

INTRODUCCION

Desde tiempos pasados el hombre ha buscado solución a sus enfermedades utilizando la flora y fauna de su entorno, y por ello al ir experimentando con diferentes sustancias que la naturaleza le proveía, este conocimiento fue pasando de generación en generación hasta nuestros tiempos en los que la ciencia y la tecnología han tenido un avance sorprendente, motivo por el cual la ciencia nos ayuda a investigar sobre las diferentes propiedades que se les atribuye a las diferentes especies vivas.

Achyrocline alata, “Huiru Huiru”, “Wira wira” o “Vira vira” es una especie vegetal nativa perteneciente a la familia de las Asteraceas y cuyo nombre común es de origen quechua, que fue recolectada a las alturas descritas en bibliografía (Femenía Hugo, 2002); dentro del Departamento del Cusco, y cuyas características intrínsecas de la especie ayudan a su reconocimiento dentro de la flora regional. Según Jorge Hugo Femenía quien comenta sobre dicha especie vegetal y sus propiedades en su artículo “Flora del Famatina”: “Los mapuches la emplean para los daños de la vista y como expectorante” además para corregir trastornos digestivos.

El contenido fitoquímico que indica la presencia de ácidos cafeilquínicos, responsables del efecto hipocolesterolemiante en algunas especies vegetales, llevó a la determinación del efecto de manera experimental, para lo cual se utilizaron métodos previamente validados.

Es por eso que se ha planteado como objetivo principal determinar dicho efecto en ratas albinas, induciéndolas a hipercolesterolemia con colesterol puro y dosificado.

También se prueba en la determinación de la toxicidad aguda el método UP-DOWN recomendado por la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), mediante el cual se utiliza un solo animal por grupo, y se prueba en dicho animal hasta una dosis de 2000 mg/kg de peso y si en este caso existiera muerte del animal de experimentación se prueba en un grupo mayor dicha dosis, evitando así el sacrificio de muchos animales de experimentación.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Uno de los mayores problemas de la década es la obesidad y los problemas cardiacos a causa del incremento de colesterol en la mayoría de las personas ya sea por sus hábitos alimenticios, ansiedad o por muchas otras razones; es por ello que un estudio realizado en Lima, reveló lo siguiente, en un artículo periodístico del diario "El Comercio":

"...En el trabajo "Colesterol y triglicéridos, y su relación con el índice de masa corporal (IMC) en pacientes adultos que acuden al SAAAC (Servicio Académico Asistencial de Análisis Clínicos)", efectuado por los Químicos Farmacéuticos Juan Parreño y Elmer Gutiérrez entre octubre del 2008 y enero del 2009 en Lima, se detectó que el 39,5% registró hipercolesterolemia, el 49,3 % hipertrigliceridemia, un 38% tenía sobrepeso y el 25,3% obesidad.

"Así lo señala la investigación del Servicio Académico Asistencial de Análisis Clínicos (SAAAC), de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos". Además "...Las enfermedades al corazón y la obesidad son un grave problema de salud. Esto se da por los malos hábitos alimenticios que tiene la población", sostuvo Parreño, director del SAAC (Medina Tovar, 2009)

Al igual que artículo anterior, lo mismo ocurre en el Departamento del Cusco, donde se ha podido recopilar un estudio de los niveles de colesterol dentro del Departamento la cual hace referencia que a partir de los treinta años los niveles de HDL, disminuyen considerablemente, tal como dice en el párrafo extraído del resumen del artículo "Colesterol total y sus fracciones en adultos de 30 a 39 años, según genero y sub-grupos de edad: Cusco":

“Los niveles de colesterol y fracciones, con excepción del HDL, se incrementan significativamente y para ambos sexos al pasar del grupo de 30-34 al de 35-39 años. En el caso del HDL, los niveles disminuyen significativamente con la edad y para ambos sexos, es decir disminuye el nivel de protección que proporciona el colesterol bueno.” **(Cáceres Pilares, 2004)**

En otro estudio realizado por los mismos investigadores anteriormente, dentro del Departamento del Cusco: “Niveles de Colesterol en pobladores de altura – Cusco”, enfoca a una población entre los 40 y 49 años, demostrándose que con la edad los niveles de LDL colesterol y triglicéridos se incrementan notablemente, y el HDL colesterol disminuye.

Estos estudios nos dan a entender, que no importa mucho la locación, la tendencia del ser humano ya sea por la edad o por sus hábitos, más que todo lo último, es a subir sus niveles de colesterol y fracciones, especialmente el dañino (LDL colesterol). Los cuales son responsables, de muchas afecciones cardíacas y cerebrovasculares, que en la mayoría de los casos causan la muerte.

Según el Departamento de Estadística, Informática y Telecomunicaciones de la Dirección Regional de Salud (DIRESA) a cargo de la Lic. Isabel Fuentes Carayhua, hasta el 2010, las enfermedades del sistema circulatorio son la segunda causa de muerte en la Región (749 muertes al año), y dentro de estas las más importantes son insuficiencia cardíaca (204), paro cardíaco (177) y enfermedades cerebrovasculares (143), todas ellas teniendo como principal agente causal la Hipercolesterolemia. **(DIRESA, 2010)**

Sin embargo al encontrar una sustancia con una actividad o efecto beneficiario para la salud, también es necesario darle un énfasis primordial a su toxicidad, ya sea a corto plazo (toxicidad aguda), a mediano plazo (toxicidad subcrónica) o a largo plazo (toxicidad crónica). Según el Manual Normon: “...Unos compuestos tienen un mayor potencial tóxico que otros y la capacidad de cada

uno en particular para causar efectos deletéreos es un tema cuyo interés se extiende a todos los habitantes.” (Govantes B. Jesús, 1999)

El presente trabajo de investigación está orientado al estudio del efecto hipocolesterolemiante de la especie *Achyrocline alata* “Huiru Huiru”, apoyándonos en la bibliografía y los datos obtenidos de los usos de la especie vegetal en la medicina tradicional. Todos estos resultados y metas fueron alcanzados gracias a los protocolos experimentales que sirvieron de respaldo para concluir esta investigación.

1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA:

¿Presentará efecto hipocolesterolemiante y toxicidad aguda el extracto seco hidroalcohólico al 50% de la especie *Achyrocline alata* “Huiru huiru” en ratas albinas?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto hipocolesterolemiante y la Toxicidad aguda del extracto seco hidroalcohólico al 50% de la especie *Achyrocline alata* “Huiru huiru” en ratas albinas.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener el extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyrocline alata* “Huiru huiru”, realizar las pruebas preliminares (porcentaje de humedad, porcentaje de rendimiento y solubilidad) y determinar la composición fitoquímica del extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* “Huiru huiru”.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto hipocolesterolemiante y la toxicidad aguda del extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) en ratas albinas; para ello se recolectaron las partes aéreas de la especie vegetal, se llevaron a sequedad a temperatura ambiente, se pulverizaron en molino, y luego fueron sometidas a maceración hidroalcohólica por espacio de 15 días, luego se filtró y se llevó a baño maría a 35 – 40 °C obteniéndose como resultado el extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata*. Luego se realizaron las pruebas siguientes: Benedict, Ninhidrina, Cloruro férrico, Shinoda - Amoniaco, Gelatina-sal, Dragendorff - Mayer, Afrosimétrico, Liberman-Burchard, Borntrager, según Dominguez.

Para determinar el efecto hipocolesterolemiante se utilizaron 30 ratas albinas machos cepa Holtzmann con peso promedio de 180 ± 20 gramos procedentes del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú), con condicionamiento previo de 5 días, con agua y alimento a libertad. La hipercolesterolemia fue inducida, considerando el método seguido por Arroyo, con colesterol puro administrado por vía oral en dosis de 62,5 mg/kg suspendido en goma tragacanto al 2%. Se trabajó con cinco grupos de seis ratas, un grupo sin inducción de hipercolesterolemia; otro con inducción y sin tratamiento, y los otros tres grupos recibieron tratamiento con diferentes dosis del extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* (100, 250 y 500 mg/kg) administrado por vía oral durante 60 días. Posteriormente se extrajeron muestras de sangre para evaluar el nivel de colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos, según el método del kit enzimático VALTEK. Adicionalmente, se realizaron cortes histológicos de la arteria aorta en muestras de corazón para observar los efectos del extracto seco hidroalcohólico sobre este tejido.

El modelo de toxicidad UP DOWN consistió en tomar una rata hembra por dosis hasta una dosis límite de 2000 mg/Kg observando si los animales de experimentación presentaban algún signo de toxicidad.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, seguido de una prueba de Tukey, para buscar diferencias significativas entre los grupos. Se consideró que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

En el estudio fitoquímico se encontraron gran cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto hidroalcohólico de *Achyrocline alata*.

En el análisis estadístico, según ANOVA (Análisis de varianza) existen diferencias significativas en la medición del COLESTEROL TOTAL ($p < 0,05$) y en LDL COLESTEROL ($p < 0,05$), es decir se acepta la hipótesis planteada; la especie *Achyrocline alata* reduce significativamente los niveles de COLESTEROL TOTAL y LDL COLESTEROL, a diferencia de TRIGLICERIDOS Y HDL COLESTEROL, en los cuales el extracto no presenta efecto.

Solo presentan depósitos grasos tanto el grupo control positivo como el de la dosis de 500 mg/dl, lo cual está relacionado con los incrementos de COLESTEROL TOTAL y LDL COLESTEROL, esto significa el inicio de formación de ateromas, los cuales a medida que pasa el tiempo conducen a un cierre parcial de las arterias, causando en la mayoría de los casos enfermedades cardiacas.

En cuanto a la Toxicidad aguda se considera al extracto seco como atóxico.

PALABRAS CLAVE: Hipocolesterolemiante, colesterol, ácidos caféicos, ateromas.

INDICE

CAPITULO I GENERALIDADES

1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2	FORMULACION DEL PROBLEMA.....	3
1.3	OBJETIVOS.....	3
1.3.1	OBJETIVOS GENERALES.....	3
1.3.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
1.4	JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.....	4
1.5	HIPÓTESIS.....	5

CAPITULO II MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1	VISION HISTORICA.....	6
2.2	ANTECEDENTES.....	6
2.2.1	ESTADO DE LA CUESTION.....	6
2.2.2	ANTECEDENTES NACIONALES.....	7
2.2.3	ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	8
2.3	BASES TEORICO – CIENTIFICAS.....	9
2.3.1	ASPECTOS BOTANICOS DE LA ESPECIE EN ESTUDIO.....	9
2.3.2	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	10
2.4.	EFFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE.....	13
2.4.1	CONCEPTO.....	13
2.4.2	DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE CON CORRECCIÓN DE LA DOSIS.....	25
2.5	ASPECTOS TOXICOLOGICOS.....	25
2.5.1	ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA.....	26
2.5.1.1	Método hacia arriba y abajo (Up - Down).....	27
2.6	ANIMALES DE EXPERIMENTACION.....	27

2.6.1 RATA (<i>Ratus novergicus</i>).....	27
2.7 MARCO CONCEPTUAL.....	30

CAPITULO III
MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES.....	33
3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	33
3.1.2 CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION.....	33
3.1.3 MATERIAL E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.....	34
3.1.3.1 Materiales de Campo.....	34
3.1.3.2 Materiales de Laboratorio.....	34
3.1.3.2.1 Material de Vidrio.....	34
3.1.3.2.2 Equipos.....	35
3.1.3.2.3 Otros materiales.....	35
3.1.3.3 Reactivos.....	36
3.1.3.4 Reactivos para la Identificación de Metabolitos Secundarios.....	36
3.2 METODOLOGIA.....	36
3.2.1 NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACION.....	36
3.2.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	37
3.2.2.1 Para la determinación efecto hipocolesterolemiantes “ <i>in Vivo</i> ” del extracto seco hidroalcohólico de la especie <i>Achyrocline alata</i> “Huir huir” en ratas albinas.....	37
3.2.2.2 Para determinar la toxicidad aguda de del extracto seco hidroalcohólico de <i>Achyrocline alata</i> “Huir huir” en ratas albinas hembras.....	38
3.3 VARIABLES.....	39
3.3.1 Del efecto hipocolesterolemiantes del extracto seco hidroalcohólico de la especie <i>Achyrocline alata</i> “Huir huir”.....	39
3.3.2 De la Toxicidad Aguda del extracto seco hidroalcohólico de la especie <i>Achyrocline alata</i> “Huir huir” en ratas albinas.....	40
3.3.3 De la Toxicidad Aguda del extracto seco hidroalcohólico de la especie <i>Achyrocline alata</i> “Huir huir” En ratas albinas.....	40
3.4 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS.....	41

3.4.1 INSTRUMENTOS.....	41
3.4.2 TECNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LA INFORMACION.....	41
3.5 PRUEBAS PRELIMINARES.....	41
3.5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL	41
3.5.2 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD.....	42
3.5.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.....	42
3.5.4 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.....	43
3.5.5 ANÁLISIS FITOQUÍMICO.....	44
3.5.6 DEL EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE.....	44
3.5.7 DE LA TOXICIDAD AGUDA.....	45

CAPITULO IV

RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSION

CUADRO DE RESULTADOS.....	48
CONCLUSIONES.....	63
RECOMENDACIONES.....	65
BIBLIOGRAFIA.....	66

ANEXOS

ANEXO 01.....	70
ANEXO 02.....	71
ANEXO 03.....	72
ANEXO 04.....	75
ANEXO 05.....	76
ANEXO 06.....	78
ANEXO 07.....	93
ANEXO 08.....	96

- Cuantificar por análisis bioquímico – enzimático en sangre el colesterol total, HDL y triglicéridos en ratas albinas.
- Realizar el análisis histopatológico comparativo de las muestras de corazón en los grupos de ratas para observar la formación de ateromas
- Determinar la Dosis Letal media (DL₅₀) mediante el método UP - DOWN.
- Realizar el análisis histopatológico comparativo en las muestras de hígado de ratas en los diferentes grupos para observar daños por toxicidad, según el método UP-DOWN.

1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

“El colesterol es uno de los lípidos que forman parte de la composición química de nuestro organismo. No solo eso sino que también es un componente vital que forma parte de diversas estructuras vitales, por lo que puede decirse que sin colesterol no sería posible la vida humana, lo malo no es el colesterol sino tener demasiado colesterol, ya que el exceso de esta sustancia favorece la aparición de ciertas enfermedades” (Isabel Coma Canella,1991)

Como se habrá podido observar el colesterol no es tan malo, siempre y cuando se mantenga una adecuada dieta, sin embargo al centrarse en la realidad, esto es muy difícil de conseguir, debido a los diferentes factores que se encuentran en el entorno.

Por eso, es importante, encontrar la forma de disminuir aquellos niveles elevados de colesterol, que causan diversas patologías, apoyándose en la Medicina tradicional, que desde antaño ha venido solucionando en la mayoría de los casos, muchas afecciones, pero que necesita un respaldo científico para comprobar algunas de sus afirmaciones.

También es importante determinar la toxicidad de las especies vegetales de estudio, ya que depende mucho de ello su buen uso y manejo.

Se ha tomado la especie *Achyrocline alata* como una especie con dichas propiedades, pero con algo en particular que es la de contener entre sus componentes, diversos derivados del ácido cafeil quínico, (Paula G. LÓPEZ, Graciela E. FERRARO y Adriana M. BROUSSALIS, 2006), los cuales según estudios son responsables de un efecto hipocolesterolemizante, y lo hace muy importante para evitar así muchos problemas relacionados con el exceso de colesterol.

Pero conocer la especie vegetal y su composición no es suficiente, sino también hay que demostrar dicha propiedad que se le atribuye, mediante un método experimental, y así respaldar de manera científica lo que la medicina tradicional le atribuye.

Logrando así, que lo que se mantuvo como “planta curativa” de generación en generación, pase a ser conocida como especie reconocida con dichas propiedades desde un punto de vista científico.

1.5 HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico seco al 50 % de la especie *Achyrocline alata* “Huirahuirá” presenta efecto hipocolesterolemizante en ratas albinas.

