede I, Ballantyne K, Plaghki L, Le Bars D. Determinants of a Nociceptive Reaction: An Approach to Psychophysics in the Rat. *Pubmed.* 2008.
109. Takaki I., Bersani L., Vendruscolo L. Efecto antiinflamatorio y antinocicepcion del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* en animales de experimentación. *JOURNAL OF MEDICINAL FOOD.* 2008; 11(4).
110. Pergentino de Sousa D. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. *Molecules.* 2011 Enero.
111. Pinardi G., Sierralta F., Miranda H. Pinardi, G.; Sierralta, F.; Miranda, H. Atropine reverses the antinociceptive of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the tail –flick test of mice. *Pharmacol.Biochem. Behav.* 2003;(74).
112. Sousa O., Silverio M. Antinociceptive and antiinflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. *Facultad de Farmacia Brazil;* 2008.
113. Esteban V., Rodriguez E. Actividad analgésica del extracto y antiinflamatoria de una crema formulada a base del extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de *Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg “Pan de árbol” en ratones Lima-Peru; 2016.
114. Manual de Prácticas para el laboratorio de Química Orgánica I. Facultad de Química. Universidad nacional autonoma de Mexico.. [Online].; 2012 [cited 2019 Febrero 25. Available from: [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/ManualdePracticaspараelLaboratoriodeQuimicaOrganica1\(1311\)2012-2\\_18579.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/ManualdePracticaspараelLaboratoriodeQuimicaOrganica1(1311)2012-2_18579.pdf).

# **ANEXOS**


ANEXO N° 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA Y ANTIINFLAMATORIA DE UNA CREMA ELABORADA A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* “molle” EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

I. Título	II. Formulación del Problema	IV. Objetivos	V. Hipótesis	Variables	VII. Diseño	VIII. Población
<p>“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA Y ANTIINFLAMATORIA DE UNA CREMA ELABORADA A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> “molle” EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION.</p>	<p>¿presentara actividad analgésica y antiinflamatoria la crema a base de aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle” en animales de experimentación?</p>	<p><b>Objetivo General:</b> Evaluar la actividad analgésica y antiinflamatoria de una crema elaborada a base de aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle” en animales de experimentación.  <b>Objetivos Específicos</b>            1: Determinar las características fisicoquímicas del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle”.            2: Identificar los componentes del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle” por cromatografía de gases – espectrofotometría de masas.            3: Desarrollar estudios de pre formulación de una crema con aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle”.            4: Realizar el control organoléptico, físico-químico y microbiológico de la crema a utilizar en el estudio.            5: Determinar la dosis efectiva para el efecto analgésico mediante el método de Hot Plate en ratones albinos de la crema de aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle”.            6: Determinar la dosis efectiva para el efecto antiinflamatorio mediante el método de edema plantar con carragenina en ratones albinos de la crema de aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle”.</p>	<p>La crema elaborada a base de aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle” presenta actividad analgésica y antiinflamatoria en animales de experimentación.</p>	<p><b>Variable independiente:</b>            Concentración de la crema  <b>Variable dependiente:</b>            Efecto analgésico en los animales de experimentación.            Efecto antiinflamatorio en los animales de experimentación  <b>Variables intervinientes</b>            De la planta en estudio            Altitud de recolección            PH del suelo            Temperatura de secado            De los sujetos de experimentación            Edad            Peso</p>	<p>TIPO DE ESTUDIO: El presente trabajo es un estudio de investigación experimental porque se manipulará deliberadamente una variable (independiente) la dosis del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle” con el objeto de analizar el efecto o causa sobre otras (dependiente) el efecto analgésico y antiinflamatorio en los animales de experimentación.            DISEÑO EXPERIMENTAL: El diseño de la investigación es experimental con un diseño cronológico en grupos de experimentación con la crema base de aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle” a diferentes concentraciones con el objeto de analizar efecto analgésico mediante el método de Hot Plate en 4 series cronológicas y la inflamación con carragenina al 1% en una serie cronológica.            El estudio es prospectivo porque permite la observación de los efectos producidos (efecto analgésico y antiinflamatorio) a partir de los factores (aplicación del aceite esencial de <i>Schinus molle</i> “molle”) a los que se les trata de buscar los efectos.</p>	<p>La población de estudio estará compuesta por un total de 50 ratones de laboratorio            Serán utilizados 25 ratones para determinar el efecto analgésico.            Serán utilizados 25 ratones para determinar el efecto antiinflamatorio.</p>



ANEXO N° 2. RESULTADOS DEL ANALISIS DEL ACEITE ESENCIAL POR CG-EM

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA - Fobellón de Control de Calidad  
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERU Contacto: 973868855

---

**RESULTADOS**

Cusco, 09 de Abril del 2019

Solicitantes : Gimena Huarhuachi Diaz  
Tipo de Analisis : Determinación de componentes volátiles por Cromatografía de Gases  
Tipo de Muestras : Frasco Azul con Aceite Esencial Denominado Molle  
Cantidad de Muestra : 1, aproximadamente 5 mL  
Almacenamiento : 4 °C.

**Condiciones de Análisis para el Aceite Esencial**

**Cromatógrafo** : Agilent 6890N  
**Detector Espectrometro de Masas** : Agilent 5975B.  
**Línea de transferencia** : 280°C  
**Modo de Ionización** : Impacto Electrónico 70 electron voltios  
**Modo escaneo de masas** : 40-500 uma

Inyector Automático Agilent: 7683B  
Columna: Agilent HP-5MS 5% Fenil Metil Siloxano.



**Condiciones del cromatografo.**  
Temperatura del Horno inicial 60°C  
Rampa:  
Relacion °C/min temp °C Final time  
Inic 0 60 0.00  
1 5.00 240 36  
Post Run time: 280 4.00 min

Tiempo de Análisis: 36.00 min

**Puerto de Inyección**  
Modo : Split  
Relación de Split : 50:1  
Temp. Inicial : 200 °C  
Tipo de Gas : Helio  
Flujo : 1 mL/min  
Volumen de Inyección : 0.1uL  
Muestra inyecta : puro

Nota: El resultado obtenido en la determinación del Aceite esencial, expresa el contenido relativo en porcentaje de los compuestos volátiles que están presente. La metodología desarrollada es de acuerdo con la literatura descrita (con modificaciones)

- Pino Alea. J. A. I Curso Internacional Análisis de Aceites Esenciales Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco 2014.
- Lynam, K. 2014 Potential Allergens in Aromatherapy Oils by GC/MS Using an Agilent J&W DB-XLB Capillary Column Agilent Technologies, Inc. 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808 USA 5990-5293EN

  
Quim. Jorge Choquansaira Pari  
Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
Espectrometría - UNSAAC.  
CGP - 914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA - Pabellón de Control de Calidad  
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto: 973868855

RESULTADOS

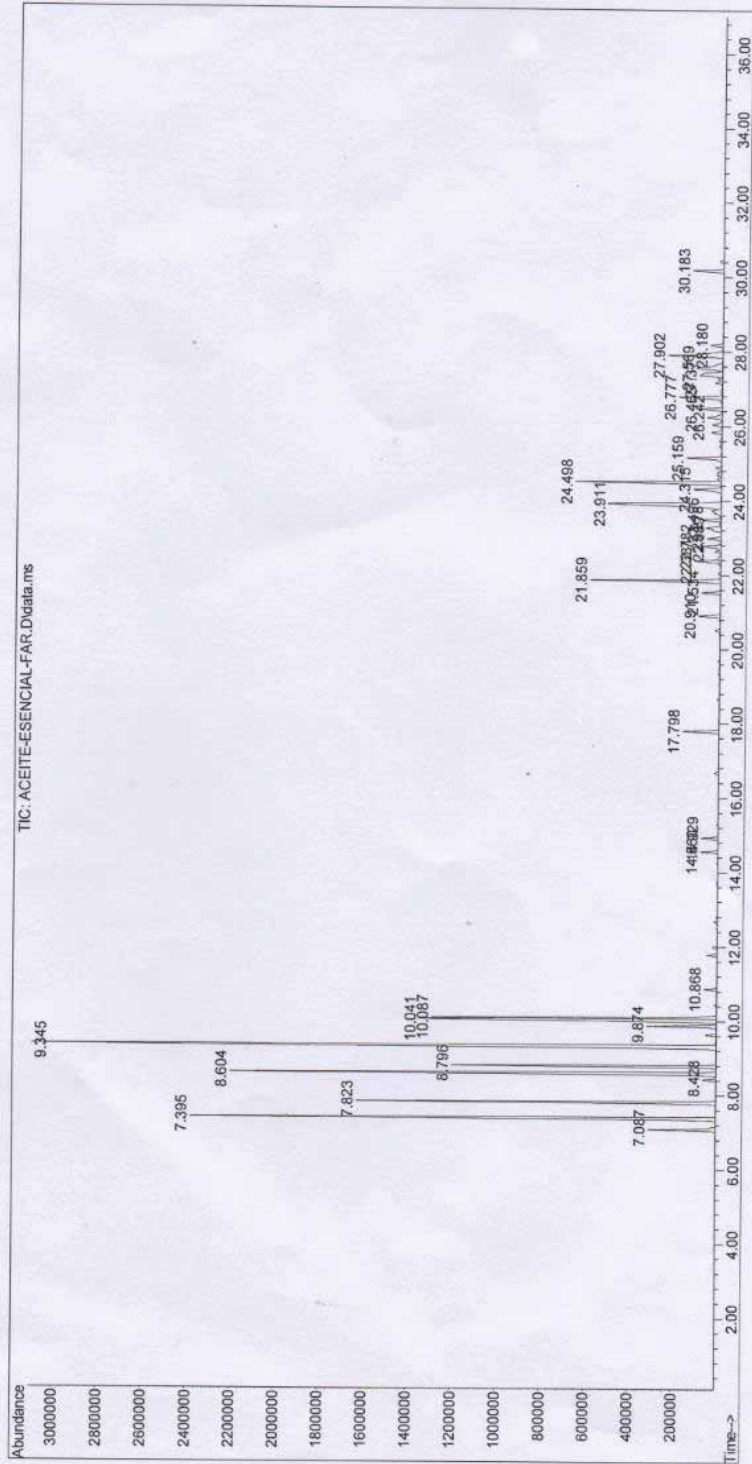
Pico	Tiempo de Retencion	Compuesto Libreria Nist 11	CAS	Qual	Contenido Relativo %
1	7.0858	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,7,7-trimethyl-	000508-32-7	96	1.4322
2	7.3945	(1R)-2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene	007785-70-8	96	11.4157
3	7.8216	Camphene Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene-1-(1-methylethyl)-	000079-92-5	98	7.3984
4	8.4263		003387-41-5	91	0.3055
5	8.6039	.beta.-Pinene	000127-91-3	97	11.3619
6	8.7942	.beta.-Myrcene	000123-35-3	95	5.4609
7	9.3439	.alpha.-Phellandrene	000099-83-2	90	19.1723
8	9.8725	p-Cymene	000099-87-6	97	1.6095
9	10.0417	D-Limonene	005989-27-5	97	8.3268
10	10.0882	.beta.-Phellandrene	000555-10-2	91	5.3353
11	10.8663	.gamma.-Terpinene	000099-85-4	97	0.2773
12	14.5621	Terpinen-4-ol	000562-74-3	97	0.4084
13	14.93	.alpha.-Terpineol	000098-55-5	86	0.3929
14	17.797	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate, (1S-endo)- Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)]-	005655-61-8	99	0.8997
15	20.9093	1H-Cycloprop[e]azulene, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-octahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.alpha.,4a.beta.,7b.alpha.)]-	000515-13-9	93	0.5537
16	21.5351	Caryophyllene	000489-40-7	99	0.5068
17	21.8607	Aromadendrene	000087-44-5	99	3.5943
18	22.3808	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-, Z,Z,Z-	000489-39-4	99	0.6313
19	22.7826	Alloaromadendrene	1000062-61-9	97	0.7751
20	22.9898	.gamma.-Muuroleone	025246-27-9	99	0.3722
21	23.2773	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene	030021-74-0	99	0.6038
22	23.4972	Bicyclogermacrene	054274-73-6	95	0.4743
23	23.9116	Naphthalene, 1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-	067650-90-2	91	4.6992
24	24.3176	Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-	000483-75-0	98	0.8957
25	24.4994	Cyclohexanemethanol, 4-ethenyl-.alpha.,.alpha.,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,3.alpha.,4.beta.)]-	000483-76-1	99	3.9534
26	25.1591	Globulol	000639-99-6	95	1.0612
27	26.2416	1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-	051371-47-2	92	0.5004
28	26.4657	3,5-Hexadien-2-ol, 2-methyl-	000552-02-3	98	0.6286
29	26.7786	.gama.-eudesmol	000926-38-5	58	1.2578
30	27.3706	.tau.-Muurolol	1000374-18-5	99	1.1319
31	27.5694	.alpha.-Cadinol	019912-62-0	96	1.266
32	27.9034	1-Formyl-2,2,6-trimethyl-3-cis-(3-methylbut-2-enyl)-5-cyclohexene	000481-34-5	96	2.0547
33	28.1783	Adipic acid, di(3-fluorophenyl) ester	1000144-10-1	41	0.3544
34	30.1827		1000324-81-2	35	0.8884