El extracto hidroalcohólico seco al 50 % de la especie *Achyrocline alata* “Huirahuirá” no presenta toxicidad aguda.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 VISION HISTORICA

La especie *Achyrocline alata*, (Huiru Huiru), conocida en otros lugares como “marcela”, “huira huira” o “wira wira”, fue utilizada, según Hugo Femenía en su artículo: “Flora del famatina” como parte de la medicina tradicional desde tiempo antiguos, ya que esta, era y aún es, una planta que crece de manera común en cualquier zona de la localidad a una altura determinada (aprox. 3000 a 3500 msnm).

2.2 ANTECEDENTES:

2.2.1 ESTADO DE LA CUESTION:

Sobre la investigación del tema se ha denotado escasa información con respecto al efecto hipocolesterolemiante de la especie *Achyrocline alata* “Huiru huira”; pero si, información de las diferentes propiedades de esta como es el caso de un efecto antitumígeno, diaforético, e inclusive con acción digestiva. (Femenía Hugo, 2002)

Sin embargo actualmente los niveles de muertes por enfermedades generadas por hipercolesterolemia se han ido elevando en la Región; según el Departamento de estadística de la Dirección Regional de Salud (DIRESA), por lo cual es necesario el estudio de la propiedad hipocolesterolemiante de la especie vegetal *Achyrocline alata* (Huiru huira).

2.2.2 ANTECEDENTES NACIONALES

- **Arroyo A. Jorge, Ernesto Raez, Miguel Rodríguez, Víctor Chumpitaz, Jonny Burga, Walter De la Cruz, José Valencia. Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (*zea mays l*) en ratas hipercolesterolémicas. Lima. 2005.**

Investigación muy importante, sobre el efecto hipocolesterolemiante en ratas albinas del maíz morado (*Zea mays l*), gracias a la cual se puede realizar el presente trabajo, utilizando la metodología para comprobar dicho efecto.

Se formaron 5 grupos de 6 ratas albinas macho cepa Holtzman, de la siguiente forma: control positivo (con colesterol), control negativo (sin colesterol), dosis 250 mg/Kg, 500 mg/Kg y 1000 mg/Kg.

Se administró colesterol (SIGMA), durante 30 días a todos los grupos con excepción del control negativo y luego allí se administraron las dosis de extracto de maíz morado (*Zea mays l*), continuando con la administración del colesterol durante 60 días, luego se hicieron las pruebas bioquímicas e histopatológicas obteniéndose los siguientes resultados:

Se observó una disminución del colesterol total en las ratas hipercolesterolémicas que consumieron dosis de 250 y 500 mg/kg en relación con el grupo control positivo (reducción de 21,5 y 11,2% respectivamente, $p < 0,01$). No se observaron diferencias significativas sobre los niveles de triglicéridos y colesterol HDL. A mayor dosis se maíz morado se encontró una mayor reducción de radicales libres, con la dosis de 1000 mg/kg se redujo en 56,4% los niveles de malondialdehído ($p < 0,01$).

Conclusiones: En condiciones experimentales, la administración del extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado por vía oral a ratas albinas disminuye los niveles de colesterol total y aumenta la capacidad antioxidante.

2.2.3 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

- **Hugo Femenía, Jorge. Flora del Famatina. Argentina. 2009.**

Pequeño artículo presentado por dicho autor referente a las diferentes especies de dicho género, una breve descripción de sus uso dentro de la Medicina tradicional, así como algunos alcances de las investigaciones científicas que se han hecho en ellas, además de los lugares en los que se encuentran dichas especies.

Nos indica los diferentes tipos de “Marcelas” (Huirá huirá) y algunas pequeñas diferencias, ya que estas pertenecen a diferentes especies: *Gnaphalium spp.* y *Achyrocline spp.* y sus diferentes propiedades tanto antimicrobianas como hipocolesterolemiante, antiespasmódico y analgésico, sedante, hipoglucemiante, emenagoga y antiasmático. Así también hace referencia a datos bibliográficos sobre la composición de dicha especie, tal es el caso de los derivados del ácido cafeíluquinico.

- **Teixeira Volpe, Adriana Valente; Meyer Albiero, Adriana Lenita; Káthia Socorro Mathias Mourao, Tânia Ueda-Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, Diógenes Aparício Garcia Cortez, y Celso Vataru Nakamura. Farmacobotânica das Partes Aéreas de *Achyrocline alata* DC. (Asteraceae). Brasil. 2006.**

Trabajo de investigación de la Universidad de Estadual de Maringá de Brasil, en la cual nos da una detallada descripción botánica y diferenciación histológica de la especie, para poder diferenciarla y utilizarla.

Llegó a la conclusión de que la especie *Achyrocline alata* es una planta de tipo arbustivo, que crece en grupos densos, con hojas lanceoladas y de disposición alterna, las flores están reunidas en grupos de capítulos terminales o axilares y cada capítulo envuelto por brácteas de coloración amarillenta.

- Lopez Paula G., Graciela E. Ferraro y Adriana M. Broussales. **Determinación del contenido de derivados cafeilquínicos en especies sudamericanas del género *Achyrocline*. Argentina. 2006.**

Trabajo de investigación que se encarga sobre el aislamiento de ácidos cafeilquínicos, posibles responsables de la actividad hipocolesterolemia de la especie.

Como conclusión; los resultados obtenidos muestran que *A. alata*, *A. saturoioides* y *A. tomentosa* p r e s e n t a n un mayor contenido porcentual en derivados cafeil quínicos. Debido a la actividad farmacológica de estos compuestos, los resultados están en concordancia con los datos etnomédicos previos. Se observa que en *A. flaccida* el contenido porcentual de estos compuestos es menor.

No se pudo encontrar más información, tanto en la Biblioteca Municipal, ni en el Centro Bartolomé de las Casas, ESSALUD, etc. Por lo que se concluye que no existen **antecedentes locales**.

2.3 BASES TEORICO – CIENTIFICAS:

2.3.1 ASPECTOS BOTANICOS DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

TAXONOMIA

Reino	:	Vegetal
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Asteridae
Orden	:	Asterales
Familia	:	Asteraceae
Género	:	Gnaphalieae
Especie	:	<i>Achyrocline alata</i>
N. vulgar	:	Huirá – Huirá

Fuente: Certificado emitido por la Directora del herbario Vargas (CUZ)
M. Sc. Frutuosa de la Torre Mayorga. (ANEXO 01)

2.3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Achyrocline alata (Kunth) De Candolle "Huirá huirá", "Lechuguilla", "Marcela", "Yateí caá". Caméfita (perenne) sufrutescente y arbustivo que se encuentra en suelos arenosos y rocosos.

Composición fitoquímica: Con interesantes flavonoides, tales como: Quercetin 3- methyl ether 4'-glucoside, 5,6-Dihydroxy-3,7-dimethoxyflavone, Quercetin 3-methyl ether 7- glucoside, 7-Hydroxy-3,5,4'-trimethoxyflavanone. Tiene comprobada actividad antiherpética, Contra la tos, resfríos y lastimaduras. Parodi, D. escribe "las varias especies de marcelas, poseen sabor amargo y son aromáticas. Sus propiedades son tónicas y excitantes, por cuyo motivo tienen variadas aplicaciones en la medicina casera, ya como febrífugas, antihelmínticas o antiespasmódicas". En la actualidad se usa en infusiones como digestiva, carminativa, antiespasmódica, colagoga, eupéptica y emenagoga. También se le atribuyen propiedades de reducir el colesterol. Pregonado para combatir apendicitis, útil en los embarazos gástricos y afecciones del hígado. Planta con abundantes compuestos fenólicos y con excelente actividad antiviral comprobada por contener en sus partes aéreas 7-hydroxy-3,5,4'-trimethoxyflavanone, galangin-3-methyl ether, apigenin, rhamnazin, isokaempheride, quercetin-3-methyl ether, 3,5-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone, quercetin, chlorogenic acid, isochlorogenic acid, caffeic acid and 1,5-dicaffeoyl quinic acid. Indicado contra el asma bronquial, diabetes mellitus, cólicos, dolores abdominales, desórdenes menstruales. La acción estimulante del flujo biliar del ácido cafeico y sus ésteres está ampliamente descripta. También se comprobó la actividad hepatoprotectora de la cinarina, de los

ácidos clorogénico, cafeico y quínico y de sus derivados y los efectos antihepatotóxicos del ácido clorogénico. La determinación de la actividad hepatoprotectora y colerética por contener flavonoides y derivados cafeil quínicos, ha permitido validar su uso popular como digestiva. El ácido cafeil quínico tiene a su vez actividad hipocolesterolémica. El ácido clorogénico y los ácidos cafeico y ferúlico y sus respectivos derivados tienen actividad antioxidante. Esta actividad los convierte en sustancias sumamente promisorias como protectores no tóxicos, muy solubles en agua, contra la peroxidación lipídica y otras injurias celulares mediadas por radicales libres. Se han reportado las actividades antibacteriana y antiviral para los ésteres del ácido cafeico.

Algunos glicósidos del ácido cafeico presentan una inhibición selectiva de la 5-lipooxigenasa, relacionada con la biogénesis de los leucotrienos, y estos a su vez, están implicados en la regulación de la inmunomodulación.

Las acciones terapéuticas mencionadas en la literatura posiblemente guardan relación con el alto contenido de polifenoles que aparecen en los extractos. En este caso, se trata de flavonoides (mayoritariamente 3-O-metilquercetina, Luteolina, Quercetina) y derivados del ácido caféico.

Como usos etnobotánicos se destacan: la infusión de las flores se emplea para tratar cólicos nerviosos, epilepsia, problemas gástricos, diarrea y disentería, además se emplea para regular la menstruación (en este caso se emplea la planta entera), hipocolesterolemia, antiespasmódico y analgésico, sedante, hipoglucemiante, emenagoga y antiasmático. Se utiliza de forma tópica (además de infusión) como antiinflamatorio. Es empleada bajo forma de jarabe en el caso del tratamiento de gripes y resfríos. Los aceites esenciales obtenidos de las inflorescencias de *Achyrocline* recogidas de Argentina central, fueron analizados por CG, obteniéndose 52 compuestos e

identificándose el 93-98% de los mismos; destacándose el Cariofileno, como el componente más abundante de todos (39-48%).

La "marcela" entra en la composición de numerosos "amargos" muy populares en la actualidad, siendo éste su principal uso comercial. Su producción proviene en su casi totalidad de la recolección silvestre, dada su abundancia. Sin embargo se realizan trabajos de selección y mejoramiento dados algunas propiedades de componentes activos aislados recientemente, tal el ácido 1-MO-3,5-dicafeiolquínico (DCQA), sustancia antiviral de posible utilización en tratamiento contra HIV (Roninson et al, 1996; Rocha et al, 1996). Planta resistente a temperaturas bajas (-8°C), puede tolerar nevazón ocasional y cobertura por nieve durante un par de semanas al año. Equivalente a la zona climática 8 de USDA. Desarrolla en áreas de secano, donde el período seco sin precipitaciones dura 6-10 meses y las precipitaciones alcanzan 100-300 mm anuales; o bien a secano, donde el período sin precipitaciones dura 3-5 meses. Las precipitaciones alcanzan 400-800 mm anuales, en ambos casos concentradas en verano o invierno. Exige buena exposición solar en laderas y partes llanas expuestas hacia el norte.

Hábitat: Ampliamente distribuido en suelos arenosos y rocosos.

Distribución geográfica: en el centro y norte de Argentina, SE Brasil, Uruguay, Chile, Perú, Venezuela de 3000 a 4000 m.s.n.m.

Parte utilizada: Se utilizan las partes aéreas en la proporción: 20gr por litro de agua. (Femenía Hugo, 2002)

Mecanismo de acción y farmacocinética de los ácidos fenólicos

En cuanto a su mecanismo de acción tendría relación con su efecto antioxidante impidiendo la oxidación lipídica.

Y en cuanto a su farmacocinética según un estudio de Nardini, del Instituto Nacional de Investigación Alimentaria y Nutrición de Roma. Los ácidos fenólicos libres en el plasma sufren una posible hidrólisis en el tracto gastrointestinal al ser absorbidos a este nivel.

2.4. EFEECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE

2.4.1 CONCEPTO: Se conoce como hipocolesterolemiante al efecto mediante el cual una sustancia es capaz de reducir la concentración sérica de colesterol en el organismo.

Según Cárdenas de la Peña se describe al colesterol como "Alcohol monohídrico constituyente de las grasas animales... cuyo depósito en las arterias provoca esclerosis".

Debido a esto las sustancias con dicho efecto son muy importantes, para evitar obstrucción arterial y paro cardiorespiratorio. **(Cárdenas de la Peña, 1996)**

Para lo cual necesitamos saber que es el colesterol y sus principales principios bioquímicos:

a) Colesterol

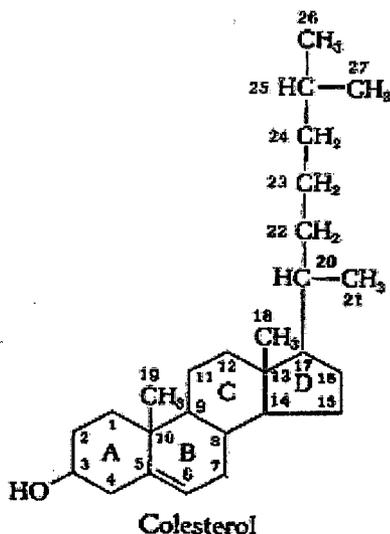


Fig. 1 fórmula química del colesterol (ciclopentanoperhidrofenantreno)

Fuente: Wikipedia

Química: El colesterol es miembro de una gran sub-grupo de esteroides llamados esterol. Es un alcohol esteroide que contiene un grupo hidroxilo en el carbono 3, del anillo A, y una cadena ramificada de 8 o más átomos de carbono en el carbono 17. Se encuentra en forma de alcohol libre o de un éster de ácido graso de cadena larga del grupo hidroxilo situado en el carbono 3.

Propiedades físicas: Es sólido a temperatura ambiente; el colesterol se funde a 150 °C, y es insoluble en agua pero se extrae fácilmente de los tejidos cloroformo, benceno, éter, o alcohol caliente. (Nelson David L., 2000)

Ubicación: El colesterol es un esteroide (lípidos) que se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados. Se presenta en altas concentraciones en el hígado, médula espinal, páncreas y cerebro.

En el hígado forma lo que consecuentemente en Patología se denomina “Hígado graso” así también en el corazón como “ateroma”, que se forman debajo de la capa íntima de las paredes de los vasos sanguíneos que han sufrido daño en su endotelio, el colesterol se infiltra y es rodeado por histiocitos que llegan a constituir un granuloma (ateroma amarillo), que en un intento de reparación evoluciona hacia la fibrosis (ateroma gris) y posteriormente puede sufrir calcificación (ateroma blanco), y al endurecerse estas se convierten en aterosclerosis, causante de problemas coronarios y cerebrales.(Trigo Tavera, 2002)

El nombre de «colesterol» procede del griego kole (bilis) y stereos (sólido), por haberse identificado por primera vez en los cálculos de la vesícula biliar por Michel Eugène Chevreul quien le dio el nombre de «colesterina», término que solamente se conservó en el alemán (Cholesterin). Abundan en las grasas de origen animal.

Metabolismo del colesterol

El colesterol es un compuesto más galardonado de toda la bioquímica, hasta la fecha se han concedido ya 13 premios Nobel a investigadores dedicados a estudiar su estructura y metabolismo.

El colesterol es el más importante de los esteroides. En el hombre adulto normal se encuentran en hígado, piel, cerebro y tejido nervioso, intestino y ciertas glándulas endocrinas, las suprarrenales, contienen 10% de colesterol para la biosíntesis de hormonas esteroideas. El contenido relativamente alto de colesterol en piel está relacionado con la formación de vitamina D.

La mayor parte del colesterol del organismo proviene de síntesis de novo (1 g/día) y sólo 0.3 g al día de la dieta.

Biosíntesis de colesterol

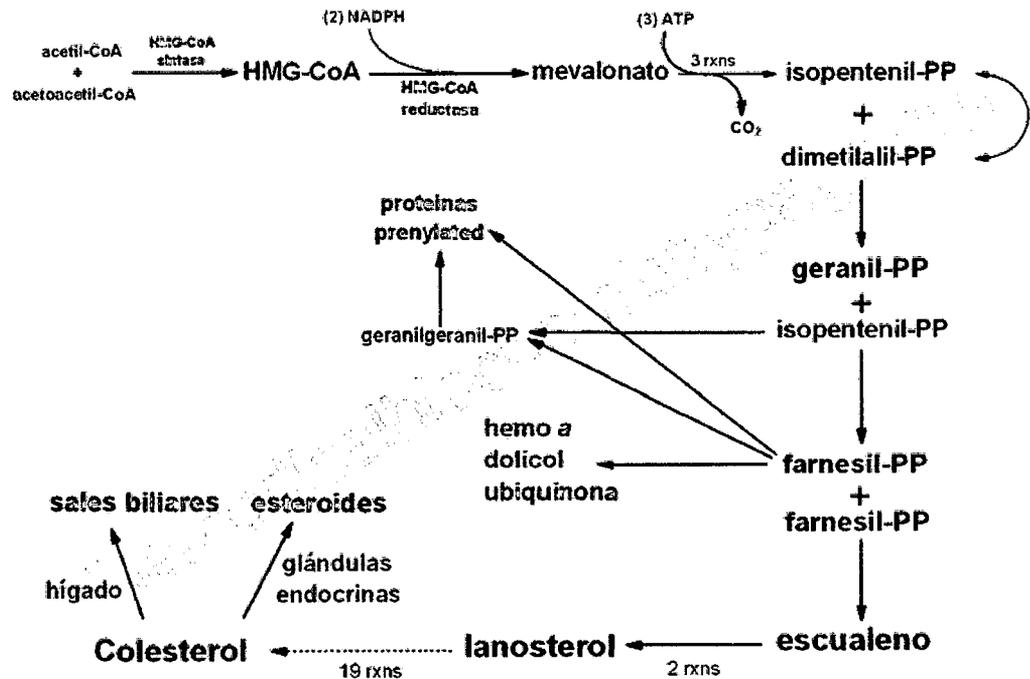


Fig. 2 Biosíntesis del colesterol

Fuente: Wikipedia

El colesterol se sintetiza a partir de acetilCoA por tejidos como el hígado, corteza suprarrenal, piel, intestino, testículo y aorta (1mg/g de tejido/10 años de vida).

La biosíntesis consta de varias etapas:

1. Síntesis de mevalonato (6C)
2. Pérdida de CO₂ para formar unidades isoprenoides (5C)
3. Condensación de 6 unidades isoprenoides para formar escualeno (30C).
4. Conversión de escualeno lineal en lanosterol (cíclico).
5. Transformación de lanosterol en colesterol (27C).

La enzima clave en la regulación de la biosíntesis de colesterol es la P-hidroxil-P-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa); la enzima

es inhibida por altas concentraciones de ácidos grasos saturados de cadena larga y colesterol.

Degradación del colesterol

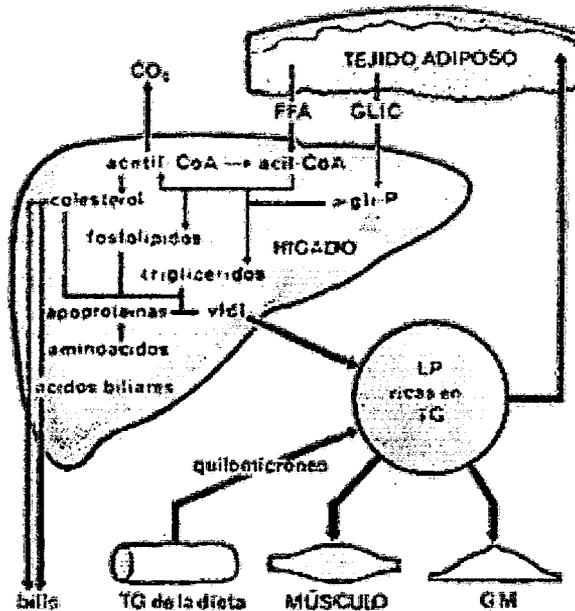


Fig. Degradación del colesterol

Fuente: Scielo: Revista médica de Chile

Debido a nuestra incapacidad para oxidar el colesterol hasta CO₂, el organismo humano sólo puede excretarlo en la bilis, ya sea en forma de ácidos biliares o como colesterol libre. Este último se convierte en coprostanol y es eliminado por heces. Los ácidos biliares contribuyen como emulsionantes a la digestión de grasas y en el proceso de absorción de grasas y vitaminas liposolubles.

Los ácidos biliares más comunes son el ácido cólico y quenodesoxicólico. Los ácidos cólicos y quenodesoxicólico se consideran primarios por sintetizarse directamente en el hígado a partir de colesterol. La enzima clave del proceso es la 7- α -hidroxilasa que es inhibida por los ácidos biliares y activada al incrementarse el colesterol de la dieta. El grupo carboxilo de estos ácidos se encuentra generalmente unido a glicina o taurina dando lugar a los ácidos

glicocólico, taurocólico, glicoquenodesoxicólico y tauroquenodesoxicólico. Cuando estos ácidos sufren modificaciones químicas por acción de las bacterias intestinales, se transforman en los ácidos biliares secundarios; desoxicólico y litocólico.

Como la cantidad de ácidos biliares sintetizados por el hígado es insuficiente para satisfacer las necesidades fisiológicas, éstos son reabsorbidos mediante un proceso activo dependiente de ATP y Na⁺ a nivel del íleo, y transportados de nuevo al hígado unidos a la albúmina. Este continuo reciclaje de ácidos biliares recibe el nombre de circulación enterohepática, a través de la cual regresan al hígado más del 95% de los ácidos biliares. La circulación enterohepática es muy activa, realiza de 4 a 12 ciclos al día. Los ácidos biliares no absorbidos son eliminados por heces y aunque el porcentaje es bajo (1-5%), constituye la vía principal de eliminación de colesterol por el organismo; la excreción en forma de hormonas esteroideas o sus derivados es de menor cuantía.

El colesterol sanguíneo puede disminuir consumiendo grasas con ácidos grasos poliinsaturados (cártamo, maíz, algodón), mientras los saturados lo aumentan (mantequilla, coco) probablemente los ácidos grasos poliinsaturados actúan:

- a) estimulando su excreción en intestino.
- b) estimulando su oxidación a sales biliares
- c) acelerando el metabolismo de esteres de colesterol
- d) cambiando la distribución en los tejidos

(Pacheco Leal, 2001)

y el resto por las células de Kupffer en el hígado y por los demás macrófagos del sistema retículoendotelial. Dado que las LDL transportan las dos terceras partes del colesterol circulante, estas partículas son las principales proveedoras de colesterol al hígado y a los demás tejidos del organismo.

La mayor parte de los esteres de colesterol de las LDL representan colesterol reciclado: el colesterol libre de las VLDL de origen hepático es transferido a las HDL para su esterificación por la LCAT (lecitina colesterol acil transferasa) y su transferencia en forma esterificada a las IDL por la PTEC (Proteína de transferencia de esteres de colesterol) las IDL a su vez, se degradan a LDL, entregando parte de su colesterol al hígado. El colesterol esterificado que se acumula en los tejidos extrahepáticos y en los macrófagos se hidroliza a colesterol libre por la colesterol hidrolasa, y el colesterol libre se secreta hacia los compartimientos intravasculares e intersticiales, donde se incorpora a las HDL que lo transportan al hígado después de su esterificación por la LCAT.

HDL colesterol

Las lipoproteínas de alta densidad han despertado gran interés, por la relación inversa que existe entre su concentración y el riesgo de desarrollar aterosclerosis y sus complicaciones, ya que no se lleva a cabo en un solo órgano, los componentes de las HDL son aportados por varios tejidos ó por las lipoproteínas circulantes.

Las HDL se constituyen principalmente por Apo A-I, fosfolípidos y colesterol. La Apo A- I sintetizada en el hígado e intestino, es secretada en asociación a las lipoproteínas ricas en TG (QM y VLDL). Durante la hidrólisis de los TG de estas lipoproteínas por la LPL ocurre un fenómeno de intercambio de componentes con las HDL. Los QM y VLDL ceden la Apo A- I a las HDL y reciben apoproteínas C II, C III y Apo E de las HDL. Los fosfolípidos y TG son transferidos al núcleo de

las HDL y los esteres de colesterol pasan a formar parte del núcleo de los remanentes de QM y VLDL. El paso de estas moléculas lipídicas, de carácter hidrofóbico entre las lipoproteínas mencionadas requiere de la proteína de transferencia de esteres de colesterol (PTEC). Esta proteína transportadora puede ser sintetizada y secretada por los macrófagos, que de esta manera facilitan el "transporte en reversa" del colesterol.

Las HDL, después de la asociación de la Apo A-I y los fosfolípidos, adquieren un aspecto discoide denominándose "HDL discoides o nacientes". En estrecha unión con estas HDL discoides, se encuentra la enzima LCAT, sintetizada y secretada por el hígado.

Los sustratos de la LCAT son la fosfatidilcolina y el colesterol libre, éste último llega a la membrana de las HDL discoides procedente de la membrana de las células o de otras lipoproteínas. La LCAT transforma el colesterol libre en esterificado, el donador del ácido graso es un fosfolípido: la fosfatidilcolina que, después de liberar un ácido graso, se transforma en 2-lisolecitina. El colesterol esterificado, por ser más hidrofóbico que el colesterol libre, se desplaza de la membrana al núcleo de las HDL discoides que en este proceso se transforman en HDL esféricas. Las HDL son partículas heterogéneas que se pueden separar en base a su densidad en HDL2 (menos densas) y HDL3 (más densas). De estas subclases de las HDL, la que guarda una relación inversa más clara con la morbi-mortalidad por aterosclerosis es la HDL2, mientras que HDL3 parece ser inerte como factor "protector vascular". Las subclases de HDL se pueden interconvertir, cuando la LPL es muy activa, las HDL3 reciben componentes superficiales de los QM y VLDL y de esta manera se transforman en HDL2.

Cuando estas últimas lipoproteínas reciben un exceso de TG se convierten en sustrato para la lipasa hepática que al hidrolizar estos TG

hacen que HDL2 se reconviertan en HDL3. El intercambio de componentes entre las HDL y las lipoproteínas ricas en triglicéridos se representa en la figura 7.18. El incremento de las HDL2 que ocurre en el acondicionamiento físico aeróbico se debe principalmente al aumento de la actividad de la LPL que simultáneamente aumenta la capacidad de depuración de los TG plasmáticos. (Gaw Allan, 2001)

Trigliceridos

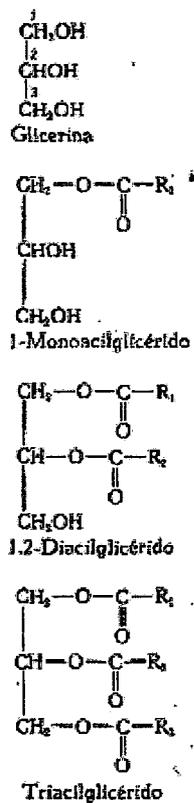


Fig. triacilglicéridos

Fuente: Wikipedia

Conocidos también como “Triacilglicéridos” “acilglicérido” o “glicéridos”, son ésteres de los ácidos grasos y del alcohol glicerina, se les designa, a veces como “grasas neutras”, término que ya es arcaico.

Cuando los tres grupos hidroxilo de la glicerina se hallan esterificados con ácidos grasos, la estructura se llama triacilglicérido. Los triacilglicéridos constituyen la familia más abundante de los lípidos y los principales componentes de los lípidos de depósito o de reserva de las células animales y vegetales. Son sólidos a temperatura ambiente, y se les conoce generalmente como “grasas” y los que son líquidos como “aceites”.

Aunque se han intentado numerosos intentos para descubrir las reglas fundamentales que determinan el modo de distribución de los diferentes ácidos grasos en los triacilglicéridos naturales, no puede formularse, todavía, generalizaciones simples y que lo abarquen todo. (Nelson David L., 2000)

c) Lipoproteínas y su relación con la aterogénesis

Las placas en las paredes arteriales de los pacientes con aterosclerosis contienen grandes cantidades de colesterol. Mientras mayor sea la concentración del colesterol LDL, mayor será el riesgo de cardiopatía aterosclerótica; a la inversa, mientras mayor sea la concentración del colesterol HDL, menor es el riesgo de cardiopatía coronaria. Esto es cierto tanto para el varón como para la mujer en distintos grupos raciales, étnicos y en todas las edades hasta los 75 años. Como la mayor parte del colesterol en el suero es LDL, las altas concentraciones del colesterol total también se relacionan con un aumento en el riesgo de coronariopatía.

Los varones de edad madura cuyos valores de colesterol sérico se encuentran en el quintil más alto para la edad (por encima de casi 230 mg/ dl) tienen un riesgo de muerte por enfermedad coronaria antes de los 65 años de edad es menos común en mujeres, con riesgos equivalentes casi de la tercera parte de los del varón. En el varón cada incremento de 10 mg/dl en colesterol (o colesterol LDL) aumenta el riesgo de coronariopatía en casi 10%, cada aumento de 5mg/dl de HDL

colesterol lo reduce más o menos en un 10%. El efecto del HDL es mayor en mujeres, mientras que los del colesterol total y de LDL son menores. Todas estas relaciones tienden a reducir con la edad. **(Tierney Lawrence, 2006)**

En definitiva según el estudio de Framingham; entre los factores de riesgo cardiaco se encuentra junto con la Diabetes mellitus y la hipertensión, la Hipercolesterolemia, causante de la aterosclerosis, cuyo riesgo aumenta progresivamente con el aumento del LDL colesterol, como ya se había mencionado anteriormente. **(Runge Marshall S., 2004) (Mc.Phee Stephen, 2010)**

Sin embargo los valores elevados de colesterol y triglicéridos pueden disminuir o ser prevenidos gracias a una dieta sana, deporte o tratamiento farmacológico/ medicina tradicional, en especial los dos primeros. Según el Manual Oxford de Medicina Deportiva el deporte, reduce los riesgos de una enfermedad coronaria disminuyendo la hipertensión arterial tanto sistólica como diastólica, y sobre todo incrementando el HDL colesterol sérico, disminuyendo los triglicéridos y la grasa corporal. **(Sherry Eugene, 1998)**

d) Valores normales del colesterol

Colesterol total	< 200 mg/dl (deseable) 200 – 239 mg/dl (ligeramente elevado) ≥ 240 mg/dl (muy elevado)
HDL colesterol	≥ 60 mg/dl (bueno a elevado) < 40 mg/dl (muy bajo)
LDL colesterol	< 100 mg/dl (óptimo) 100 – 129 mg/dl (normal)

130 – 159 mg/dl (ligeramente elevado)

160-189 mg/dl (elevado)

≥ 190 mg/dl (muy elevado)

(Wallach Jacques, 2009)

Valores Normales de colesterol total en ratas.

Según la Dra. Nieves Salvador Cabos de la Unidad de Producción Animal del Instituto Santiago Ramón y Cajal, CSIC, de Madrid los valores normales de colesterol total en ratas albinas es entre 10 y 54 mg/dl de sangre.

(Salvador Cabos, 2000)

2.4.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE CON CORRECCIÓN DE LA DOSIS.

El protocolo de experimentación se basa en el estudio de una tesis de maestría a cargo del Doctor Arroyo del Instituto Nacional de Salud.

Mediante la cual se utilizó extracto hidroalcohólico de maíz morado (*Zea mays*) atomizado para la determinación de su efecto antioxidante e hipocolesterolemia, para lo que se utilizó una dosis de colesterol puro desde 62.5 g/Kg de peso en ratas albinas para inducir un efecto hipercolesterolemia, y después con la ayuda del extracto a experimentar reducir la colesterolemia, todo ello se mide con kits de colesterol total (Pruebas Bioquímicas) y análisis histopatológico.