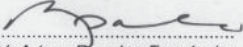
Guim, Jorge Choquehaira Pari  
Analista del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría - UNSAAC.  
CGP - 914



File :D:\DATA MSD\ACEITES ESENCIALES\2019\Aceite-Esencial FarVACEI  
...  
TE-ESENCIAL-FAR.D  
Operator : JCHP  
Instrument : UNSSAC  
Acquired : 5 Apr 2019 12:35 using AcqMethod ACEITE ESENCIAL.19.M  
Sample Name: Aceite-Esencial-Farmacia  
Misc Info :



ANEXO N° 3. CERTIFICADO SANITARIO DE LOS RATONES PROCEDENTES DEL INS  
CEPA Balb/c

		<b>INSTITUTO NACIONAL DE SALUD</b> <b>CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS</b> <b>COORDINACIÓN DE BIOTERIO</b>	
<b>CERTIFICADO SANITARIO N°</b>		<b>060- 2019</b>	
Producto	: Ratón albino	Lote N°	: M-13-2019
Especie	: <u>Mus musculus</u>	Cantidad	: 25
Cepa	: Balb/c/CNPB	Edad	: 21 días
Peso	: 11 a 14 g.	Sexo	: macho
Guía de remisión	: 0037154	Destino	: Huarhuachi Diaz, Jimena
Chorrillos	: 28 - 03 - 2019		
<p>El Médico Veterinario, que suscribe, <b>Arturo Rosales Fernández</b>. Coordinador de Bioterio Certifica, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *</p>			
<p>*Referencia: PR.T-CNPB-153, Procedimiento para el ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para Animales de Experimentación.</p>			
<p>Chorrillos, 28 de marzo del 2019 (Fecha de emisión del certificado)</p>			
<p><b>NOTA:</b> El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.</p>		 M.V. Arturo Rosales Fernández. C.M.V.P. 1586	

ANEXO N° 4. RECONOCIMIENTO DE LA PLANTA POR EL HERBARIO VARGAS (CUZ)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DELCUSCO

• APARTADO POSTAL  
N° 921 - Cuzco - Perú

• FAX: 238126 - 238173 - 222512

• RECTORADO  
Calle Tigre N° 127  
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181

• CIUDAD UNIVERSITARIA

Av. de la Cultura N° 733  
Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 -  
232375 - 232226

• LOCAL CENTRAL

Plaza de Armas s/n  
Teléfonos: 227371 - 225721 - 224018

• MUSEO E INSTITUTO DE ARQUEOLOGÍA  
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380

• CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA  
San Jerónimo s/n Cuzco - Teléfono: 271409 - 271457

• COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"  
Av. de la Cultura N° 721  
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS (CUZ)


CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 0 13-2019-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) -Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco (UNSAAC), deja constancia que: las señoritas **Gimena Huarhuachi Díaz** con código de matrícula N° 124249 y **Sulma Lucía Cornelia Farfan Hanco** con código de matrícula N° 124248 Bachilleres de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco, han presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ una muestra vegetal herborizada para su determinación taxonómica (expediente N°002943), para el proyecto de tesis intitulado "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA Y ANTINFLAMATORIA DE UNA CREMA ELABORADA A BASE DE ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN". La que al ser diagnosticada por el M. Sc. Alfredo Tupayachi Herrera, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del Herbario, concuerdan con la clasificación del grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIES
1	Anacardiaceae	<i>Schinus molle</i> L.

Se le expide la presente certificación a petición formal de la interesada para los fines que vieran por conveniente.

Cuzco, 09 de Julio del 2019

  
Bлга. María Luisa Ochoa Cámara  
Directora del Herbario Vargas (CUZ)



*ANEXO N° 5. FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DEL CONTROL DE CALIDAD DE LA CREMA FORMULADA*

PARAMETROS		PRE-FORMULACION 01	PRE-FORMULACION 02	PRE-FORMULACION 03
Organolépticos	Aspecto			
	Color			
	Olor			
	Sensación al tacto			
Fisicoquímicos	PH			
	Densidad			
	Estabilidad por centrifugación			
	Extensibilidad			
Microbiológicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pseudomona Aureginosa</li> </ul>			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Staphylococcus aureus</li> </ul>			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coliformes fecales (E. coli)</li> </ul>			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mesófilos Aerobios</li> </ul>			
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hongos y levaduras</li> </ul>			

ANEXO N° 6. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DEL ACEITE ESENCIAL

PARAMETROS		RESULTADOS
Densidad por el método picnométrico		
Índice de refracción		
Poder rotatorio		
Pruebas de solubilidad en Etanol a diferentes concentraciones	Etanol al 40%	
	Etanol al 55%	
	Etanol al 70%	
	Etanol al 85%	
	Etanol al 96%	
Solubilidad en solventes orgánicos	Agua destilada	
	Éter de petróleo	
	Metanol	
	Eter etílico	
	Hexano	
	Éter de petróleo	
	Benceno	

ANEXO N° 7. FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LA ANALGESIA

Fecha:.....

Sexo: Macho ( ) Hembra ( ) Peso: ..... en g. Aplicación de *Schinus molle*: SI ( ) NO ( )

GRUPOS DE EXPERIMENTACION	LATENCIA (tiempo)						
	N (ratón)	Promedio (Latencia Basal)	Tiempo de cut off:	Primer estimulo 15 min	Segundo estimulo 30 min	Tercer estimulo 45min	Cuarto estimulo 60 min
Aceite esencial 1%	R1						
	R2						
	R3						
	R4						
	R5						
Aceite esencial 2.5 %	R1						
	R2						
	R3						
	R4						
	R5						
Aceite esencial 5 %	R1						
	R2						
	R3						
	R4						
	R5						
Placebo	R1						
	R2						
	R3						
	R4						
	R5						
Patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	R1						
	R2						
	R3						
	R4						
	R5						



**ANEXO N° 8. FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO**

GRUPOS DE EXPERIMENTACION	N (RATON)	Hora de aplicación de la carragenina al 1%	Medición del edema plantar después de la aplicación de la crema (mm)			
			1h	...2h	...3h	...4h
Aceite esencial 1%	R1					
	R2					
	R3					
	R4					
	R5					
Aceite esencial 2.5 %	R1					
	R2					
	R3					
	R4					
	R5					
Aceite esencial 5 %	R1					
	R2					
	R3					
	R4					
	R5					
Placebo	R1					
	R2					
	R3					
	R4					
	R5					
Patrón diclofenaco 1% (Voltaren-cremigel)	R1					
	R2					
	R3					
	R4					
	R5					

## ANEXO N° 9. DESTILACIÓN DEL ACEITE DE MOLLE

El aceite de molle se extraerá de las pepitas ya que éstas contienen el mayor porcentaje de aceite (5%), mientras que las hojas proporcionan solamente un 2%.