2.5 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

La necesidad de control en el uso de sustancias químicas, requiere que cada sustancia química de síntesis a la cual el hombre, está expuesto, sea homologada. La legislación de varios países ha establecido reglamentaciones

que toman en cuenta, entre otros elementos, el potencial tóxico de estas sustancias. (Gisbert J., 1999)

Esta situación ha determinado el desarrollo de una rama de la toxicología moderna conocida como toxicología de reglamentación, que cuida de los aspectos científicos y técnicos de las pruebas toxicológicas necesarias para llevar a cabo una valoración toxicológica.

El número y tipo de pruebas toxicológicas para fines de homologación varía de país a país. Sin embargo las organizaciones internacionales como por ejemplo, la OMS, FAO, y la OECD han desarrollado protocolos toxicológicos con el objetivo de auxiliar el proceso de armonización internacional en este campo. (G. Vettorazzi, 2007)

2.5.1 ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA

En el caso de una sustancia desconocida las investigaciones se comienzan generalmente con ensayo de toxicidad aguda. Estos ensayos tienen por objeto obtener datos sobre los efectos producidos en el animal después de una única exposición del material de ensayo. De la relación entre dosis y mortalidad se puede calcular estadísticamente la así llamada Dosis letal 50% (DL₅₀). Tal dosis calculada proporciona, entre otros, un medio aproximativo para calcular la toxicidad aguda de diferentes sustancias.

Es necesario notar que la determinación de una DL₅₀, es un valor muy limitado, la observación detallada de los síntomas que conducen a la muerte es mucho más importante que la fórmula tradicional para la determinación de la toxicidad aguda en términos estadísticos. (G. Vettorazzi, 2007)

2.5.1.1 Método hacia arriba y abajo (UP - DOWN)

Mediante la cual se administra la dosis a un solo animal, un solo sexo por dosis, sino hay muerte se pasa a la dosis siguiente, si dos dosis sucesivas son letales entonces cuatro animales se prueban en una de esas dosis, utilizando 2000 mg/kg de dosis máxima).

En el caso en que la sustancia a evaluar se administrada por vía oral, para el caso de los roedores el volumen a administrar no debe exceder de 1 ml por 100 g de peso vivo para no acuosos, en el caso de los acuosos es de 2 ml por 100 g de peso vivo. Se recomienda que los animales sean observados por un período de 14 días lo cual no debe de ser tan rígido ya que puede estar dado por las reacciones tóxicas y el ritmo de recuperación. El tiempo al cual aparecen, su duración y el tiempo de muerte son datos importantes. (**Organisation for Economic Co-operation and Development**)

La dosis letal media siempre se debe considerar en conjunción con los efectos tóxicos observados clasificado como toxicidad evidente y los hallazgos patológicos. Los síntomas más comunes son pérdida de peso, náuseas, salivación, distensión abdominal, pérdida de equilibrio, dificultades respiratorias, convulsiones y postración.

2.6 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

2.6.1 RATA (*Ratus norvegicus*): Las ratas comenzaron a utilizarse a mediados del siglo XIX, proceden de la rata noruega *Rattus norvegicus*. De la raza salvaje se derivaron 2 poblaciones:

- Rata Long evans: pelo negro en cabeza y cuello, resto del cuerpo de color blanco.

- Ratas albinas: Sprague-Dawley (Madison USA), ratas más largas con cabeza más estrecha y cola más larga que el cuerpo y Wistar (Filadelfia USA), ratas con orejas más grandes, cabeza más ancha y cola de menor longitud que su cuerpo.

En la actualidad existen más de 50 cepas no consanguíneas y más de 400 cepas consanguíneas definidas genéticamente. Se utilizan sobre todo en medicina, nutrición, toxicología, estudios del sistema nervioso y conducta animal. (Salvador Cabos, 2000)

Peculiaridades anatómicas y fisiológicas

La anatomía y la fisiología de la rata y el ratón son similares. Tienen poca vista, de hecho es difícil saber si son ciegas o no. Presentan un hígado pentalobulado, pero a diferencia del ratón, carecen de vesícula biliar. Las glándulas suprarrenales están más alejadas de los grandes vasos, la adrenalectomía es menos arriesgada en esta especie. Las nefronas de la corteza renal son fácilmente accesibles. No pueden regurgitar ni vomitar por lo que son muy sensibles a los tóxicos. Como los ratones comen de forma semicontinua, aunque en condiciones ad libitum comen principalmente durante el período de oscuridad.

Las glándulas de Harder, situadas detrás del globo ocular, producen una secreción rica en porfirinas de color marrón rojizo que lubrica al ojo. Si disminuye el bienestar animal en estos animales (por ejemplo estrés) se observan lágrimas rojizas alrededor de los ojos y la nariz, que al secarse parecen sangre. Esta secreción es fluorescente bajo luz UV, pudiendo diferenciarse de la sangre verdadera asociada a otros procesos patológicos (por ejemplo, neumonía sanguinolenta).

El manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo a la Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la protección de

los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (86/609/CEE), descrita en el **ANEXO 06**.

2.7 MARCO CONCEPTUAL

ANOVA: (Análisis de varianza) es un nombre genérico y se usa para una variedad inmensa de modelos de comparación de medias, también conocido como diseño de experimentos. (Azimonti Renzo, 2000)

ATEROMA: Degeneración de las paredes arteriales provocada por la formación en las mismas de las placas grasas y tejido cicatricial. El ateroma limita la circulación sanguínea y predispone a la trombosis. Es corriente en los adultos de los países occidentales. Sus principales causas son una dieta rica en grasa animales (elevado índice de colesterol) y el azúcar refinado, el tabaco, la obesidad y la inactividad. (Ruiz Lara, 1992).

ARTERIOSCLEROSIS: La enfermedad vascular que afecta al cerebro, corazón, riñones, otros órganos vitales y extremidades es la causa principal de la morbilidad y mortalidad en Estados Unidos y en la mayoría de los países occidentales. (Mark H. Beers, M.D, 1999)

ATEROSCLEROSIS: Enfermedad de las arterias en las que se desarrollan placas grasas en su pared interna con la eventual obstrucción de la corriente sanguínea. (Ruiz Lara, 1992).

COLESTEROL: Sustancia grasa (esterol) presente en la sangre y en muchos tejidos, sobre todo en el sistema nervioso. El colesterol y sus esteres son componentes importantes de las membranas celulares y los precursores de diversas hormonas esteroideas y sales biliares (Ruiz Lara, 1992).

DOSIFICACION: Determinación y regulación del tamaño, frecuencia y número de dosis. (Dorland, 1998)

DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀): Es la dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca muerte del 50 % de

los animales a los que se haya administrado. El valor de la DL50 se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (miligramos por kilogramo). (R. Díaz, 2002)

ENSAYO CLINICO: El ensayo clínico es parte del subgrupo de los estudios clínicos orientados hacia el paciente. De ese modo, el ensayo clínico puede ser definido como un estudio de investigación en el área biomédica, de tipo prospectivo, con sujetos humanos, o un estudio del comportamiento, que está diseñado para responder preguntas específicas acerca de intervenciones biomédicas o del comportamiento (medicamentos, tratamientos, aparatos). (Tealdi Juan Carlos, 2008)

EXTRACTO SECO: Concentrado de droga vegetal producto de una extracción con un disolvente (Dorland, 1998)

FITOTERAPIA: Medicina alternativa (v.) que pretende la curación de las enfermedades exclusivamente por medio de las plantas. Se encuentra muy ligada a la mentalidad contemporánea de rechazo a lo tecnificado o lo artificial. (Villar Rodriguez Celia, 2000)

LIPOMA: Masa de tejido adiposo maduro. (Milikowsky Clara, 2001)

METABOLITO SECUNDARIO: Se denomina así a los productos intermedios del metabolismo de la planta también denominados constituyentes químicos. (Ciria Valencia O., 2005)

MORTALIDAD: Porcentaje de defunciones. (Lexus, 1999)

NUTRICION: Es la acción y efecto de nutrir, del latín *nutrire* que, en el lenguaje común, es sinónimo de alimentar, llenar, restaurar, sustentar, criar, cebar y, en forma figurada, de acrecentar o fortalecer. (Tealdi Juan Carlos, 2008)

TOXICIDAD: Calidad de un tóxico que afecta al organismo. (Anguiano Rueda C., 1992)

CAPITULO III
MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

▪ **Muestra Vegetal:**

Hojas y tallos de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) que se recolectó cerca al complejo arqueológico de Sacsayhuaman entre 3467 – 3489 m.s.n.m. (13° 30' 61" según GPS) perteneciente a la Provincia y Departamento del Cusco.

▪ **Animales de experimentación:**

Para la determinación del efecto hipocolesterolemizante y de la toxicidad aguda se utilizaron ratas albinas certificadas por el Instituto Nacional de Salud. (ANEXO 02)

3.1.2 CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION:

	CRITERIOS DE INCLUSION	CRITERIOS DE EXCLUSION
DE LA ESPECIE VEGETAL	Se incluyen solo las partes aéreas (tallos y hojas) de la planta	Se excluyen las raíces y las flores, además de aquellas que se encuentren en mal estado, es decir descompuestas.
DEL EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE	Ratas. Se incluyen ratas albinas jóvenes, cepa Holtzmann con un peso determinado (180 +/- 20 gramos), en buen estado de salud y con previa certificación	Ratas. Se excluirán las ratas albinas de otra cepa, y también las enfermas, así como las que no cumplan con los criterios de peso establecidos.

<p>DE LA TOXICIDAD AGUDA (METODO UP-DOWN)</p>	<p>Ratas. Se incluyen ratas albinas jóvenes hembras, cepa Holtzmann con un peso determinado, en buen estado de salud y con previa certificación</p>	<p>Ratas. Se excluirán las ratas albinas machos, de otra cepa, y también las enfermas, así como las que no cumplan con los criterios de peso establecidos.</p>
--	--	---

3.1.3 MATERIAL E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO:

3.1.3.1 Materiales de Campo

Recolección de muestra

- ❖ Cuchillo
- ❖ Pico
- ❖ Cámara fotográfica digital.
- ❖ Altimetro.
- ❖ Plumones de tinta indeleble.
- ❖ Bolsas plásticas.
- ❖ Cuaderno de apuntes.
- ❖ Lápiz.
- ❖ Wincha.

3.1.3.2 Materiales de Laboratorio.

3.1.3.2.1 Material de Vidrio

- ❖ Embudo de vidrio.
- ❖ Matraz Erlenmeyer 200 ml.
- ❖ Frascos ámbar.
- ❖ Tubos de ensayo de 9 ml.
- ❖ Tubos de ensayo de 15 ml.
- ❖ Probetas de 100 ml.
- ❖ Probetas de 50 ml.

- ❖ Baguetas.
- ❖ Micropipetas.
- ❖ Vasos de precipitados.

3.1.3.2.2 Equipos:

- ❖ Balanza analítica de precisión 0.001 gramos.
- ❖ Estufa de incubación.
- ❖ Baño María.
- ❖ Termómetros.
- ❖ Autoclave.
- ❖ Refrigeradora.
- ❖ Mechero Bunsen.
- ❖ Espectrofotómetro

3.1.3.2.3 Otros materiales:

- ❖ Papel filtro.
- ❖ Gasa.
- ❖ Algodón hidrófilo.
- ❖ Pinza metálica.
- ❖ Pinzas de sujeción.
- ❖ Plumón de tinta indeleble.
- ❖ Bisturí.
- ❖ Tijera.
- ❖ Papel aluminio.
- ❖ Papel Kraft.
- ❖ Cuerda de algodón.
- ❖ Gradillas.

3.1.3.3 Reactivos:

- ❖ Alcohol etílico de 96°.
- ❖ Agua destilada.
- ❖ Colesterol puro (QUIMICA TORRES).

3.1.3.4 Reactivos para la Identificación de Metabolitos Secundarios

- ❖ Reactivo de Dragendorf.
- ❖ Reactivo de Wagner.
- ❖ Reactivo de Mayer.
- ❖ Acetato de plomo
- ❖ Hidróxido de Sodio 1%, 5%.
- ❖ Limaduras de Magnesio.
- ❖ Acido Clorhídrico 1%, 5%.
- ❖ Reactivo de Benedict.
- ❖ Reactivo de Lieberman - Burchard.
- ❖ Ninhidrina 1%.
- ❖ Cloruro Férrico.

3.2 METODOLOGIA:

3.2.1 NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACION:

El objetivo de la presente investigación es determinar el efecto hipocolesterolemiante “in vivo” del extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* “Huir huir” en ratas albinas, así como su toxicidad aguda, por lo que el presente trabajo presenta un diseño **cuasiexperimental** con dos controles y tres grupos experimentales, con **postprueba**, debido a que no se aleatorizaron los animales de experimentación y por lo tanto no se controlaron las variables y es de tipo **correlacional** que por concepto indica que esta designación mide dos o más variables para analizar su correlación, y en la

tesis se relaciona la dosis del extracto hidroalcohólico con su efecto hipocolesterolemiante además de su toxicidad aguda. (Villena Magaly, 2009)

3.2.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACION.

3.2.2.1 Para la determinación efecto hipocolesterolemiante “*in Vivo*” del extracto seco hidroalcohólico de la especie *Achyrocline alata* “Huir huir” en ratas albinas.

G1	X1	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3
G4	X4	O4
G5	X5	O5

Donde:

Gn: Grupo de ratas albinas; n = 1 – 5, (06 ratas por grupo)

G1: Grupo blanco.

G2: Grupo control con inducción a hipercolesterolemia (Goma de tragacanto al 2% + 62.5 mg/Kg de colesterol)

G3 - 5: Grupos sometidos a diferentes dosis de extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* “Huir huir”, con inducción de hipercolesterolemia. (Goma de tragacanto al 2% + 62.5 mg/Kg de colesterol)

X3 – 5: Variabilidad de dosis de extracto seco (100, 250 y 500 mg/Kg respectivamente) (Basado en estudios fitoquímicos de Alcachofa, *Cynara scolymus*)

O1 – 5: Observaciones por grupo.

CALCULO DE DOSIS

X1: Agua destilada (No se le indujo hipercolesterolemia)

X2: Agua destilada (se le indujo hipercolesterolemia)

X3: Agua destilada + 100 mg/Kg de extracto seco hidroalcohólico.

X4: Agua destilada + 250 mg/Kg de extracto seco hidroalcohólico.

X5: Agua destilada + 500 mg/Kg de extracto seco hidroalcohólico.

3.2.2.2 Para determinar la toxicidad aguda por el método UP DOWN de del extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* “Huirá huirá” en ratas albinas hembras.

G1	X1	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3
G4	X4	O4
G5	X5	O5

Donde:

Gn: Grupo de ratas albinas; n = 1 – 5, (01 rata por grupo)

G1: grupo control

G2 - 5: Grupo sometido a diferentes dosis de extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* “Huirá huirá”.

X1 – 5: Variabilidad de dosis (De acuerdo al **ANEXO 05**)

O1 – 5: Observaciones por grupo

Determinación de la dosis.