### Proceso de Destilación:

Manual De Prácticas Para El Laboratorio De Química Orgánica I

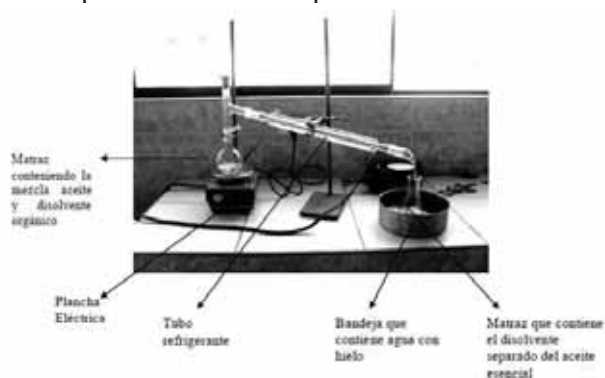
- **Destilación simple:**

La separación de líquidos de punto de ebullición por debajo de los 150 °C bajo condiciones normales (1 atmósfera de presión).<sup>114</sup>

1. Para esta parte de la práctica utilizar 25 mL de la mezcla problema la cual se adicionará al mismo matraz bola de 125 mL sin necesidad de lavarlo.<sup>114</sup>
2. Vuelva a realizar el montado del equipo sin colocar la columna Vigreux, y podrá calentar con la parrilla su matraz una vez colocado todo el equipo y su muestra problema.<sup>114</sup>
3. Anote las variaciones de temperatura por cada mililitro de destilado.<sup>114</sup>

114

4. Dicho procedimiento se puede observar en la siguiente figura:





## HHS Public Access

Author manuscript

*Curr Protoc Pharmacol.* Author manuscript; available in PMC 2015 December 18.

Published in final edited form as:

*Curr Protoc Pharmacol.* 2012 March ; 0 5: Unit5.4. doi:10.1002/0471141755.ph0504s56.

### Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat

Jill C. Fehrenbacher<sup>^</sup>, Michael R. Vasko<sup>^</sup>, and Djane B. Duarte<sup>^</sup>

<sup>^</sup>Department of Pharmacology and Toxicology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202

#### Abstract

Animal models of inflammation are used to assess the production of inflammatory mediators at sites of inflammation, the anti-inflammatory properties of agents such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and the efficacy of putative analgesic compounds to reverse cutaneous hypersensitivity. This protocol details methods to elicit and measure carrageenan- and complete Freund's adjuvant-induced cutaneous inflammation. Due to possible differences between the dorsal root sensory system and the trigeminal sensory system, injections of either the footpad or vibrissal pad are described. In this manner, cutaneous inflammation can be assessed in tissue innervated by the lumbar dorsal root ganglion neurons (footpad) and by the trigeminal ganglion neurons (vibrissal pad).

#### Keywords

inflammation; carrageenan; Complete Freund's Adjuvant; edema; nociception

#### BASIC PROTOCOL

##### Introduction

A solution of carrageenan in saline injected subcutaneously in rats induces an acute swelling that becomes maximal 3–5 hours after the injection and subsides by 24 hours (Winter *et al.*, 1962; Otterness and Moore, 1988), whereas a subcutaneous injection of complete Freund's adjuvant in saline induces a more prolonged swelling that becomes maximal at 24 hrs and persists for at least 7 days (Iadarola *et al.*, 1988; Stein *et al.*, 1988). The inflammation produced in these models can be used to assess the production of inflammatory mediators at sites of inflammation, the anti-inflammatory properties of agents such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and the efficacy of putative analgesic compounds to reverse cutaneous hypersensitivity. This protocol details methods to elicit and measure carrageenan- and complete Freund's adjuvant-induced inflammation in the footpad or vibrissal pad, which can manifest as edema and hypersensitivity.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Due to possible differences between the dorsal root sensory system and the trigeminal sensory system (Bereiter *et al.*, 2009), cutaneous injections of either the footpad or vibrissal pad are described. In this manner, cutaneous inflammation can be assessed in tissue innervated by the lumbar dorsal root ganglion neurons (footpad) and by the trigeminal ganglion neurons (vibrissal pad). This protocol focuses on the induction of inflammation in rats, however it can easily be adapted for mice >20 g by using smaller injection volumes (i.e., 50  $\mu$ l for vibrissal pad and 25–50  $\mu$ l for the footpad, Cunha *et al.*, 2004; Schreiber *et al.*, 2008; Poh *et al.*, 2009) and a 3 mm biopsy punch.

NOTE: All protocols using live animals must first be reviewed and approved by an Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or must conform to governmental regulations regarding the care and use of laboratory animals.

#### Materials list

Male or female rats weighing >100 g upon arrival  
0.5–2.0% (w/v) carrageenan solution (Type IV Lambda, Sigma)  
Complete Freund's adjuvant (1 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis*, heat killed and dried; Sigma)  
0.9% (w/v) saline, sterile  
Inhalational anesthesia and/or animal restrainer  
Scales, accurate to 0.1 and 0.0001 g  
Betadine  
Ethanol (70%, v/v)  
23-G, ½ -in needle  
3-ml glass syringe  
27-G, ½ -in needle  
1-ml syringes  
6mm biopsy punch

#### Induction of edema

1 Allow animals to acclimate for 1 week in solid-bottom cages. It is preferable to use wood shavings in the bottom of the cages because they provide a softer surface for the irritated footpads than pellets of compressed grain or paper products. Animals should be acclimated under standard lighting and temperature conditions with food and water *ad libitum* to eliminate the effects of stress. Weigh the rats using a scale accurate to 0.1 g.

2 Prepare syringes:

Footpad injections:

**Carrageenan:** for each animal, load a sterile 1cc syringe with a 27-G, ½-in needle attached with 100 µl of the carrageenan solution.

**CFA:** for each animal, load a sterile 1cc syringe (needle unattached) with ~250 µl of CFA emulsion. Wipe the tip of the syringe and attach a 27-G, ½-in needle. Discard the excess CFA through the needle until only 100 µl remains in the syringe.

Vibrissal pad injections:

**Carrageenan:** for each animal, load a sterile 1cc syringe with a 27-G, -in needle attached with 100 µl of carrageenan.

**CFA:** for each animal, load a sterile 1cc syringe (needle unattached) with ~250 µl of CFA emulsion. Wipe the tip of the syringe and attach a 27-G, ½-in needle. Discard the excess CFA through the needle until only 100 µl remains in the syringe.

**3** Injection of the footpad:

Place the rat in a temporary restraint or place the rat in a clear plastic box with inhalational anesthesia until the rat is unconscious, being careful not to kill the animal. Typically, a concentration of 5% isoflurane (v/v) is sufficient to induce anesthesia. Once animals have lost their righting reflex, they will remain anesthetized for ~15–20 seconds, which is adequate time to clean and inject the paw. Clean the plantar surface on the footpad with betadine and 70% ethanol. Insert the needle, bevel up, into the metatarsal region of the hindpaw (just proximal to the distal calluses) almost parallel to the footpad (Figure 1A). Move the needle 3–4 mm proximally towards the tarsal region and deliver the solution (100 µl carrageenan, CFA, or saline). Place your thumb lightly on the foot pad while withdrawing the needle and maintain pressure for 10 seconds. Return the rat to its cage after injection. Repeat the injection for each animal. Figure 2 illustrates the degree of inflammation in the foot pad 24 hours after the injection of saline or CFA with paw thickness measured using a micrometer.

**4** Injection of the vibrissal pad:

Place the rat in a clear plastic box with inhalational anesthesia until the rat is unconscious, being careful not to kill the animal. Clean the vibrissal pad with betadine and 70% ethanol. Insert the needle, bevel facing away from the rat just posterior to the nose in the 2<sup>nd</sup> row of vibrissae. Move the needle ~3 mm towards the eye and deliver the solution (100 µl carrageenan, CFA, or saline). Place your thumb lightly on the vibrissal pad while withdrawing the needle and maintain pressure for 10 seconds. Return the rat to its cage after injection. Repeat the injection for each animal.

**Measurement of edema**—The mass of a punch tissue biopsy will be utilized to determine the degree of edema within the footpad or vibrissal pad. Sacrifice the rat at the desired time following saline, carrageenan, or CFA-injection.

- 5 For the footpad, use a 6mm biopsy punch to remove a section of tissue. Use the calluses as anatomical markers and punch between them all of the way to the tendons to achieve consistency between animals (Figure 1B). Weigh the tissue on a scale accurate to 0.0001 g and calculate the difference between the saline- and irritant-injected punches.
- 6 For the vibrissal pad, make a midline incision from between the ears to the nose. Dissect away the skin so that the inside of the vibrissal pad is accessible. Use a 6mm biopsy punch to remove a section of the vibrissal pad from the inside of the skin outwards. Use the vibrissae as anatomical markers and make a punch centered on the third row of vibrissae to achieve consistency between animals. Weigh the tissue on a scale accurate to 0.0001 g and calculate the difference in mass between the saline- and irritant-injected punches.

## REAGENTS AND SOLUTIONS

### **Carrageenan:** 0.5%–2.0% (w/v) carrageenan solution

Pour 500 ml of sterile 0.9% saline into a 1-liter beaker and add a stir bar. Slowly add 2.5 g (0.5%) – 10.0 g (2.0%) carrageenan powder (Type IV Lambda, Sigma) to the beaker. Heat the solution to 90°C with stirring, but do not allow the solution to boil. Heating the mixture helps to dissolve the carrageenan; it should take less than an hour to dissolve all of the powder. Pour the solution into a clean 1-liter glass bottle equipped with a cap and sterilize by autoclaving. Cool the solution to room temperature and aliquot into sterile, 100-ml capped bottles. This solution is stable for at least a week when stored at 4°C following preparation.

### **Complete Freund's adjuvant:** 0.5 mg/ml mycobacterium emulsion

Vortex the bottle of CFA (Sigma). This step is very important because it eliminates the settling of the *Mycobacteria* during storage. Add 0.5 ml of CFA to 0.5 ml of sterile 0.9% saline. Using a 3cc glass syringe with a 23-G, ½-in needle attached, mix the solution approximately eight times to create a homogeneous emulsion by drawing the solution in and out of the syringe. This solution should be prepared fresh each time injections will be made.

## COMMENTARY

### **Background Information**

The subcutaneous injection of either carrageenan or complete Freund's adjuvant produces local inflammation, designated by the 5 cardinal signs: hypersensitivity, redness, swelling, heat, and loss of function (Winter *et al.*, 1962; Stein *et al.*, 1988). The models described in this protocol use carrageenan as an irritant to induce a transient inflammation or complete Freund's adjuvant to induce a more persistent inflammation. Edema (swelling), hypersensitivity to a noxious stimulus (hyperalgesia), or sensitivity to a nonnoxious stimulus (allodynia) can be used to assess inflammation in an animal model, thus providing multiple methods to monitor inflammatory responses and the reversal or prevention of these responses with anti-inflammatory compounds, such as NSAIDs. Various methods have been published to monitor edema; some measure the size of the paw via volume displacement

## **MODELOS DE INFLAMACIÓN: EDEMA INDUCIDO POR CARRAGENINA O ADYUVANTE DE FREUND E HIPERSENSIBILIDAD INDUCIDA EN LA RATAS<sup>6</sup>**

### **Resumen**

Se utilizan modelos de inflamación en animales para evaluar la producción de mediadores inflamatorios en los sitios de inflamación, las propiedades antiinflamatorias de agentes como los fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINEs) y la eficacia de los compuestos analgésicos putativos para revertir la hipersensibilidad cutánea. Este protocolo detalla los métodos para obtener y medir la carragenina y completar la inflamación cutánea inducida por el adyuvante de Freund. Debido a las posibles diferencias entre el sistema sensorial de la raíz dorsal y el sistema sensorial del trigémino, se describen las inyecciones de la almohadilla del pie o de la almohadilla vibratoria. De esta manera, la inflamación cutánea puede ser evaluada en el tejido inervado por las neuronas ganglionares de la raíz dorsal lumbar (footpad) y por las neuronas ganglionares del trigémino (vibrissal pad).

### **Introducción**

Una solución de carragenina en solución salina inyectada subcutáneamente en ratas induce una hinchazón aguda que se vuelve máxima de 3 a 5 horas después de la inyección y disminuye en 24 horas (Winter et al., 1962; Otterness y Moore, 1988), mientras que una inyección subcutánea de adyuvante completo de Freund en solución salina induce una hinchazón más prolongada que se vuelve máxima a las 24 horas y persiste durante al menos 7 días (Iadarola et al., 1988; Stein et al., 1988). La inflamación producida en estos modelos puede utilizarse para evaluar la producción de mediadores inflamatorios en los sitios de inflamación, las propiedades antiinflamatorias de agentes como los fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINEs) y la eficacia de los compuestos analgésicos putativos para revertir la hipersensibilidad cutánea. Este protocolo detalla los métodos para obtener y medir la inflamación inducida por carragenina y completar la inflamación inducida por el adyuvante de Freund en la almohadilla del pie o la almohadilla vibratoria, que puede manifestarse como edema e hipersensibilidad.

Debido a las posibles diferencias entre el sistema sensorial de la raíz dorsal y el sistema sensorial del trigémino (Bereiter et al., 2009), se describen las inyecciones cutáneas de la almohadilla del pie o de la almohadilla vibratoria. De esta manera, la inflamación cutánea puede ser evaluada en el tejido inervado por las neuronas ganglionares de la raíz dorsal lumbar (footpad) y por las neuronas ganglionares del trigémino (vibrissal pad). Este protocolo se centra en la inducción de la inflamación en ratas, sin embargo, puede adaptarse fácilmente para ratones de más de 20 g utilizando volúmenes de inyección más pequeños (por ejemplo, 50 µl para la almohadilla vibratoria y 25-50 µl para la almohadilla de pie, Cunha et al., 2004; Schreiber et al., 2008; Poh et al., 2009) y un punzón para biopsia de 3 mm.

## Materiales

- Ratas macho o hembra de peso superior a 100 g a su llegada
- 0.5-2.0% (p/v) solución de carragenina (Lambda Tipo IV, Sigma)
- 0,9% (p/v) solución salina, estéril
- Anestesia por inhalación y/o retenedor de animales
- Betadine
- Etanol (70%, v/v)
- 23-G, ½ -en aguja
- Jeringa de vidrio de 3 ml
- 27-G, ½ -en aguja
- Jeringas de 1 ml
- Perforador para biopsia de 6 mm

## Inducción de edema

1. Permita que los animales se aclimaten durante 1 semana en jaulas de fondo sólido. Es preferible utilizar virutas de madera en el fondo de las jaulas porque proporcionan una superficie más suave para las almohadillas irritadas que los pellets de granos comprimidos o productos de papel. Los animales deben ser aclimatados bajo condiciones estándar de iluminación y temperatura con alimentos y agua a voluntad para eliminar los efectos del estrés. Pesar las ratas con una precisión de 0,1 g.
2. Preparar jeringas:
  - Inyecciones en el pie: Carragenina: para cada animal, cargue una jeringa estéril de 1cc con una aguja 27-G, ½-in unida con 100 µl de la solución de carragenina.

CFA: para cada animal, cargue una jeringa estéril de 1cc (sin aguja) con ~250 µl de emulsión de CFA. Limpie la punta de la jeringa y coloque una aguja 27-G, ½-in. Deseche el exceso de CFA a través de la aguja hasta que sólo queden 100 µl en la jeringa.

- Inyecciones de almohadillas vibratorias:

Carragenina: para cada animal, cargue una jeringa estéril de 1cc con una aguja de 27-G, -en adjunta con 100 µl de carragenina.

CFA: para cada animal, cargue una jeringa estéril de 1cc (sin aguja) con ~250 µl de emulsión de CFA. Limpie la punta de la jeringa y coloque una aguja 27-G, ½-in. Deseche el exceso de CFA a través de la aguja hasta que sólo queden 100 µl en la jeringa.

3. Inyección de la plantilla:

Coloque a la rata en una restricción temporal o coloque a la rata en una caja de plástico transparente con anestesia por inhalación hasta que la rata esté inconsciente, teniendo cuidado de no matar al animal. Típicamente, una concentración de 5% de isoflurano (v/v) es suficiente para inducir la anestesia.



Una vez que los animales han perdido su reflejo de derecha, permanecerán anestesiados durante ~15-20 segundos, lo que es tiempo suficiente para limpiar e inyectar la pata. Limpiar la superficie plantar de la plataforma con betadina y etanol al 70%. Inserte la aguja, biselada hacia arriba, en la región metatarsiana del pavo trasero (justo proximal a las callosidades distales) casi paralela a la almohadilla del pie (Figura 1A). Mueva la aguja 3-4 mm hacia la región tarsiana y administre la solución (100  $\mu$ l carragenina, CFA o solución salina). Coloque el pulgar ligeramente sobre la almohadilla del pie mientras retira la aguja y mantenga la presión durante 10 segundos. Regrese la rata a su jaula después de la inyección. Repita la inyección para cada animal

#### 4. Inyección de la almohadilla vibratoria:

Coloque la rata en una caja de plástico transparente con anestesia por inhalación hasta que la rata esté inconsciente, teniendo cuidado de no matar al animal. Limpiar la almohadilla vibratoria con betadina y etanol al 70%. Inserte la aguja, con el bisel hacia afuera de la rata, justo detrás de la nariz, en la segunda fila de vibrisas. Mueva la aguja ~3 mm hacia el ojo y administre la solución (100  $\mu$ l carrageenan, CFA, o solución salina). Coloque el pulgar ligeramente sobre la almohadilla vibratoria mientras retira la aguja y mantenga la presión durante 10 segundos. Regrese la rata a su jaula después de la inyección. Repita la inyección para cada animal.

Medición del edema: se utilizará la masa de una biopsia de tejido en sacabocados para determinar el grado de edema dentro de la almohadilla para el pie o la almohadilla vibratoria. Sacrifique la rata en el momento deseado después de la inyección de suero salino, carragenina.

5. Para la almohadilla del pie, utilice un punzón de biopsia de 6 mm para extraer una sección de tejido. Utilice las callosidades como marcadores anatómicos y perforo entre ellas hasta los tendones para lograr la consistencia entre los animales (Figura 1B). Pesar el tejido en una escala con una precisión de 0,0001 g y calcular la diferencia entre los punzones inyectados con solución salina e irritantes.
6. Para la almohadilla vibratoria, haga una incisión en la línea media desde entre las orejas hasta la nariz. Diseccione la piel para que el interior de la almohadilla vibratoria sea accesible. Utilice un punzón de biopsia de 6 mm para extraer una sección de la almohadilla vibratoria desde el interior de la piel hacia el exterior. Utilice las vibrisas como marcadores anatómicos y haga un punzón centrado en la tercera fila de vibrisas para lograr la consistencia entre los animales. Pesar el tejido en una escala con una precisión de 0,0001 g y calcular la diferencia de masa entre los punzones de inyección salina e irritante.

## REACTIVOS Y SOLUCIONES

Carragenina: 0.5%-2.0% (p/v) solución de carragenina

Vierta 500 ml de solución salina estéril al 0,9% en un vaso de 1 litro y añada una barra de agitación. Añada lentamente 2,5 g (0,5%) - 10,0 g (2,0%) de polvo de carragenina (Tipo IV Lambda, Sigma) al vaso. Calentar la solución a 90°C con un agitador, pero no dejar que la solución hierva, ya que el calentamiento de la mezcla ayuda a disolver la carragenina, que debe tardar menos de una hora en disolver todo el polvo. Vierta la solución en una botella de vidrio limpia de 1 litro equipada con una tapa y esterilícela en autoclave. Enfriar la solución a temperatura ambiente y alícuota en frascos estériles con tapón de 100 ml. Esta solución es estable durante al menos una semana cuando se almacena a 4°C después de la preparación.

Completa el adyuvante de Freund: Emulsión de micobacterias de 0,5 mg/ml

Vortexar la botella de CFA (Sigma). Este paso es muy importante porque elimina el asentamiento de las micobacterias durante el almacenamiento. Añadir 0,5 ml de AGL a 0,5 ml de solución salina estéril al 0,9%. Usando una jeringa de vidrio de 3cc con una aguja de 23-G, 3/4-in, mezcle la solución aproximadamente ocho veces para crear una emulsión homogénea aspirando la solución dentro y fuera de la jeringa. Esta solución debe prepararse de nuevo cada vez que se apliquen las inyecciones.

## **COMENTARIO**

La inyección subcutánea de carragenina o del adyuvante completo de Freund produce inflamación local, designada por los 5 signos cardinales: hipersensibilidad, enrojecimiento, hinchazón, calor y pérdida de función (Winter et al., 1962; Stein et al., 1988). Los modelos descritos en este protocolo utilizan carragenina como irritante para inducir una inflamación transitoria o como coadyuvante completo de Freund para inducir una inflamación más persistente. El edema (hinchazón), la hipersensibilidad a un estímulo nocivo (hiperalgesia) o la sensibilidad a un estímulo no nocivo (alodinia) pueden utilizarse para evaluar la inflamación en un modelo animal, proporcionando así múltiples métodos para supervisar las respuestas inflamatorias y la inversión o prevención de estas respuestas con compuestos antiinflamatorios, como los AINEs. Se han publicado varios métodos para monitorear el edema; algunos miden el tamaño de la pata a través del desplazamiento del volumen.

## Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents

UNIT 8.9

Experimental models of pain sensitivity (nociception) include tests of response thresholds to high-intensity stimuli (acute pain tests) and of changes in spontaneous or evoked behavioral responses in animals with peripheral injury or inflammation (persistent pain models). Acute thermal pain is modeled by the hot-plate and tail-flick tests. Persistent pain produced by peripheral tissue injury and inflammation can be modeled by the formalin test. In this test, tissue injury is produced by an injection of a dilute formalin solution into the paw, which evokes a spontaneous behavior, characterized by paw licking and flinching, that persists for ~1 hr. In addition to these pain tests, models exist to study changes in thermal and mechanical thresholds that occur after injury to a peripheral nerve (neuropathic pain). There is evidence that the neurotransmitters and neuromodulators mediating pain responses in each of these models may differ. As a result, different pharmacological agents may be effective in attenuating pain in the different models. A basic understanding of the mechanisms involved in pain transmission is important in order to choose the model most appropriate for examining the analgesic properties of specific agents or classes of compounds. This unit presents protocols for testing acute pain using both the hot-plate test (see Basic Protocol 1) and the tail-flick test (see Basic Protocol 2), and for testing a persistent model of pain using the formalin test (see Basic Protocol 3). Each protocol describes the preparation of animals (mice or rats) for the tests, administration of a compound being tested for its analgesic properties, and data collection.

Researchers should be aware that some members of animal care and use committees may be reluctant to approve "pain" protocols. Clear, concise descriptions of the procedures are necessary to inform those not familiar with these techniques that the stimuli used are relatively short lasting. Proper experimental design, which includes the application of cutoff times to limit the exposure to noxious stimuli, will minimize the amount of pain and distress experienced by experimental animals.

**NOTE:** All protocols using live animals must first be reviewed and approved by an Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) or must conform to governmental regulations regarding the care and use of laboratory animals.

### MEASUREMENT OF ACUTE PAIN USING THE HOT-PLATE TEST

This protocol describes the use of a hot plate to measure the potential antinociceptive effects of test compounds to an acute thermal stimulus. Animals are injected with test compounds or vehicle (controls) and then placed on the hot plate one at a time. Latency to respond to the heat stimulus is measured by the amount of time it takes for the animal to lick one of its paws.

#### Materials

- Animal: 30- to 35-g male CD mice, group-housed (e.g., Charles River Labs) or 200- to 250-g male Sprague-Dawley rats
- Test compounds in saline or other appropriate vehicle
- Reference analgesic compound (e.g., morphine, to be given 10 mg/kg, i.p.)
- 1-ml syringes with 27-G needles
- Hot-plate apparatus or metal plate in a controlled temperature water bath

**BASIC  
PROTOCOL 1**

1. Bring animals to test room and record their body weights. Allow animals to acclimate to test room for 15 to 30 min.

*Separate groups of animals are used for each treatment.*

2. Set hot plate to 55°C for mice or 52.5°C for rats.

*Morphine treatment may be used to determine the optimal hot-plate temperature. Doses of 8 to 10 mg/kg morphine (i.p.) typically provide a near-maximal to maximal antinociceptive response in acute pain assays. The apparatus is set to the temperature at which this type of antinociceptive response is observed with these doses of morphine.*

3. Prepare doses of test compounds, vehicle (control), and reference agent such as morphine (if desired).

4. Inject animals with test compound, vehicle, or reference agent. Inject animals in a staggered fashion to allow a consistent time to pass between treatment and testing for each animal. Randomize the order in which different treatments are administered such that each condition is distributed throughout the duration of the entire experimental procedure.

*For example, administer vehicle, then dose 1, then dose 2, and repeat until the desired number of animals for each group (e.g.,  $n = 8$ ) is reached. The time interval used to stagger the injections will depend on the time it takes to test each animal. Testing time is generally based on the cutoff time—the preselected time at which the test will be terminated if the animal shows no nociceptive response. Adhering to preselected cutoff times helps minimize the tissue damage that can occur with prolonged exposure to a heated surface. For the purposes of staggering treatments, if the cutoff time is set to 30 sec, the experimenter may want to leave 45 to 60 sec between the injection of animals. The number of animals that can be treated at one time depends on the time between treatment and testing. For example, if testing is to be performed 30 min after treatment, a single experimenter, treating animals at a rate of one per minute, should treat only 30 animals. At 30 min, it will be time to test the first treated animal.*

5. When post-treatment time (e.g., 30 min) has elapsed, begin testing animals. Place a single animal on the hot plate and immediately start a stopwatch or timer. Observe the animal until it shows a nociceptive response (e.g., licks its paw) or until the cutoff time is reached. Remove the animal from the hot plate. Record its latency to respond. For animals that do not respond prior to the cutoff time, record the cutoff time (e.g., 30 sec). Repeat for all animals in the order in which they were treated.

*Mice or rats placed on a heated surface will often lick their paws, typically the front paws first. For scoring, the latency to respond is measured as the amount of time that elapses between when the animal is placed on the hot plate and when it first licks one of its rear paws. Front paw licking is a common grooming response and may have no relation to discomfort. Therefore, rear paw licking is a more reliable measure of discomfort.*

*The duration of action of a compound may also be determined by measuring a single animal's response over time. For example, measurements may be taken 15, 30, and 60 min after treatment with a test compound. Of course, similar measurements must be made for vehicle-treated animals (controls).*

6. Perform appropriate statistical analysis on the data. With multiple groups, use an ANOVA followed by post-hoc analysis (if appropriate) to compare the treatment groups to the controls (vehicle treatment).

*Data from hot-plate tests are often expressed as percent maximum possible effect (%MPE).  $\%MPE = (test - baseline) / (cutoff - baseline) \times 100$ , where test is the latency to respond after treatment; baseline is the latency to respond prior to treatment; and cutoff is the preset time at which the test will be ended in the absence of a response. To determine a compound's %MPE, a baseline measure must be obtained for each animal prior to treatment with vehicle or test compound.*

## **MODELOS DE NOCICEPCIÓN: HOT-PLATE, TAIL-FLICK, Y TEST DE FORMALINA EN ROEDORES <sup>5</sup>**

Los modelos experimentales de sensibilidad al dolor (nocicepción) incluyen pruebas de umbrales de respuesta a los estímulos de alta intensidad (pruebas de dolor agudo) y de los cambios en el comportamiento espontáneo o evocado. respuestas conductuales en animales con lesión o inflamación periférica (modelos de dolor persistente). El dolor térmico agudo es modelado por las pruebas de la placa caliente y el parpadeo de la cola. El dolor persistente producido por la lesión e inflamación del tejido periférico puede ser modelado por la prueba de formalina. En este examen, la lesión tisular se produce por la inyección de una formalina diluida en la pata, lo que evoca un comportamiento espontáneo, caracterizado por el lamido de la pata y estremecimiento, que persiste para 1 hr. Además de estas pruebas de dolor, existen modelos para estudiar cambios en los umbrales térmicos y mecánicos que ocurren después de una lesión a un nervio periférico (dolor neuropático). Hay evidencia de que los neurotransmisores y neuromoduladores mediadoras de las respuestas del dolor en cada uno de estos modelos pueden ser diferentes. Como resultado, diferentes los agentes farmacológicos pueden ser eficaces para atenuar el dolor en los diferentes modelos. A La comprensión básica de los mecanismos que intervienen en la transmisión del dolor es importante para

para elegir el modelo más apropiado para examinar las propiedades analgésicas de determinadas agentes o clases de compuestos. Esta unidad presenta protocolos para la prueba del dolor agudo utilizando tanto la prueba de la placa calefactora (véase el protocolo básico 1) como la prueba del parpadeo de la cola (véase el protocolo básico 2), y para probar un modelo de dolor persistente utilizando la prueba de formalina (véase el Protocolo Básico 3). Cada protocolo describe la preparación de los animales (ratones o ratas) para las pruebas, la administración y el control de la enfermedad. de un compuesto que está siendo probado por sus propiedades analgésicas, y la recolección de datos.

Los investigadores deben tener en cuenta que algunos miembros de los comités de cuidado y uso de animales pueden ser reacio a aprobar protocolos de "dolor". Descripciones claras y concisas de los procedimientos son necesarios para informar a quienes no están familiarizados con estas técnicas que los estímulos utilizados son relativamente corta duración. Diseño experimental adecuado, que incluye la aplicación de las horas límite para limitar la exposición a estímulos nocivos minimizarán la cantidad de dolor y la angustia experimentada por los animales de experimentación.

### **MEDICIÓN DEL DOLOR AGUDO MEDIANTE LA PRUEBA DE LA PLACA CALIENTE**

Este protocolo describe el uso de una placa caliente para medir el efecto potencial antinociceptivo de los compuestos de ensayo en un estímulo térmico agudo. Los animales son inyectados con prueba o vehículo (controles) y luego se colocan uno por uno en la placa calefactora. La latencia para responder al estímulo de calor se mide por la cantidad de tiempo que le toma al animal para lamer una de sus patas.

## Materiales

- Animal: ratones CD machos de 30 a 35 g, alojados en grupo -Sprague-Dawley macho de 200 a 250 g
- Compuestos de ensayo en suero salino u otro vehículo apropiado
- Compuesto analgésico de referencia (por ejemplo, morfina, 10 mg/kg, p.i.)
- Jeringas de 1 ml con agujas de 27 G
- Aparato de placa caliente o placa metálica en un baño de agua a temperatura controlada
- Cronómetro o temporizador

1. Lleve a los animales a la sala de pruebas y registre el peso de sus cuerpos. Permitir que los animales se aclimaten a la sala de pruebas de 15 a 30 minutos. Para cada tratamiento se utilizan grupos separados de animales.

2. Ajuste la placa caliente a 55°C para los ratones o 52.5°C para las ratas. El tratamiento con morfina se puede utilizar para determinar la temperatura óptima de la placa caliente. Dosis de 8 a 10 mg/kg de morfina proporcionan típicamente un nivel de antinocicepción entre casi máximo y máximo de respuesta en pruebas de dolor agudo. El aparato se ajusta a la temperatura a la que este tipo de respuesta antinociceptiva se observa con estas dosis de morfina.

3. Preparar dosis de compuestos de prueba, vehículo (control) y agente de referencia, tales como morfina (si se desea).

4. Inyectar a los animales con compuesto de ensayo, vehículo o agente de referencia. Inyectar animales en un Moda escalonada para permitir que transcurra un tiempo consistente entre el tratamiento y la prueba. para cada animal. Aleatorizar el orden en que se administran los diferentes tratamientos de manera que cada condición se distribuya a lo largo de toda la duración del experimento. procedimiento.