De acuerdo a los antecedentes de estudio de toxicidad de especies del género *Achyrocline* se eligió como dosis límite 2000 mg/kg para probarlo en tres animales de experimentación. (**Acute Oral Toxicity (OECD) – TG. 425, 2008**)

G1: 2000 mg/kg + agua destilada

G2: 2000 mg/kg + agua destilada

G3: 2000 mg/kg + agua destilada

3.3 VARIABLES:

3.3.1 Del efecto hipocolesterolemiante del extracto seco hidroalcohólico de la especie *Achyrocline alata* "Huiru huiru"

VARIABLES INDEPENDIENTES							
VARIABLE	DEFINICION	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESION FINAL
Extracto seco hidroalcohólico de <i>Achyrocline alata</i>	Cantidad de extracto seco hidroalcohólico por kilogramo de peso. (Dorland, 1998)	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Balanza	Se mide la cantidad de extracto seco hidroalcohólico de acuerdo al peso del animal de experimentación	gr/Kg

VARIABLES DEPENDIENTES							
VARIABLE	DEFINICION	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESION FINAL
Efecto hipocolesterolemiante	Disminución del colesterol total en sangre. (Ruiz Lara, 1992)	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Espectrofotómetro	Se toma el suero como muestra y después de un proceso bioquímico - enzimático se miden las absorbancias en el instrumento	gr/dl

3.3.2 De la Toxicidad Aguda del extracto seco hidroalcohólico de la especie *Achyrocline alata* "Huirá huirá" en ratas albinas

VARIABLES INDEPENDIENTES							
VARIABLE	DEFINICION	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESION FINAL
Extracto seco hidroalcohólico de <i>Achyrocline alata</i>	Cantidad de extracto seco hidroalcohólico por kilogramo de peso. (Dorland, 1998)	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Balanza	Se mide la cantidad de extracto seco hidroalcohólico de acuerdo al peso del animal de experimentación.	gr/Kg

VARIABLES DEPENDIENTES							
VARIABLE	DEFINICION	NATURALEZA	MEDICION	ESCALA	INSTRUMENTO	PROCEDIMIENTO DE MEDICION	EXPRESION FINAL
Toxicidad aguda	Medida usada para medir el grado tóxico o venenoso de algunos elementos. (Anguiano Rueda C., 1992)	Cualitativa	Directa	Nominal	Observación	Se observa el número de animales muertos a una dosis administrada de extracto seco hidroalcohólico.	Tóxico - no toxico

3.4 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS.

3.4.1 INSTRUMENTOS

FICHAS DE REGISTRO: Durante el proceso de análisis cuantitativo (Método enzimático-colorimétrico) de Colesterol total, LDL Y HDL colesterol y Triglicéridos del extracto seco hidroalcohólico al 50%, se utilizaron fichas de registro para la recolección de dichos datos. (Anexo 04)

También se utilizaron las fichas de registro, en los análisis preliminares tanto de solubilidad, composición fitoquímica cualitativa, análisis de histopatológico de las muestras de hígado y corazón, etc.

3.4.2 TECNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LA INFORMACION

Los datos obtenidos mediante el análisis cuantitativo (Método enzimático-colorimétrico) de Colesterol total, LDL Y HDL colesterol y Triglicéridos del extracto seco hidroalcohólico al 50%, se procesaron mediante el paquete estadístico SPSS 19.0 (Statistical Package for social Science) con la ayuda de un profesional estadista.

3.5 PRUEBAS PRELIMINARES:

3.5.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL:

- **Recolección de la planta:** La especie *Achyrocline alata* se recolectó en el complejo arqueológico de Sacsayhuaman entre los 3467 y 3489 m.s.n.m. dentro del Departamento del Cusco, a partir del mes de Diciembre del año 2010. El peso de la muestra recolectada fué aproximadamente de 10 kilos.

- **Selección:** Se seleccionaron las partes aéreas de la planta a excepción de las flores, y se eliminaron las plantas en mal estado.
- **Secado:** Las plantas seleccionadas se colocaron en un ambiente seco, y con buena ventilación, bajo sombra, por un espacio de 40 días.
- **Molienda:** la molienda se realizó con un molino de granos evitando en lo mayor posible la fricción excesiva, limpiando y desinfectando el equipo, la muestra molida se recolectó en frascos de vidrio color ámbar estériles cerrados y rotulados.

3.5.2 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

La determinación de la Humedad se realizó por triplicado, en placas petri secas con muestra fresca trozada, previamente pesada, en estufa a 40°C hasta lograr peso constante.

Después se determinó el porcentaje de humedad mediante la siguiente relación (Villar del Fresno, 1999)

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

Donde: % H = Porcentaje de humedad

M1 = Peso de muestra fresca

M2 = Peso de muestra seca

3.5.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO Y PORCENTAJE DE RENDIMIENTO:

La extracción se realizó en medio hidroalcohólico al 50%, para la cual se utilizó la planta seca y molida, y se sometió a un tipo de maceración por agotamiento de metabolitos.

El porcentaje de extracción de la muestra se calcula de la siguiente manera:

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

Tiempo de maceración: El tiempo de maceración recomendado es entre 8 a 15 días, por lo cual se procedió a dicha maceración por dicho tiempo en alcohol etílico al 50 %. Después se realizó el proceso de filtración y evaporación en baño maría a 37 °C, obteniéndose así la muestra lista para su respectivo análisis preliminar.

3.5.4 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD:

Para la realización de las pruebas de solubilidad, el extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* "Huirá huirá" se colocaron en diferentes tubos de ensayo y luego se añadieron solventes de diferente grado de polaridad, ordenados en forma descendente, para así determinar la disolución de los extractos.

SOLVENTES	
Agua destilada	Acetona
Metanol	Eter etílico
Etanol al 70%	Benceno
Etanol al 90%	Hexano
Acetato de etilo	

Fuente: Elaboración propia basada en la bibliografía recopilada (Dominguez, 1979)

3.5.5 ANÁLISIS FITOQUÍMICO:

Para determinar la presencia o ausencia de metabolitos se procedió a un proceso de análisis fitoquímico cualitativo de la siguiente forma:

METABOLITO SECUNDARIO	REACTIVO
Aminoácidos	Ninhidrina
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico
Alcaloides	Dragendorff, Mayer y Wagner
Saponinas	Acido sulfúrico
Taninos	Gelatina-sal, Acetato de Plomo
Triterpenoides	Liebermann-Burchard
Quinonas	Borntrager
Esteroides	Borntrager
Azucares reductores	Benedict
Glucósidos	Benedict
Flavonoides	Shinoda, amoniaco

Fuente: Elaboración propia basada en bibliografía recopilada. (Dominguez, 1979)

3.5.6 DEL EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE

En dicho ensayo se utilizaron métodos bioquímicos para su medición dentro de 60 días, una vez iniciado el modelo experimental.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La prueba experimental inició con la inducción de la hipercolesterolemia, pudiendo ser iniciada junto con la administración del extracto seco, o 30 días antes. Para el protocolo se utilizaron 05 grupos de seis animales, uno de control y otro blanco, y los otros tres con dosis ascendentes.

Animales de laboratorio

Se utilizaron ratas albinas con un peso aproximado de +/- 200 gramos, las cuales se tuvieron en el laboratorio 5 días antes de iniciar el proceso experimental para su adaptación.

Observaciones

Se procedió, al final del proceso, a establecer el análisis bioquímico de colesterol total y triglicéridos correspondiente, además de una evaluación histopatológica del corazón en busca de ateromas por parte de un profesional especialista.

3.5.7 DE LA TOXICIDAD AGUDA

En los ensayos de toxicidad aguda se determinó la sintomatología del animal de experimentación por la administración a una dosis del extracto, y el grado de letalidad que esta tiene.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Toxicidad aguda por el método Up Down

La prueba principal consistió en la elección de la dosis límite (2000 mg/Kg) la cual se administró por vía oral y se observaron a los animales por 24 horas y después se completaron en observación por 14 días.

Animales de laboratorio

Se utilizaron ratas albinas hembras cepa holtzman. Esto en base a que las encuestas de la literatura de los ensayos convencionales de DL50 muestran que por lo general hay poca diferencia de sensibilidad entre sexos, pero en aquellos casos donde se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles. Se utilizaron 03 ratas hembra en total.

Dosis

La dosis elegida por antecedentes bibliográficos del genero Achyrocline, fue la dosis límite de 2000 mg/Kg.

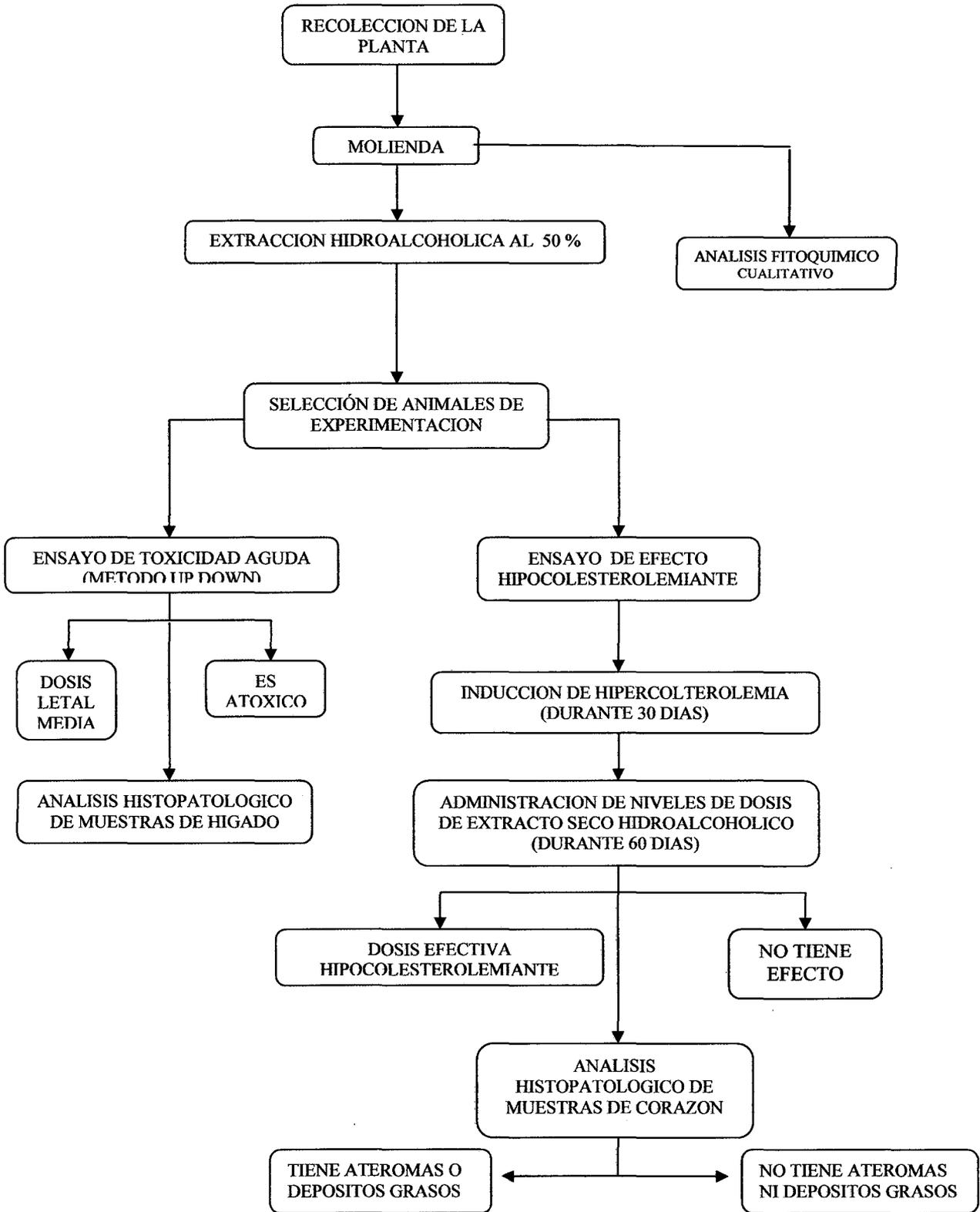
Observaciones

Los animales fueron observados de forma individual al menos una vez durante los primeros 30 minutos después de la administración, periódicamente durante las primeras 24 horas (con especial atención durante las 4 primeras horas, a partir de entonces, para un total de 14 días. Se observaron minuciosamente cualquier indicio de cambio en su comportamiento.

El peso de cada animal se determinó poco antes de que la sustancia de ensayo sea administrada y de allí se pesaron cada 07 días. Los cambios de peso se calcularon y registraron. En la parte final de la prueba, los animales supervivientes se pesaron y sacrificaron de forma humanitaria, y se extrajeron muestras de Hígado para su posterior análisis histopatológico.

(OECD – Acute Oral Toxicity – TG. 425, 2008).

FLUJOGRAMA DE LOS PROCESOS DE LA INVESTIGACION



CAPITULO IV
RESULTADOS, ANALISIS Y DISCUSION

CUADRO 01

Determinación del Porcentaje de Humedad en muestra de *Achyrocline alata*

ESPECIE VEGETAL	<i>Achyrocline alata</i> (Huiru huiru)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Peso De Muestra Fresca (g)	37.0	52.0	54.0
Peso de muestra seca (g)	16.5	24.3	23.1
Porcentaje De Humedad (%)	56.7	53.3	57.4
Promedio % De Humedad	55.8%		

Fuente: Datos experimentales

CUADRO 02

Determinación del Porcentaje de Rendimiento en muestra de *Achyrocline alata*

	Ext. Hidroalcohólico
Peso inicial de muestra molida (g)	100 gr
Peso final del extracto seco (g)	16.2 gr
Porcentaje de extracción (%)	16.2%

Fuente: Datos experimentales

CUADRO 03

Pruebas de Solubilidad en el extracto seco hidroalcohólico al 50% de
Achyrocline alata

Solventes	Extracto Hidroalcohólico
Agua destilada	+++-
Metanol	+++-
Etanol 70%	++++
Etanol 90 %	++++

Acetato de etilo	+---
Acetona	----
Éter etílico	+---
Benceno	----
Hexano	----

Leyenda: ++++ : Totalmente soluble.
 +++- : Parcialmente soluble.
 ++- : Poco soluble.
 + --- : Muy poco soluble.
 --- : Insoluble.

Fuente: Datos Experimentales

CUADRO 04
Análisis Fitoquímico Cualitativo del extracto seco hidroalcohólico al 50% de
Achyrocline alata

Metabolito secundario	Reactivo	Extracto Hidroalcohólico
Azucares Reductores y Glucósidos	Benedict	+--
Aminoácidos	Ninhidrina	---
Comp. Fenólicos	Cloruro férrico	+++
Flavonoides	Shinoda Amoniaco	+++
Taninos	Gelatina-sal	---
Alcaloides	Dragendorff Mayer	---
Saponinas	Afrosimétrico	---
Triterpenoides y Esteroides	Liberman- Burchard	+--
Antraquinonas- Naftoquinonas	Borntrager	+--

Leyenda: +++ : Abundante cantidad
 ++- : Moderada cantidad
 + - - : Escasa cantidad
 - - - : Ausencia

Fuente: Datos experimentales

ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

En el CUADRO 01, para determinar el porcentaje de humedad se utilizaron tres muestras de las partes aéreas de *Achyrocline alata* "Huirá Huirá" obteniéndose como resultado 56.7%, 53.3% y 57.4 % respectivamente que en promedio da un resultado de 55.8% lo cual concuerda con la zona de recolección, es decir en este caso esta es una especie que se desarrolla en suelos áridos (poco húmedos) según lo planteado por Jorge Hugo Femenía, ya que esto implica que el suelo de la zona de recolección debe estar acorde al desarrollo y hábitat de la especie vegetal.

La determinación del contenido de humedad residual es uno de los parámetros más importantes que se ensayan debido a que un adecuado proceso de secado asegura la estabilidad y la no-afectación de los principios activos que contiene la droga. (Huerta Daniel, 2010).

En el CUADRO 02 se puede observar el porcentaje de rendimiento: 16.2%, el cual es importante para la industria si se desean extraer metabolitos de utilidad farmacéutica, en esta caso lograr una buena concentración de ácidos fenólicos, ya que según Petenatti en su estudio "MEDICAMENTOS HERBARIOS EN EL CENTRO-OESTE ARGENTINO. "MARCELAS" Y "VIRA-VIRAS" EN MUESTRAS COMERCIALES" el género *Achyrocline* es utilizado como parte de la farmacopea naturista de su región, esto debido a que los extractos en general son necesarios como parte de la purificación para llegar a un producto medicamentoso.

En la determinación de solubilidad del extracto hidroalcohólico de *Achyrocline alata* (Huirá Huirá) presente en el CUADRO 03, nos demuestra que el extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyrocline alata*, es totalmente soluble en los solventes de etanol al 70% y al 90%, y parcialmente soluble en metanol y agua destilada, esto coincide con el tipo de extracción (Hidroalcohólica) y la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides solubles en etanol-agua, tal como lo demuestra un estudio realizado en la Universidad de Brasilia, en la tesis intitulada "Estudio químico y potencial antioxidante de especies vegetales utilizadas en la medicina popular de Matto

Grosso de Sul – *Achyrocline alata* (Kunth) DC y *Achyrocline saturoides* (LAM) DC - Asteraceae”.

Al observar el Análisis fitoquímico cualitativo del extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyrocline alata* (Huiru Huiru) se observa que este presenta abundante cantidad de flavonoides y ácidos fenólicos (ácidos cafeil-quínicos) y escasa cantidad de esteroides, azúcares reductores y antraquinonas, lo cual indica la tesis “Estudio químico y potencial antioxidante de especies vegetales utilizadas en la medicina popular de Matto grosso do sul – *Achyrocline alata* (kunth) DC y *Achyrocline saturoides* (LAM) DC - ASTERACEAE” de Eafaela Grassi Zampieron, además; los solventes hidroalcohólicos son efectivos para extraer ácidos fenólicos y flavonoides como indican estudios realizado en *Medicago sativa* (alfalfa) y en *Pinnus sp.* (Pino).

CUADRO 05

Determinación de Colesterol total (mg/dl) en muestras de suero de ratas albinas mediante el método enzimático – colorimétrico.

Grupos de Ratas	Rata 01	Rata 02	Rata 03	Rata 04	Rata 05	Rata 06
Control positivo	65.4	70.3	73.3	62.3	75.4	66.6
Control negativo	56.4	57.2	67.6	54.8	53.2	56.8
100 mg/Kg	64.9	67.5	61.9	60.2	74.2	66.2
250 mg/Kg	60.5	56.7	57.9	60.6	61.9	61.5
500 mg/Kg	74.5	58.6	69.1	64.9	63.5	66.1

Fuente: datos experimentales

Análisis estadístico descriptivo según el paquete estadístico SPSS 19.

GRUPO	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Pos.	6	68,8900	4,98973	2,03705	63,6536	74,1264	62,30	75,40
Neg.	6	57,6667	5,08750	2,07696	52,3277	63,0057	53,20	67,60
100	6	65,8167	4,91911	2,00822	60,6544	70,9790	60,20	74,20
250	6	59,8500	2,08014	,84922	57,6670	62,0330	56,70	61,90
500	6	66,1250	5,36673	2,19096	60,4930	71,7570	58,60	74,50
Total	30	63,6697	6,07887	1,10985	61,3998	65,9396	53,20	75,40

Fuente: Datos estadísticos

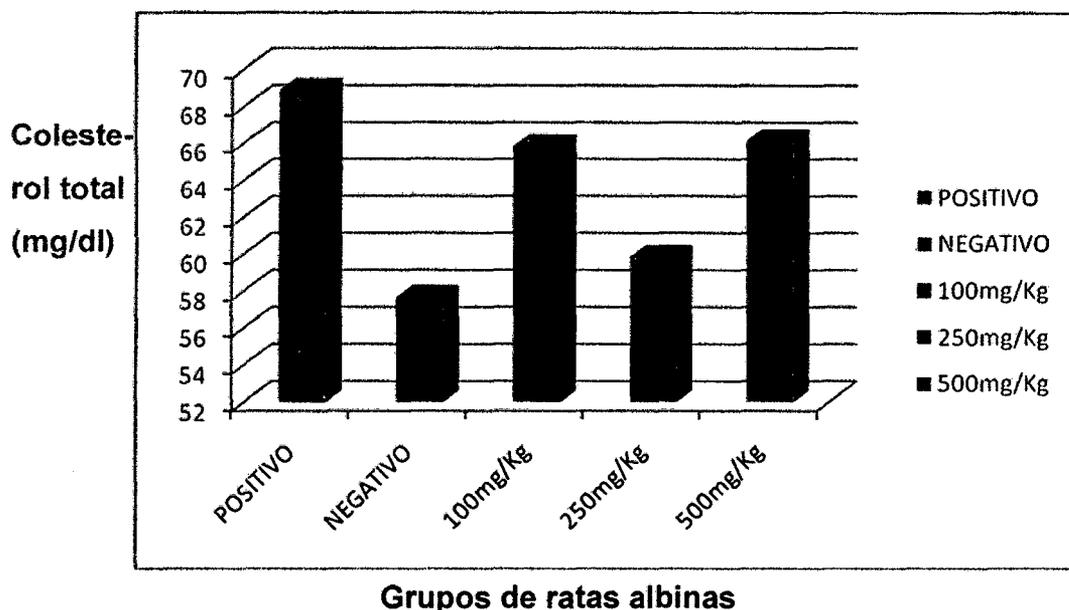
ANOVA SEGÚN SPSS 19

	Sig.
Inter-grupos	0,001
Intra-grupos	
Total	

Fuente: Datos estadísticos

GRAFICO 01

ANALISIS COMPARATIVO DE LA MEDICION DE COLESTEROL TOTAL DE LOS GRUPOS QUE RECIBIERON LAS DOSIS DE EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Achyrocline alata* FRENTE A LOS CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO



ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Como se observa en el CUADRO 05 existe una disminución significativa de los valores de colesterol total en las ratas 2,3 y 5 (70.3, 73.3 y 75.4 mg/dl respectivamente) del grupo CONTROL POSITIVO comparándolas con los valores del grupo de 250 gr/Kg, mas no así con las del grupo de 500 gr/Kg, en las cuales no se evidencia mucha diferencia, esto probablemente debido a un posible efecto tóxico por administración prolongada del extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyrocline alata*.

Es por ello que, al aplicar el método estadístico por análisis de varianza (ANOVA), nos demuestra una significatividad menor a 0.05 ($p < 0.05$) lo cual nos indica que se acepta la hipótesis planteada (Sí presenta efecto hipocolesterolemiante) y se rechaza la hipótesis nula (No presenta efecto hipocolesterolemiante).

CUADRO 06

Determinación de HDL Colesterol (mg/dl) en muestras de suero de ratas albinas mediante el método enzimático – colorimétrico.

Grupos de Ratones	Rata 01	Rata 02	Rata 03	Rata 04	Rata 05	Rata 06
Control positivo	39.0	38.3	26.0	48.1	46.5	36.1
Control negativo	44.4	56.9	40.1	26.0	30.0	38.98
100 mg/Kg	36.2	43.3	52.8	37.0	34.0	40.55
250 mg/Kg	32.2	28.7	47.9	43.0	28.0	35.9
500 mg/Kg	14.8	32	30.4	37.0	30.0	28.8

Fuente: datos experimentales

Análisis estadístico descriptivo según el paquete estadístico SPSS 19.

GRUPO	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Pos	6	39,0000	7,96191	3,25044	30,6445	47,3555	26,00	48,10
Neg	6	39,3967	10,95296	4,47153	27,9022	50,8911	26,00	56,90
100	6	40,6417	6,81179	2,78090	33,4931	47,7902	34,00	52,80
250	6	35,9500	8,02913	3,27788	27,5239	44,3761	28,00	47,90
500	6	28,8350	7,44947	3,04123	21,0173	36,6527	14,80	37,00
Total	30	36,7647	8,88935	1,62297	33,4453	40,0840	14,80	56,90

Fuente: Datos estadísticos

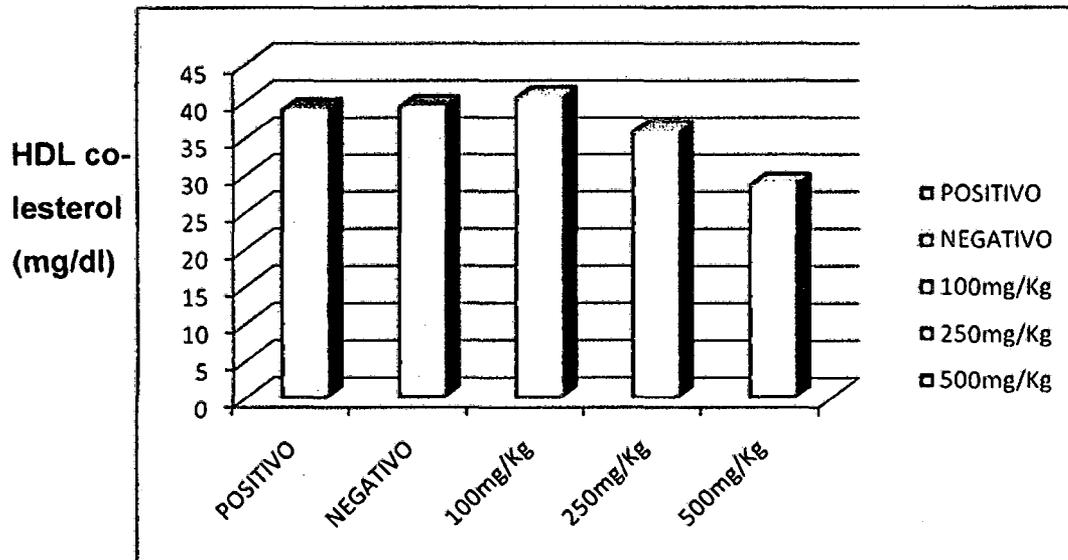
ANOVA SEGÚN SPSS 19

	Sig.
Inter-grupos	0,135
Intra-grupos	
Total	

Fuente: Datos estadísticos

GRAFICO 02

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA MEDICIÓN DE HDL COLESTEROL DE LOS GRUPOS QUE RECIBIERON LAS DOSIS DE EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Achyrocline alata* FRENTE A LOS CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO



Grupos de ratas albinas

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Al observar el CUADRO 06 los valores de HDL colesterol en los animales de experimentación del grupo CONTROL POSITIVO, no presentan mucha diferencia con los valores pertenecientes a los animales de experimentación de los grupos de 100, 250 y 500 gr/Kg, en este caso era ideal hallar valores elevados de HDL colesterol en cualquier grupo de las dosis de extracto administradas con respecto al grupo CONTROL POSITIVO, sin embargo no se encuentran resultados satisfactorios.

Es por ello que, al aplicar el método estadístico por análisis de varianza (ANOVA), nos demuestra una significatividad mucho mayor a 0.05 ($p > 0.05$) lo cual nos indica que se acepta la hipótesis nula (No presenta efecto) con respecto al HDL colesterol.

CUADRO 07

Determinación de LDL Colesterol (mg/dl) en muestras de suero de ratas albinas mediante el método enzimático – colorimétrico.

Grupos de Ratones	Rata 01	Rata 02	Rata 03	Rata 04	Rata 05	Rata 06
Control positivo	58.8	55.2	48.8	48.8	51.1	60.5
Control negativo	55.5	53.3	47.7	48.3	48.7	50.2
100 mg/Kg	44.7	58.0	53.3	52.9	52.8	51.5
250 mg/Kg	39.5	36.7	56.5	40.2	52.5	37.6
500 mg/Kg	53.5	43.6	50.2	48.1	60.3	53.1

Fuente: datos experimentales

Análisis estadístico descriptivo según el paquete estadístico SPSS 19.

Grupos	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Pos	6	53,8667	5,08160	2,07455	48,5339	59,1995	48,80	60,50
Neg	6	50,6167	3,12309	1,27499	47,3392	53,8941	47,70	55,50
100	6	52,2167	4,30275	1,75659	47,7012	56,7321	44,70	58,00
250	6	43,8333	8,45309	3,45096	34,9624	52,7043	36,70	56,50
500	6	51,4667	5,65072	2,30690	45,5366	57,3967	43,60	60,30
Total	30	50,4000	6,28386	1,14727	48,0536	52,7464	36,70	60,50

Fuente: Datos estadísticos

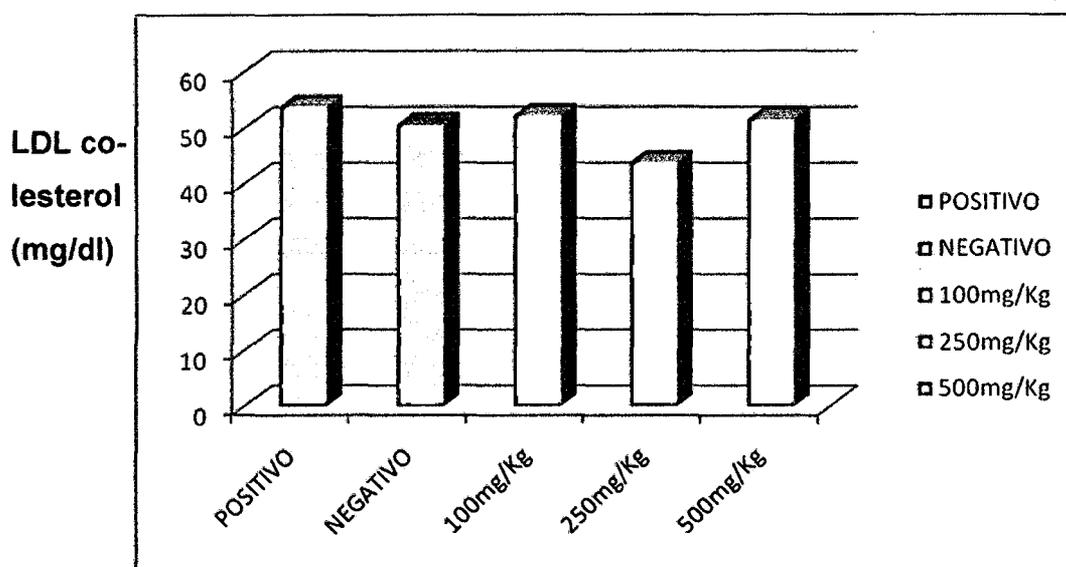
ANOVA SEGÚN SPSS 19

	Sig.
Inter-grupos	0,045
Intra-grupos	
Total	

Fuente: Datos estadísticos

GRAFICO 03

ANALISIS COMPARATIVO DE LA MEDICION DE LDL COLESTEROL DE LOS GRUPOS QUE RECIBIERON LAS DOSIS DE EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Achyrocline alata* FRENTE A LOS CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO



Grupos de ratas albinas

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En el CUADRO 07 existe una disminución significativa de los valores de LDL colessterol en las ratas 1,2 y 6 (58.8, 55.2 y 60.5 mg/dl respectivamente) del grupo CONTROL POSITIVO comparándolas con los valores del grupo de 250 gr/Kg, pero no mucha diferencia con los valores hallados pertenecientes al grupo de 100 gr/Kg (dosis mínima), ni al grupo de 500 gr/Kg; en este último grupo hay que resaltar que se deba a un posible efecto tóxico por administración prolongada del extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyrocline alata*.

Al aplicar el método estadístico por análisis de varianza (ANOVA), nos demuestra una significatividad menor a 0.05 ($p < 0.05$) lo cual nos indica que se acepta la hipótesis planteada (Sí presenta efecto hipocolesterolemiantes) y se rechaza la hipótesis nula (No presenta efecto hipocolesterolemiantes).

CUADRO 08

Determinación de Triglicéridos (mg/dl) en muestras de suero de ratas albinas mediante el método enzimático – colorimétrico.

Grupos de Ratones	Rata 01	Rata 02	Rata 03	Rata 04	Rata 05	Rata 06
Control positivo	142	106	77.5	105	141	129
Control negativo	120.5	99	101	107.5	127.5	81.9
100 mg/Kg	80	139	101	128.5	73	119.5
250 mg/Kg	106	93.5	112.5	93	143	80
500 mg/Kg	67.2	85	87.5	101	134	78.8

Fuente: datos experimentales

Análisis estadístico descriptivo según el paquete estadístico SPSS 19.