Por ejemplo, administrar el vehículo, luego la dosis 1, luego la dosis 2, y repetir hasta que se obtenga el resultado deseado. número de animales por grupo (por ejemplo, n = 8). El intervalo de tiempo utilizado para escalonar las inyecciones dependerá del tiempo que tome probar a cada animal. El tiempo de prueba es generalmente basado en el tiempo límite - el tiempo preseleccionado en el cual la prueba será terminada si el animal no muestra ninguna respuesta nociceptiva. El cumplimiento de los tiempos de corte preseleccionados ayuda a reducir al mínimo el daño tisular que puede ocurrir con la exposición prolongada a una superficie calentada. Si el tiempo de desconexión está ajustado a 30 segundos, el experimentador podrá dejar de 45 a 60 segundos entre la inyección de los animales. El número de animales que puede ser tratado de una sola vez depende del tiempo que transcurra entre el tratamiento y la prueba. Por ejemplo, si la prueba se va a realizar 30 minutos después del tratamiento, un solo experimentador, que trate a los animales a razón de uno por minuto, debería tratar sólo a 30 animales. A los 30 minutos, será el momento de probar el primer animal tratado.

5. Cuando haya transcurrido el tiempo de pos tratamiento (por ejemplo, 30 minutos), comience a realizar pruebas a los animales. Coloque un solo animal en la placa caliente e inmediatamente poner en marcha un cronómetro o temporizador. Observe el animal hasta que muestre una respuesta nociceptiva (por ejemplo, cuando se lame la pata) o hasta el corte el tiempo es alcanzado. Retire el animal de la placa caliente. Registre su latencia para responder.

En el caso de los animales que no respondan antes de la hora límite, registre la hora límite (por ejemplo 30 seg.) Repita para todos los animales en el orden en que fueron tratados.

Los ratones o ratas colocados en una superficie calentada a menudo lamen sus patas, típicamente las patas delanteras. Para la puntuación, la latencia para responder se mide como la cantidad de tiempo que transcurre entre el momento en que el animal se coloca en la placa de cocción y el momento en que lame por primera vez una de sus patas posteriores. El lamer la pata frontal es una respuesta común de aseo y puede no tener relación con incomodidad. Por lo tanto, lamer la pata trasera es una medida más fiable de la incomodidad. La duración de la acción de un compuesto también puede determinarse midiendo un único la respuesta del animal en el tiempo. Por ejemplo, se pueden tomar mediciones de 15, 30 y 60 min.

después del tratamiento con un compuesto de prueba. Por supuesto, se deben realizar mediciones similares para animales tratados con vehículos (controles).

6. Realizar un análisis estadístico adecuado de los datos. Con varios grupos, utilice un

ANOVA seguido de un análisis post-hoc (si procede) para comparar el tratamiento a los controles (tratamiento de los vehículos).

Los datos de las pruebas de placas calientes se expresan a menudo como porcentaje del efecto máximo posible (%MPE).  $MPE = (test - baseline) / (cutoff - baseline) \times 100$ , donde test es la latencia para responder después del tratamiento; el punto de partida es la latencia para responder antes del tratamiento; y el punto de corte es el preestablecido

momento en el que se finalizará la prueba si no hay respuesta.

L1 = el punto de partida es la latencia para responder antes del tratamiento

L2 = es la latencia para responder después del tratamiento

TIEMPO DE CUT OFF: el punto de corte es el preestablecido momento en el que se finalizará la prueba si no hay respuesta.

ANEXO N° 12. GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE  
LABORATORIO: RATÓN <sup>44</sup>



MINISTERIO DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



---

---

GUÍA DE MANEJO Y  
CUIDADO DE ANIMALES DE  
LABORATORIO: RATÓN

---

---



Elaborado por:

Q. F. Flor de María Fuentes Paredes  
Q. F. Rosa Amelia Mendoza Yanavilca  
M.V. Arturo Lorenzo Rosales Fernández  
M.V. Rosario Alberto Cisneros Tameño

Centro Nacional de Productos Biológicos  
Instituto Nacional de Salud

LIMA, 2008



# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

El animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por ley es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva.

### 1.1. EL ANIMAL DE LABORATORIO

El animal de laboratorio es aquel que:

- › Es engendrado y producido en condiciones controladas.
- › Mantenido en un entorno controlado.
- › Posee claros antecedentes genéticos y microbiológicos.
- › Existe una comprobación sistemática de estos antecedentes.

También es definido como cualquier especie animal que, mantenido bajo determinadas condiciones controladas es utilizado como instrumento de medida en experimentación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y docencia, para la generación de datos, los cuales son utilizados como información. Ejemplo de estas especies son: el ratón, la rata, el hámster, el conejo, el perro, el mono etc.

### 1.2. EL RATÓN, SU TAXONOMÍA Y USO COMO ANIMAL DE LABORATORIO

#### TAXONOMÍA

Clase: Mammalia

Familia: Muridae

Género: Mus

Especie: *Mus musculus*.

Ventajas de su uso como animal de laboratorio:

- › De fácil cuidado y mantenimiento, por su pequeño tamaño.
- › Bajos costo de manutención.
- › Cepa definida.
- › Diversidad de características específicas que sirven como modelo.
- › Eficiencia reproductiva.
- › Por su vida relativamente corta es excelente para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología, etc.
- › Corto tiempo de generación.

#### **Desventajas:**

- > Dificultad en la recolección de material biológico.
- > Dificultad la administración de drogas.
- > Dificultad en las técnicas quirúrgicas.

#### **1.3. CEPA**

Población de una misma especie, descendiente de un mismo origen; conservada por medio de una serie de pasos o cultivos.

Ejemplos:

- > RATON BALB/c (*Mus musculus*)
- > RATON AKR (*Mus musculus*)
- > RATON ICR (*Mus musculus*)
- > RATON NIH (*Mus musculus*)

Todas estas cepas se usan ampliamente en estudios de toxicología, farmacología y en pruebas de seguridad.

#### **1.4. ADQUISICIÓN DE ANIMALES DE LABORATORIO**

La importación de animales de laboratorio deberá cumplir los requisitos zoo-sanitarios del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) del Perú.

La elección del animal del laboratorio debe cumplir las exigencias de la investigación biomédica y reunir los requisitos genéticos y microbiológicos.

#### **1.5. CERTIFICADO DE SANIDAD**

Documento que acredita la calidad sanitaria de los animales, producidos o adquiridos, mediante estudios adecuados que certifiquen la ausencia de enfermedades que puedan interferir con los resultados experimentales.

Todos los animales adquiridos por compra o donación y que serán utilizados como animal de laboratorio, deben ir acompañados de este documento que certifica las condiciones de salud y calidad en que se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de su salida del lugar de origen.

## CAPÍTULO II

### EL RATÓN: SU MICROAMBIENTE Y MACROAMBIENTE

#### 2.1. MICROAMBIENTE

El microambiente, es el ambiente físico inmediato que rodea al ratón; también llamado confinamiento o encierro primario, está limitado por el perímetro de la jaula o caja, cama, alimento y agua de bebida; deben contribuir a la salud de los animales, y evitarles todo estrés, por lo que deberá asignársele, a cada uno, un espacio adecuado que le permita movimientos y adopciones de posturas normales, preservando a su vez las mínimas condiciones de higiene y de protección contra insectos, roedores y otras plagas.

El microambiente lo conforman la caja o jaula, el alimento, el agua, así como el mantenimiento de las condiciones de higiene de cada uno de ellos (capítulo de cuidado y mantenimiento).

##### 2.1.1. CAJA O JAULA

Los ratones se alojan en cajas o jaulas especialmente diseñadas para facilitar su bienestar, pueden ser de metal o de plástico (polipropileno, policarbonato, poliestireno y polysulfano), provistas de tapas de acero inoxidable con o sin filtro.

Debe tener las siguientes características:

- Proporcionar espacio adecuado, ser cerrado, seguro y protegerlo de las amenazas externas.
- Ser adecuado en ventilación.
- Ser resistente al lavado, desinfección y esterilización frecuente.
- Permitir la observación del animal.
- Tener pisos y paredes fáciles de limpiar (superficies lisas) y con tapa removible de rejillas o perforada.
- Mantenerse en buenas condiciones de uso.
- Facilitar el acceso de los animales al agua y alimento.
- No presentar bordes cortantes o proyecciones que puedan causar lesiones.

### 2.1.2. RECOMENDACIONES DE ESPACIO (DENSIDAD ANIMAL)

Peso en gramos	Área del piso por animal en cm <sup>2</sup>	Altura cm
Menor de 10	38,71	12,7
10-15	51,61	12,7
15-25	77,42	12,7
Mayor a 25	98,77	12,7

Fuente: Biotorio Central – CNPQ del INIA, 2007

### 2.1.3. LECHO O CAMA

Los lechos serán de material absorbente tal como la viruta de madera, la coronta molida del maíz (marlo), etc.; libres de polvillo, alérgenos y sustancias tóxicas. Deben ser esterilizables.

La viruta más adecuada es la de pino blanco, seguida por la de tornillo.

Se debe tener especificaciones de calidad de la viruta para su adquisición, tales como:

- › No ser nocivo.
- › Capacidad de absorción
- › No se recomienda el uso de viruta procedente de cedro o caoba.

### 2.1.4. AGUA DE BEBIDA

El agua debe ser potable y suministrarse libremente durante toda la vida del animal, puede ser en frascos bebederos de vidrio o de policarbonato. El agua debe ser acidificada, esterilizada mediante autoclave o por método de filtración.

### 2.1.5. ALIMENTO: DIETAS Y REQUERIMIENTOS

El alimento es el material primario a partir del cual se van a formar y renovar los tejidos y estructuras corporales, tanto las nuevas como las ya existentes, que deben ser reemplazadas debido al proceso de desgaste. La nutrición es determinante en los estados sucesivos de crecimiento y producción de los animales, de ahí que haya alimentos específicos para cada especie y hasta para cada etapa de su vida.

Luego de su adquisición, se debe tener cuidado en el transporte, almacenamiento y manipulación del alimento para reducir al mínimo la introducción de enfermedades, parásitos y vectores potenciales de enfermedades (por ejemplo insectos y otras plagas) y contaminantes químicos.

Se debe contar con un procedimiento para la adquisición de alimento y los requisitos que este debe reunir, tales como:

- ▷ Composición, que deberá cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactancia y mantenimiento del ratón.
- ▷ Debe ser agradable al paladar (palatable) y digestible.
- ▷ Tener fecha de elaboración y caducidad.
- ▷ Certificado de análisis químico proximal y microbiológico por cada lote.
- ▷ Estar libre de harina de pescado, aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes patógenos.
- ▷ El alimento en forma de pellet debe tener la consistencia requerida, para evitar

## **2.2. MACROAMBIENTE**

El macroambiente es el espacio inmediato al microambiente y es la sala de alojamiento en su ámbito general.

La alteración de los factores del macroambiente producirá cambios en el modelo animal y con ello, la modificación del tipo de respuesta, y aumento de la variabilidad de los resultados entre o dentro de los laboratorios de experimentación.

### **2.2.1. AIRE Y VENTILACIÓN**

Los ambientes destinados a la producción de animales, en su interior, deben poseer ventilación con presión positiva de aire respecto a los pasillos o áreas exteriores, manteniendo las gradientes de presión, de tal forma que se evita el ingreso de patógenos desde el exterior.

En caso de poseer un bioterio de doble pasillo con locales centrales (circulación limpia y sucia), la gradiente de presión será del limpio hacia el sucio.

La ventilación es importante para controlar la humedad, calor, gases tóxicos. Se debe generar entre 15 a 20 recambios de aire / hora.

Los sistemas de aire acondicionado o ventilación no podrán ser compartidos con otras áreas, serán exclusivos para el sector bioterio y con factores controlados de temperatura y humedad.

### **2.2.2. TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA**

Las exigencias de temperatura para ratones son de 20 a 25 °C y la humedad relativa ambiental entre 40 y 70%.

Las condiciones ambientales en que se crían y experimentan los animales influyen decisivamente en las respuestas a los diferentes tratamientos. Si se requiere respuestas estandarizadas, las condiciones en que se mantienen los animales deben ser fijas.

### 2.2.3. INTENSIDAD DE LUZ Y TIPO DE ILUMINACIÓN

Los ambientes de crianza deben contar con la luz artificial, provista de lámparas fluorescentes tipo luz día, con incidencia oblicua, con una iluminación máxima de 323 lux a un metro del piso; de forma tal, que todas las jaulas, independientemente de su ubicación, reciban intensidades similares de luz.

La iluminación debe distribuirse adecuadamente a través de la sala de alojamiento y ser lo suficiente para las prácticas de mantenimiento, inspección y bienestar de estos, sin causarles signos clínicos a los animales. También debe proporcionar condiciones seguras de trabajo para el personal.

La iluminación es importante para la regulación del ciclo estral y reproductivo. Se recomienda 12 horas luz/12 horas oscuridad, lo cual se programa con un reloj temporizador.

### 2.2.4. RUIDO

Los ratones son muy sensibles al ruido y pueden percibir frecuencias de sonido que son inaudibles para el ser humano, por lo que el personal debe tratar de minimizar la generación de ruido innecesario. El ruido excesivo e intermitente se puede minimizar capacitando al personal en modos alternativos a las prácticas que producen ruido. Los radios, celulares, alarmas y otros generadores de sonido, aun con auriculares o audifonos, no deben usarse en las salas de alojamiento de animales. Se permite un nivel máximo de ruido de 85 decibeles, si estos son mayores tiene efectos nocivos como estrés y problemas de fertilidad.

### 2.2.5. OLOR

El olor es otro factor que afecta al ratón, es por ello que no se debe utilizar desinfectantes que emanen olores, que sean irritantes y mucho menos desodorizantes, dentro de los ambientes del bioterio.

La percepción de amoniaco en el ambiente es un indicador de saturación del lecho, por lo que se recomienda tener programas de cambio de lecho según la población que se maneje.

Por ejemplo, se conoce que el hombre es capaz de percibir 100 ppm de amoniaco del ambiente del ratón y éste puede percibir desde 25 ppm de amoniaco.

## CAPÍTULO III

### MANEJO Y CUIDADO DE RATONES

El mantenimiento de los animales en buen estado de salud, depende en mayor parte de que el personal adopte ciertas normas y formas de trabajo para mantener las barreras sanitarias con continuidad en el tiempo.

Un buen programa de cuidado y manejo ofrece el ambiente y alimentación que permite a los animales crecer, reproducirse y mantener una buena salud.

Para elaborar estos programas se debe considerar los siguientes factores:

- › Las especies y cepas.
- › La habilidad del animal para integrar grupos.
- › Disponibilidad de la instalación y equipamiento.
- › Periodo de permanencia de los animales.

Este capítulo incluye desde el ingreso del ratón al bioterio hasta su muerte.

Características de manejo:

- › *Bueno*, cuando los ratones se acercan a la persona
- › *Regular*, cuando manifiestan timidez
- › *Malo*, cuando el ratón se asusta y trata de esconderse

#### 3.1. CUARENTENA

El ratón tiene que pasar por un tiempo de adaptación (cuarentena), desde su adquisición hasta su uso, con el objetivo de tener ratones menos estresados y más sanos, que proporcionen un mejor resultado experimental. Este periodo no es menor de 15 días.

Todos los días se observaran a los ratones, para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.

#### 3.2. ALIMENTACIÓN Y MANEJO DEL ALIMENTO

Los animales deben recibir alimento en cantidad y calidad suficiente para sus necesidades y para conservar la salud. El acceso al alimento debe ser libre y dosificado de acuerdo con los requerimientos, así cuando los animales se albergan en grupos, debe haber suficientes puntos de alimentación para minimizar la competencia por el alimento y asegurar que todos los ratones tengan acceso al alimento.

### **3.3. PROVISIÓN DE AGUA**

Debe ser renovada en forma total, diariamente o cada dos días, eliminando todo contenido residual del frasco de bebida.

Los frascos de bebida deberán ser lavados y desinfectados por lo menos una vez por semana, los picos serán observados y lavados con cepillo periódicamente para evitar el taponamiento.

Se recomienda la vigilancia microbiológica de manera periódica, para asegurar que la calidad del agua sea aceptable y no influya en los resultados experimentales.

Así mismo, se deberá describir el proceso de tratamiento o purificación del agua.

### **3.4. MANEJO DE LECHO O CAMA**

El material del lecho o cama seleccionado, deberá transportarse y almacenarse en sacos o envases de plástico, cerrados aislados del piso, sobre parihuelas, de modo que permita mantener la calidad y evitar la contaminación.

Tener cuidado durante la esterilización que se realiza por autoclavado, la viruta puede absorber humedad, perdiendo su absorbancia y ser susceptible al crecimiento de microorganismos, por ello debe usarse tiempos apropiados de secado y buenas condiciones de almacenamiento.

Debe usarse en cantidades suficientes para mantener a los animales secos entre cada cambio.

### **3.5. LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN**

#### **3.5.1. ELIMINACIÓN DE DESECHOS**

El área de eliminación de desechos debe proveer espacio para el almacenaje apropiado de material relacionado con los animales, excrementos, camas sucias, cadáveres, materiales peligrosos, etc. Los desechos colocados fuera de las instalaciones se deben mantener en recipientes cerrados herméticamente.

Se debe tener normado el manejo, almacenamiento, método y frecuencia de eliminación de desechos.

#### **LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE JAULA**

Cambiar el material del lecho dos a tres veces por semana, para evitar concentraciones altas de amoníaco que son perjudiciales para los animales, esta frecuencia también depende del tamaño, cantidad de ratones albergados y de la ventilación del ambiente. En cada cambio lavar las jaulas con detergente usando esponja o escobilla.



## LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE FRASCOS BEBEDEROS

Los frascos bebederos serán lavados y desinfectados cada vez que se suministre agua de bebida.

Se lavarán con agua, escobilla y detergente toda la superficie interna del frasco, igual proceder con los goteros para lo cual se usa un cepillo especial. Luego, desinfectar con agua caliente o con algún desinfectante como hipoclorito de sodio sumergiendo el bebedero durante una hora.

### 3.6. CAPTURA Y TRASLADO DE JAULA.

Para el traslado de ratones generalmente se sujetan de la región media de la cola con los dedos índice y pulgar. Otra forma es abrazándolo del cuello con el dedo índice y el pulgar.

### 3.7. SUJECCIÓN CON UNA MANO (MANO IZQUIERDA)

- › Saque el ratón de la jaula tomándolo de la zona media de la cola, y apóyelo (sin soltarlo) sobre una superficie rugosa o rejilla contra la que pueda ejercer resistencia.
- › Coloque la base de la cola del ratón entre sus dedos anular y meñique, dejando libre sus dedos pulgar e índice
- › Con rapidez pellizque con el dedo pulgar e índice, suave pero firmemente, la piel de la parte superior de cuello y hombros, teniendo especial cuidado con los ratones agresivos ya que pueden darse vuelta y morder.
- › Levante al animal

### 3.8. TÉCNICA DE EUTANASIA

Deberá elegirse un método que no cause sufrimiento al ratón.

**Métodos químicos:**

**a) Agentes inhalatorios:** gases anestésicos, gases no anestésicos.

**b) Agentes no inhalatorios:** tranquilizantes (curare y estricnina).

Para efectos de los agentes inhalatorios, los ratones son conducidos a cámaras que deben estar diseñadas adecuadamente, donde se distribuye el agente, asegurando la distribución uniforme del gas y la rápida exposición de los ratones a una concentración alta del agente.

Los ratones recién nacidos son más resistentes a la hipoxia y tardan más tiempo en morir; por ello hay que utilizar otros métodos.

Es importante seleccionar agentes que no sean desagradables al ser inhalados, porque algunos pueden ser irritantes y por ello estresantes.

Cuando se administren agentes inhalatorios hay que tomar precauciones de seguridad, utilizando un equipo adecuado de recogida de gases y se debe confirmar la muerte.

El más utilizado es el dióxido de carbono en concentraciones superiores a 60%, el dióxido de carbono (anhídrido carbónico) actúa como un agente anestésico y produce rápidamente la pérdida de conciencia (Green 1987). Es muy eficaz y humanitario para la eutanasia de la mayoría de los animales pequeños utilizándolo por encima del 70% de concentración.

### 3.9. ATENCIÓN MÉDICO-VETERINARIA

La atención médico-veterinaria es un aspecto de gran importancia dentro del programa de cuidado y uso de los animales. Una adecuada atención médico-veterinaria debe contener programas eficaces de:

- › Medicina preventiva.
- › Vigilancia, diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades.
- › Manejo de enfermedades.
- › Evaluación de salud y bienestar animal.
- › Método de eutanasia.