Grupos	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Pos	6	96,7500	38,44444	15,69488	56,4050	137,0950	35,00	142,00
Neg	6	129,5667	31,29611	12,77658	96,7234	162,4099	99,00	181,90
100	6	106,8333	26,69582	10,89852	78,8178	134,8489	73,00	139,00
250	6	104,6667	21,91727	8,94769	81,6659	127,6674	80,00	143,00
500	6	92,2500	23,25147	9,49237	67,8491	116,6509	67,20	134,00
Total	30	106,0133	29,91386	5,46150	94,8433	117,1834	35,00	181,90

Fuente: Datos estadísticos

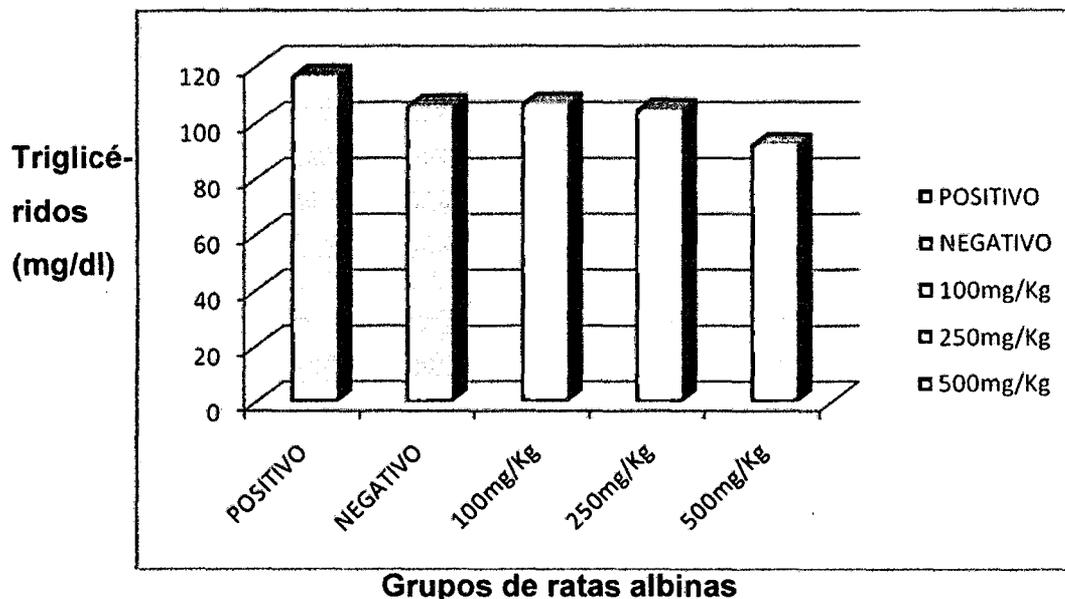
ANOVA SEGÚN SPSS 19

	Sig.
Inter-grupos	0,235
Intra-grupos	
Total	

Fuente: Datos estadísticos

GRAFICO 04

ANALISIS COMPARATIVO DE LA MEDICION DE TRIGLICERIDOS DE LOS GRUPOS QUE RECIBIERON LAS DOSIS DE EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE *Achyrocline alata* FRENTE A LOS CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO



ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Al observar el CUADRO 08 los valores de Triglicéridos en los animales de experimentación del grupo CONTROL POSITIVO, solo presentan valores elevados las ratas 01 y 06 (142 y 129 mg/dl respectivamente) con respecto a los valores correspondientes a los grupos de las dosis de 100, 250 y 500 gr/Kg, sin embargo hay que resaltar que en estos grupos también se evidencian valores de Triglicéridos elevados (128.5 en el grupo de 100 gr/Kg, 143 en el grupo de 250 gr/Kg, y 134 en el grupo de 500 gr/Kg) es por ello que no se pueden observar resultados satisfactorios al hacer el análisis estadístico.

Al aplicar el método estadístico por análisis de varianza (ANOVA), nos demuestra una significatividad mucho mayor a 0.05 ($p > 0.05$) lo cual nos indica que se acepta la hipótesis nula (No presenta efecto) con respecto a los Triglicéridos.

CUADRO 09
ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO SECO
HIDROALCOHOLICO DE *Achyrocline alata* AL 50% (METODO UP-
DOWN)

Rata	Dosis (mg/kg)	Número de Ratones Muertos	Observaciones
1	2000	0	Estado aparentemente normal
2	2000	0	Estado aparentemente normal
3	2000	0	Estado aparentemente normal

Fuente: datos experimentales

Análisis, Interpretación y Discusión

Durante el proceso experimental se pudo observar que la planta es prácticamente atóxica, y no se continuó más debido al protocolo que te afirma que una dosis más allá de 2000 mg/Kg es solo aplicable en caso de que alguna documentación lo justifique, y para evitar daño a los animales. Es por eso que no se continuó con la investigación.

CUADRO 10
ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE MUESTRAS DE HIGADO EN RATAS
ALBINAS CORRESPONDIENTES AL ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA

Nro. lamina	Órgano	Congestión	Edema	Regeneración	Microhemorragia	Inflamación
H1 (2000 mg/Kg)	Hígado	Severa	No	Moderada	Mod. Sinusoidal	Cr. leve
H2 (2000 mg/Kg)	Hígado	Moderada	Sinusoidal	Leve	Mod. sinusoidal	Cr. Leve
H3 (2000 mg/Kg)	Hígado	Moderada	Leve sinusoidal	Leve	Leve. Sinusoidal	Cr. Portal leve

Fuente: datos experimentales

Análisis, Interpretación y Discusión

Al analizar los resultados obtenidos del estudio histopatológico las muestras de hígado se consideran “normales”, es decir el extracto no causo ninguna anomalía.

Lo cual concuerda mucho con estudios realizados con anterioridad sobre la toxicidad del género *Achyrocline* determinando en esos estudios su inocuidad.

Los datos sobre la toxicidad aguda según los parámetros de la OCDE se observaran mejor en el ANEXO 07.

CUADRO 11

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE MUESTRAS DE CORAZON DE RATAS ALBINAS CORRESPONDIENTES A LA DETERMINACION DEL EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE

GRUPO	ORGANO	CONGESTION	EDEMA	GRASA	REGENERACION	MICROHEMORRAGIA
Control Pos.	Corazón	Leve	No	Depósito focal	No	No
Control Neg.	Corazón	Leve	Leve	No	No	No
100 mg/Kg	Corazón	no	No	No	No	No
250 mg/kg	Corazón	no	No	No	No	No
500 mg/Kg	Corazón	no	No	Depósito focal leve	No	No

Fuente: datos experimentales



Fig. 1: Depósitos grasos (Control positivo)
(Fuente: Propia)



Fig. 2: Depósitos grasos (500 mg/Kg)
(Fuente: Propia)

Análisis, Interpretación y Discusión

Como se observa, solo presentan depósitos grasos tanto el grupo control positivo como el de la dosis de 500 mg/dl, lo cual está relacionado con los incrementos de COLESTEROL TOTAL y LDL COLESTEROL, esto significa el inicio de formación de ateromas, los cuales a medida que pasa el tiempo conducen a un cierre parcial de las arterias, causando en la mayoría de los casos enfermedades cardiacas. (Tierney Lawrence, 2006)

CONCLUSIONES

1. Se determinó que el efecto hipocolesterolemia del extracto seco hidroalcohólico al 50 % de *Achyrocline alata* (Huirá Huirá) con una dosis efectiva de 250 mg/Kg, para COLESTEROL TOTAL Y LDL COLESTEROL. Así también se evaluó la toxicidad aguda, mediante el método UP-DOWN, a una dosis límite de 2000 mg/Kg determinándose que el extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* es atóxico en ratas albinas hembras cepa Holtzman.
2. Se obtuvo el extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyrocline alata* (Huirá huirá), por maceración, con un porcentaje de rendimiento de 16.2%. Además en el análisis fitoquímico cualitativo se denotó mayor cantidad de ácidos fenólicos y flavonoides en el extracto.
3. Se cuantificó el Colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos- colorimétricos satisfactoriamente. Llegándose a la conclusión; que el efecto hipocolesterolemia del extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyrocline alata* (Huirá huirá), es efectivo a la dosis de 250 mg/Kg, disminuyendo el COLESTEROL TOTAL en un 13.12 %, el LDL COLESTEROL en un 18.64 % y TRIGLICERIDOS en 10.35 %.
4. Se realizó el análisis histopatológico en las muestras de corazón de cada grupo de animales de experimentación (ratas), hallándose depósitos grasos tanto en el grupo control positivo así como en el grupo de 500 mg/Kg. Sin embargo en los demás grupos no se encontró nada relevante, confirmándose así el efecto hipocolesterolemia del extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* (Huirá huirá).
5. Se seleccionó como dosis límite; 2000 mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* (Huirá huirá) para la toxicidad aguda (UP - DOWN), debido a antecedentes sobre la toxicidad aguda de dicha planta, no presentando signo de toxicidad en los animales de experimentación.

6. Se realizó el análisis histopatológico en las muestras de hígado de los animales de experimentación, no hallándose vestigios de toxicidad aguda en el órgano blanco.

RECOMENDACIONES

Tras realizar la presente investigación y con la experiencia adquirida durante este proceso se sugiere:

A los estudiantes y egresados de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica:

- Ensayar métodos de extracción, aislamiento y purificación para la obtención de ácidos cafeilquínicos, presuntos responsables del efecto hipocolesterolemiante de la especie *Achyrocline alata* en la Región.
- Así mismo; realizar una investigación sobre la toxicidad crónica y subcrónica de la especie vegetal *Achyrocline alata*.
- Comparar cuantitativamente dichos metabolitos de la especie en estudio con respecto a otras especies del mismo género en la región.

Al Departamento Académico de Farmacia:

- Es necesario implementar un bioterio en la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica, adecuado para la mantención de animales de experimentación, que en algunos casos, dependientes del proceso de investigación, necesitan períodos largos de experimentación.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso, Juan Ignacio (2000). DICCIONARIO ELECTRÓNICO ESPASA DE MEDICINA. Espasa Calpe. España.
2. Anguiano, Rueda C. (1992). DICCIONARIO DE CIENCIAS MÉDICAS. Editorial El Ateneo. Novena Edición. Argentina.
3. Azzimonti, Renzo J. C. (2000). BIOESTADÍSTICA APLICADA A BIOQUÍMICA Y FARMACIA. Editorial Universitaria. Segunda Edición. Argentina.
4. Beers, M.D Mark H. (1999). MANUAL MERCK. Editorial Harcourt. Décima edición. España.
5. Coma, Canella Isabel. (1991). EL COLESTEROL Y EL INFARTO. Editorial RIALP. España. 1991.
6. Dominguez, X. A. (1979). MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA. Editorial Limusa. Segunda edición. México.
7. DORLAND (1998). DICCIONARIO MÉDICO ILUSTRADO. Editorial Mc Graw - Hill. Veinticincoava edición. México.
8. Gaw Allan (2001), BIOQUÍMICA CLÍNICA. Editorial Harcourt. Segunda edición. Peru.
9. Gisbert, Calabuig Juan Antonio (1999), MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGÍA. Editorial Masson S.A. Quinta edición. España.
10. Govantes, B. Jesús-Lorenzo F. Pedro-Govantes E. Carlos (1999). MANUAL NORMON. Editorial LABORATORIOS NORMON S.A. Séptima edición. España.

11. Mc. Phee, Stephen J., Papadakis Maxine A. (2010), DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO MÉDICO 2010. Editorial Mac Graw Hill. México.
12. Milikowski, MD Clara (2001). ATLAS DE HISTOPATOLOGÍA. Editorial Marbán. Primera edición. España.
13. Nelson, David L., Cox M. Michael, (2000) PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA LEHNINGER. Editorial Omega. Cuarta edición. España.
14. Pacheco Leal, Daniel (2001). BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL Y APLICADA A LA MEDICINA – Editorial Del Instituto Politécnico Nacional. Primera edición. México.
15. Petenatti, Elisa M., Nievas, Carlos M., Petenatti Marta E., y Luis A. del Vitto (2004). MEDICAMENTOS HERBARIOS EN EL CENTRO-OESTE ARGENTINO. “MARCELAS” Y “VIRA-VIRAS” EN MUESTRAS COMERCIALES. Acta Farm. Bonaerense 23 (4): 484-91.
16. Ruiz, Lara Rafael (1989). DICCIONARIO MEDICO TEIDE. Editorial TEIDE S.A. España. Cuarta Edición. 1989.
17. Runge, Marschall S., Ohman Magnus (2004). NETTER CARDIOLOGÍA. Editorial Masson. Primera edición. España.
18. Sherry, Eugene, Wilson Stephen F. (2002) MANUAL OXFORD DE MEDICINA DEPORTIVA. Editorial Paidotribo. Primera edición. España. 2002.
19. Tealdi, Juan Carlos (2008). DICCIONARIO LATINOAMERICANO DE BIOÉTICA - UNESCO. Cuarta edición. Colombia.
20. Tierney, M. Lawrence, Mc. Phee Stephen J., Papadakis Maxine A. (2006), DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y TRATAMIENTO. Editorial Manual Moderno. Cuarentiunava edición. México.

21. Trigo, Tavera, Francisco (2002), PATOLOGÍA GENERAL VETERINARIA. Editorial Universitaria. Cuarta edición. México.
22. Valencia, O. Ciria (1995), FUNDAMENTOS DE FITOQUÍMICA. Editorial Trillas. Primera edición. México.
23. Villar del Fresno, Angel M. (1998) FARMACOGNOSIA GENERAL. Editorial Síntesis. Segunda edición. España.
24. Villena, Tejada Magaly (2009), MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA. Perú.
25. Wallach, M.D. Jacques (2009), INTERPRETACIÓN DE TEST DE DIAGNÓSTICO. Editorial Wolters Kluwer. Octava edición. España.

PAGINAS ELECTRONICAS

1. Cáceres, Pilares José. 1999. Sistema de Bibliotecas del universidad Nacional de San Marcos – *Niveles de Colesterol en pobladores de altura – Cusco*.

http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/situa/1999_n13/niveles.htm (Con acceso el 31 de enero del 2011)
2. Cáceres Pilares José. 2004. Sistema de Bibliotecas de la universidad Nacional de San Marcos - *Colesterol total y sus fracciones en adultos de 30 a 39 años, según género y sub-grupos de edad: Cusco*.

sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2004_n2/Pdf/a03.pdf (Con acceso el 31 de enero del 2011)
3. DIRESA Cusco. 2010 – Departamento de Estadística, Informática y comunicaciones- *“Principales causas de morbilidad: 2006 - 2010”*.

<http://www.diresacusco.gob.pe/estaditica/modulo1/morbilidad.htm> (Con acceso el 25 de Noviembre del 2011)

4. Hugo Femenía, Jorge. 2009. *Flora del Famatina*.
www.diariochilecito.com.ar/articulo/6582.html (Con acceso el 11 de enero del 2011)
5. Medina Tovar Sandro (2009). *Elevados niveles de colesterol en la población de Lima*. Diario El Comercio.
<http://elcomercio.pe/impresia/edicion/2009-02-19/ecvf190209a13> (Con acceso el 15 de Marzo del 2011)
6. Nardini M., E. Cirillo, F. Natella, C. Scaccini (2002), *La Absorción de los ácidos fenólicos en humanos después del consumo de café*.
<http://www.Lacienciadelcafe.com.ar> (Con acceso el 21 de enero del 2011)
7. OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (2008) - *Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP) – TG. 425*.
<http://www.oecd.org/dataoecd/17/51/1948378.pdf> (Con acceso el 20 de Febrero del 2011)
8. Zúñiga, M. Jesús (2010). Portal de veterinaria – ONLINE (2010). *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*.
<http://minnie.uab.es/~veteri/00009/> (Con acceso el 15 de mayo del 2011)
9. Vettorazzi, G. (2011), *Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas, PROGRAMA INTERNACIONAL DE SEGURIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUIMICAS, OMS – GINEBRA - SUIZA*.
http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_576_spa.pdf (Con acceso el 31 de enero del 2011)
10. Scribd (2011); *Apuntes de tecnología de mecanismos*.
<http://www.scribd.com/doc/3954415/Apuntes-de-Tecnologia-de-mecanismos>
(Con acceso el 10 de enero del 2011)

ANEXO 01

**FICHA DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL HERBARIO VARGAS DEL
CUSCO**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

• APARTADO POSTAL
N° 921 - Cusco - Perú

• FAX: 238156 - 238173 - 222512

• RECTORADO
Calle Tigre N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398

• CIUDAD UNIVERSITARIA
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 -
222512 - 232370 - 232375 - 232226
• CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 252210
243835 - 243836 - 243837 - 243838
• LOCAL CENTRAL
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015

• MUSEO INKA
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
• CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
• COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"
Av. De la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192

LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICA

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

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

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Achyrocline*
Especie : *Achyrocline alata* (H.B.K.) DC.
N. vulgar : Huiru-huiru.