El programa de atención veterinaria es responsabilidad del médico veterinario encargado, con experiencia en ciencia y medicina de los animales de laboratorio. Es su función el asesorar a investigadores y personal involucrado en el cuidado y uso de animales para asegurar una apropiada manipulación e inmovilización, sedación, anestesia, analgesia y eutanasia.

Por tanto, todo sistema de control, de vigilancia y de regulaciones que se establezca para la prevención de infecciones y para el control y mantenimiento del nivel higiénico-sanitario de los animales, es un aspecto fundamental y debe ser llevado a cabo con gran rigor técnico y de manera documentada.

## ARCHIVO FOTOGRÁFICO



FOTO N° 1. Recolección de la muestra (planta *Schinus molle* "molle")



FOTO N° 2. Determinación de la polaridad del aceite esencial de *Schinus molle* (Polarímetro)



*FOTO N° 3. Determinación de la densidad del aceite esencial de Schinus molle*



*FOTO N° 4 Pre-formulación de la crema con aceite esencial de Schinus molle*



*FOTO N°5. Obtención de las diferentes pre-formulaciones*



*FOTO N°6. Obtención de la crema final Formula N°1, con aceite esencial de Schinus molle, a diferentes concentraciones*



FOTO N°7. Determinación de la estabilidad de la crema por centrifugación a 2500 rpm

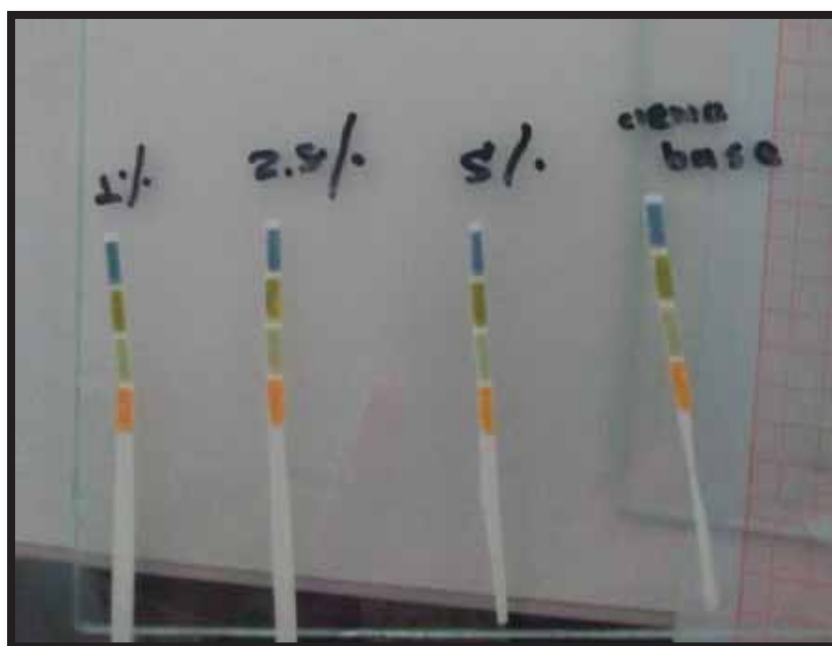
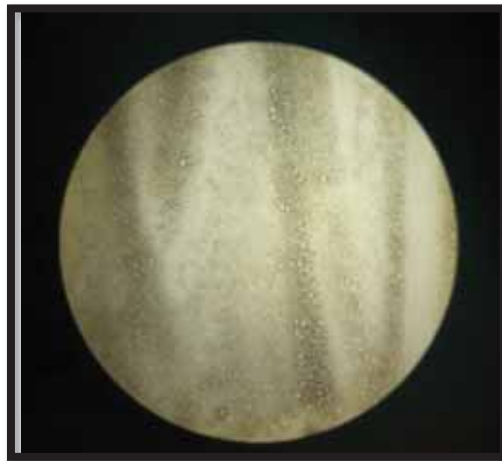


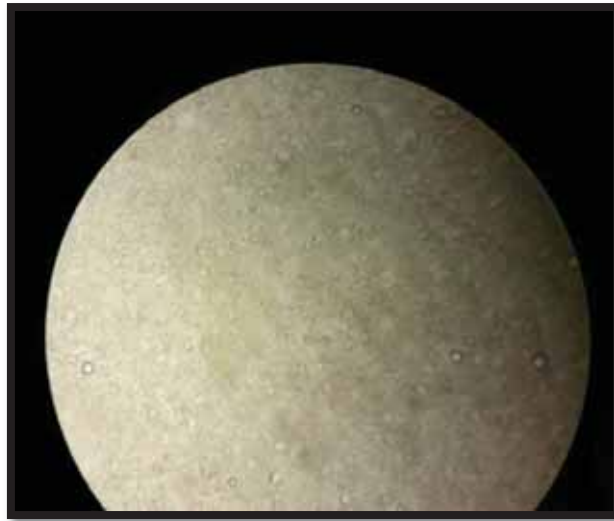
FOTO N°8. Determinación del pH de la crema elaborada a diferentes concentraciones



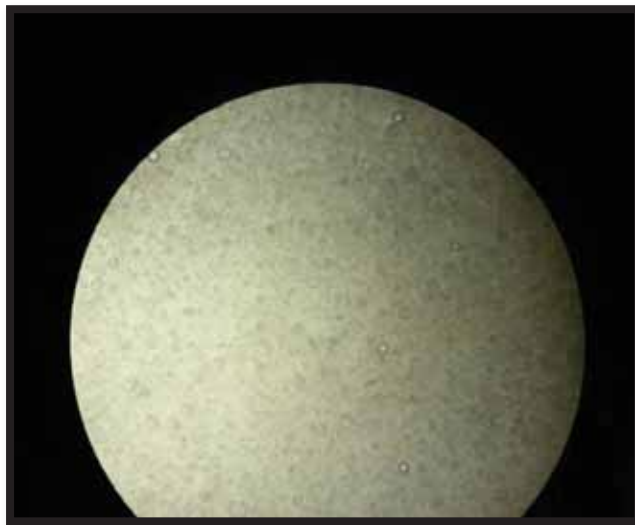
*FOTO N°9. Determinación de la extensibilidad de la crema elaborada*



*FOTO N°10. Observación al microscopio de la formulación N°1*



*FOTO N° 11. Observación al microscopio de la formulación N°2*



*FOTO N°12. Observación al microscopio de la formulación N°3*





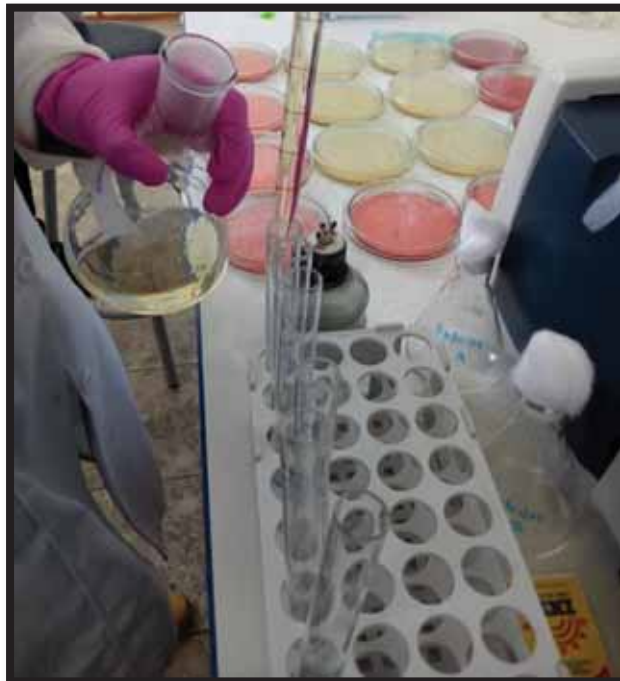
*FOTO N°13. Esterilización de materiales de laboratorio para el control microbiológico*



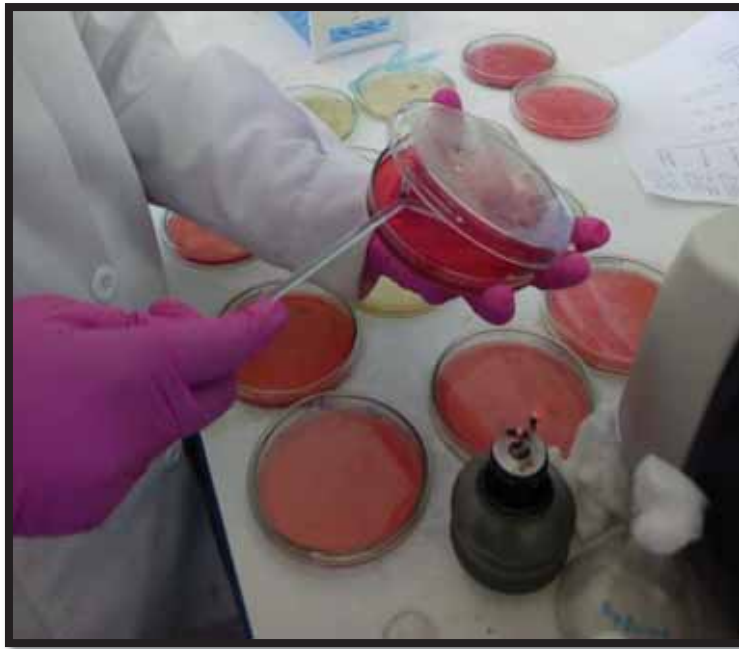
*FOTO N°14. Preparación de los medios de cultivo*



*FOTO N° 15 Homogenización de la crema en estudio en el caldo*



*FOTO N°16. Dilución a diferentes concentraciones*



*FOTO N°17. Siembra de la muestra en el medio de cultivo*



*FOTO N°18. Acondicionamiento de los ratones balb/c/ en el bioterio de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica*



*FOTO N°19. Aplicación de las cremas para la determinación de la analgesia*



*FOTO N°20. Determinación de la analgesia "método hot plate"*



*FOTO N°21. Preparación de la carragenina al 1%*



*FOTO N°22. Aplicación de la carragenina al 1%*



*FOTO N°23. Pata posterior derecha antes y después de la aplicación de la carragenina al 1%*



*FOTO N°24. Medición del volumen de edema plantar en el pletismometro digital*