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

Cusco, Abril de 2010



Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco
Herbario Vargas (CUZ)

M. Sc. Fructuosa De La Torre Mavorga
Directora

Arch/HV CUZ

ANEXO 02

CERTIFICADO SANITARIO DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

MARCO



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

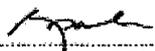
CERTIFICADO SANITARIO N° 070-2011

Producto	: Rata Albina	Lote N°	: R - 04 - 2011	
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>	Cantidad	: 45	
Cepa	: Holtzman	Edad	: 2 a 3 meses	
Peso	: 200 a 300 gr.	Sexo	: Hembras (15) Machos (30)	
B.V. N°	: 13356	GR: 023364	Destino	: Cristian Suel Human Cusco
Fecha	: 05-04-2011			

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

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

Chorillos, 15 de Abril del 2011
(Fecha de emisión del certificado)


.....
M.V. Arturo Rosales Fernández
C.M.V.P. 1586

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

ANEXO 03

ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO

METODO PARA LA DETERMINACION DE SAPONINAS

Prueba de la espuma (Indice Afrosimétrico)

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

METODO PARA LA DETERMINACION DE COMPUESTOS FENOLICOS

Reacción con FeCl₃ al 1%

Se toma 0.5 ml de extracto y se reparte en 05 lunas de reloj. Añadiendo unas gotas de agua destilada. Se deja un testigo y se adiciona una gota de cloruro férrico en el segundo, dos en la tercera y así sucesivamente hasta llegar al quinto. Coloraciones verdes a marrón para derivados de catecol y coloraciones azuladas para derivados de piragalol.

METODO PARA LA DETERMINACION DE TANINOS

Reacción con gelatina – NaCl (1 gr de gelatina + 100 ml H₂O + 10 gr de NaCl)

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

Reacción con Acetato de Plomo

A 0.5 ml del extracto agregar 2 a 3 gotas de Acetato de plomo. Formación de precipitado indica prueba positiva.

METODO PARA LA DETERMINACION DE TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES

Reacción de Liebermann – Burchard

Se coloca aproximadamente 5 ml de extracto; y se agrega 2 a 3 gotas de reactivo Liebermann – Burchard. Una coloración azul o verde para esteroides; rojo, rosado o violeta para triterpenos y amarillo para esteroides o triterpenos saturados.

METODO PARA LA DETERMINACION DE ALCALOIDES

Reacción de Dragendorff

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

Reacción de Mayer

Se toma 0.5 ml de la solución ácida del extracto agregar dos a tres gotas del reactivo de Mayer. La formación de un precipitado blanco o blanco amarillento indica prueba positiva para alcaloides.

Reacción de Wagner

Se toma 0.5 ml de la solución ácida del extracto y agregar 2 a 3 gotas de reactivo de wagner. La formación de un precipitado marrón indica prueba positiva para alcaloides.

METODO PARA LA DETERMINACION DE QUINONAS:

Reacción de Borntrager

5 ml del extracto bencénico se agitan con 2.5 ml de NaOH al 10 %, la coloración roja de la capa alcalina es positiva.

METODO PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES

Reacción de Benedict

A 0.5 ml del extracto agregar 0.2 ml de Reactivo de Benedict, se somete a ebullición por 5 minutos y se deja enfriar. La formación de un precipitado rojo ladrillo indica positivo para azúcares reductores.

METODO PARA LA DETERMINACION DE GLICOSIDOS

Reacción de Benedict modificado

A 200 mg de extracto agregar 2 ml de HCl al 1% y reflujar por 5 minutos, enfriar, neutralizar con NaOH al 1% y realizar la reacción de Benedict, la formación de un precipitado rojo ladrillo indica positivo para glicósidos.

METODO PARA LA DETERMINACION DE AMINOACIDOS

Reacción de ninhidrina

A 0.5 ml del extracto acidificado (HCl 1 %) calentar por 5 minutos en Baño de agua a ebullición. Coloraciones rojizas, violetas o amarillas indican prueba positiva.

METODO PARA LA DETERMINACION DE FLAVONOIDES

Reacción de Shinoda

A una parte del extracto se le coloca un pequeño trozo de magnesio y unas gotas de HCl_(c). Coloración amarilla o roja para flavonas y flavonoles, rojo a magneta para flavanoles, rojo, magneta, violeta azul para azul flavanonas, no dan coloraciones isoflavononas, chalconas y auronas.

Prueba del Amoniaco

En una tira de papel filtro se coloca una gota del extracto. Se seca y se expone a los vapores del amoniaco. Coloración amarilla para flavonas, flavonoles y xantonas, amarillo-rojo para chalconas y auronas, naranja para dihidroflvonoles, incoloro-naranja para dihidroflavonas y azul para antocianinas. (Dominguez X. A., 1979)

ANEXO 04

DATOS OBTENIDOS Y CERTIFICADOS POR EL LABORATORIO



LABORATORIO CLÍNICO BIOLÓGICO ESPECIALIZADO

Av. DE LA CULTURA 1404 (FRENTE A HOSPITAL REGIONA (PUERTA PRINCIPAL)

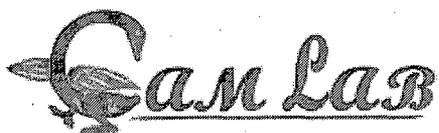
TELF. 246929 Cel. 984164932

CERTIFICA

Que los datos hallados en el **LABORATORIO CLÍNICO BIOLÓGICO ESPECIALIZADO CAMLAB**, con fecha del 28 de Agosto del 2011, son fiables y fueron realizados bajo supervisión del profesional **BIÓLOGO** Dr. Carlos T. Aguayo Morales.

Atte.


Carlos T. Aguayo Morales
BIÓLOGO
CBP. 7017



LABORATORIO CLÍNICO BIOLÓGICO ESPECIALIZADO

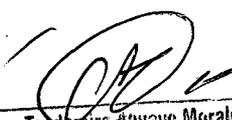
Av. DE LA CULTURA 1404 (FRENTE A HOSPITAL REGIONA (PUERTA PRINCIPAL)

TELF. 246929 Cel. 984164932

RESULTADOS

Resultados del análisis de COLESTEROL TOTAL, HDL – COLESTEROL y LDL – COLESTEROL en 30 muestras de sangre de ratas albinas macho. 28 de Agosto del 2011.

Nº	Observaciones	Colesterol total (mg/dl)	Colesterol HDL (mg/dl)	Colesterol LDL (mg/dl)
A100		64.9	63.2	44.7
A100		67.5	43.3	58.0
A100		61.9	52.8	53.3
A100		60.2	37.0	52.9
A100		74.2	34.0	52.8
A100		66.2	40.5	51.5
R250		60.5	32.2	39.5
R250		56.7	28.7	36.7
R250		57.9	47.9	56.5
R250		60.6	43.0	40.2
R250		61.9	28.0	52.5
R250		61.5	35.9	37.6
N500		74.5	14.8	53.5
N500		58.6	32.0	43.6
N500		69.1	30.4	50.2
N500		64.9	37.0	48.1
N500		63.5	30.0	60.3
N500		66.1	28.8	53.1


Carlos Teodoro Aguayo Morales
BIÓLOGO
CBP. 7017

POS		65.4	39.0	58.8
POS		70.3	38.3	55.2
POS		73.3	26.0	48.8
POS		62.3	48.1	48.8
POS		75.4	46.5	51.1
POS		66.6	63.1	60.5
NEG		56.4	44.4	55.5
NEG		57.2	56.9	53.3
NEG		67.6	40.1	47.7
NEG		54.8	26.0	48.3
NEG		53.2	30.0	48.7
NEG		56.8	39.0	50.2


Carlos Teodoro Aguayo Morales
BIOLOGO
CBP. 7017



LABORATORIO CLÍNICO BIOLÓGICO ESPECIALIZADO

Av. DE LA CULTURA 1404 (FRENTE A HOSPITAL REGIONAL PUERTA PRINCIPAL)

TELF. 246929 Cel. 984167832

Resultados del análisis de TRIGLICÉRIDOS obtenidos en 30 muestras de sangre de ratas albinas macho

Nº	Observaciones	Resultados mg/dl
A100		80
A100		139
A100		101
A100		128.5
A100		73
A100		119.5
R250		106
R250		93.5
R250		112.5
R250		93
R250		143
R250		80
N500		67.2
N500		85
N500		87.5
N500		101
N500		134
N500		78.8
POS		142
POS		106
POS		77.5
POS		105
POS		141
POS		129
NEG		120.5
NEG		99
NEG		101
NEG		107.5
NEG		127.5
NEG		81.9

ANEXO 05

PROGRESIONES DE DOSIS DE LA OCDE TG 425

(ELIJA UNA PENDIENTE Y LEA ABAJO DE LA COLUMNA; TODAS LAS DOSIS SE ENCUENTRAN EN mg/kg)

Slope = 1	2	3	4	5	6	7	8
0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*	0.175*
				0.275	0.26	0.24	0.23
			0.31			0.34	0.31
		0.375			0.375		0.41
				0.44		0.47	
	0.55		0.55		0.55		0.55
				0.69		0.65	
							0.73
		0.81			0.82		
			0.99			0.91	0.97
				1.09	1.2		
						1.26	1.29
1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
						2.4	2.3
				2.75	2.6		
			3.1			3.4	3.1
		3.75			3.75		
				4.4			4.1
						4.7	
	5.5		5.5		5.5		5.5
				6.9		6.5	
							7.3
		8.1			8.2		
			9.9			9.1	9.7
				10.9	12		
						12.6	12.9
17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
						24	23
				27.5	26		
			31			34	31

Continúa en la siguiente página...

...viene de la página anterior

Table 1 continued

Slope = 1	2	3	4	5	6	7	8
		37.5			37.5		
				44			41
						47	
	55		55		55		55
						65	
				69			73
		81			82		
			99			91	97
				109	120		
						126	129
175	175	175	175	175	175	175	175
						240	230
				275	260		
			310			340	310
		375			375		
				440			410
						470	
	550		550		550		550
						650	
				690			730
		810			820		
			990			910	970
				1090	1200		
						1260	1290
1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750	1750
						2400	2300
				2750	2600		
			3100				3100
					3750	3400	
							4100
5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000	5000

Fuente: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD)

Leyenda:

Slope : Nro. de columna

Columnas : Dosis en mg/Kg

ANEXO 06

CONSIDERACIONES LEGALES SOBRE EL MANEJO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION

**Directiva del Consejo de 24 de noviembre de 1986 relativa a la protección
de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos
(86/609/CEE)**

EL CONSEJO DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea y, en particular, su artículo 100, vista la propuesta de la Comisión, visto el dictamen del Parlamento Europeo, visto el dictamen del Comité Económico y Social, considerando que existen divergencias entre las leyes en vigor relativas a la protección de los animales utilizados para determinados fines de experimentación que podrían afectar el funcionamiento del mercado común; considerando que, con objeto de eliminar dichas divergencias, se debería proceder a la armonización de las leyes de los Estados miembros; considerando que tal armonización debería garantizar que el número de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos se reduzca al mínimo, que a dichos animales se les conceda la atención adecuada, que no se les cause dolor, sufrimiento, angustia o lesión permanente innecesariamente y que, en caso de no poderse evitar, estos perjuicios sean mínimos; considerando en particular que debe evitarse toda duplicación innecesaria de experimentos.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DIRECTIVA:

Artículo 1

El objetivo de la presente Directiva es el de garantizar, en el caso de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, la

armonización de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros relativas a la protección de dichos animales, a fin de evitar que no se perjudique el establecimiento y el funcionamiento del mercado común, en particular mediante distorsiones de la competencia o barreras comerciales.

Artículo 2

A efectos de la presente Directiva se entenderá por:

- a) «Animal», sin otro calificativo, cualquier ser vivo vertebrado no humano, incluidas las crías de vida propia y/o las formas de cría en reproducción, pero excluidos los fetos y las formas embrionarias.
- b) «Animales de experimentación», los animales utilizados o destinados a ser utilizados en experimentos.
- c) «Animales de cría», los animales especialmente criados para su utilización en experimentos en instalaciones aprobadas o registradas por la autoridad.
- d) «Experimento», cualquier utilización de un animal para la experimentación y otro fin científico que pueda causarle dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero, incluyendo, entre otros, los experimentos que, de manera intencionada o casual, puedan provocar el nacimiento de un animal en condiciones semejantes a las citadas, pero excluyendo los métodos menos dolorosos aceptados en la práctica moderna (i.e. métodos «humanos») para sacrificar o marcar a los animales; un experimento da comienzo cuando se empieza a preparar un animal para su utilización y acaba cuando ya no se va a hacer ninguna observación ulterior para dicho experimento; la eliminación del dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero mediante la utilización satisfactoria de analgesia o anestesia u otros métodos no excluirá la utilización de un animal del ámbito de esta definición. Quedan excluidas las prácticas no experimentales, agrícolas o de clínica veterinaria.

- e) «Autoridad», la autoridad o autoridades designadas por cada Estado miembro como responsables de la supervisión de los experimentos en el marco de aplicación de la presente Directiva.
- f) «Persona competente», cualquier persona considerada por un Estado miembro competente para realizar las funciones contempladas en la presente Directiva.
- g) «Establecimiento», cualquier instalación, edificio o grupo de edificios u otros locales y puede incluir un lugar que no esté totalmente cerrado o cubierto así como instalaciones móviles.
- h) «Establecimiento de cría», cualquier instalación donde se críen animales para utilizarlos en experimentos.
- i) «establecimiento suministrador», cualquier establecimiento diferente de uno de cría que suministre animales con vistas a su utilización en experimentos.
- j) «Establecimiento usuario», cualquier establecimiento en el que los animales se utilicen para experimentos.
- k) «Adecuadamente anestesiados», privados de sensaciones mediante métodos de anestesia (tanto local como general) que sean tan efectivos como aquellos empleados en una buena práctica veterinaria.
- l) «Sacrificados con métodos humanos», el sacrificio de un animal con el mínimo de sufrimiento físico y mental, según las especies.

Artículo 3

La presente Directiva se aplicará a la utilización de animales en experimentos que se lleven a cabo para uno de los fines siguientes:

- a) El desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos, alimenticios y otras sustancias o productos, así como la realización de pruebas para comprobar su calidad, eficacia y seguridad:
 - 1. En la prevención, profilaxis, diagnóstico o tratamiento de enfermedades, salud deteriorada u otras anomalías o sus efectos en el hombre, los animales o las plantas,

2. En la evaluación, detección, regulación o modificación de las condiciones fisiológicas en el hombre, animales y plantas.

b) La protección del medio ambiente natural en interés de la salud o el bienestar del hombre o los animales.

Artículo 4

Cada Estado miembro garantizará que los experimentos en que se utilicen animales considerados en peligro de extinción de acuerdo con el Apéndice I del Convenio sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres y el Anexo C, parte 1 del Reglamento (CEE) N° 3626/82 queden prohibidos a menos que se ajusten a lo dispuesto en el Reglamento citado y los objetivos del experimento sean:

- Investigación tendente a la protección de las especies de que se trate, o
- Fines biomédicos esenciales cuando se compruebe que tales especies son, excepcionalmente, las únicas adecuadas a tales fines.

Artículo 5

Los Estados miembros velarán por que, en lo que se refiere al cuidado general y al alojamiento de los animales:

- a) A cualquier animal de experimentación se deberá proporcionar alojamiento, un medio ambiente, al menos cierto grado de libertad de movimiento, alimentos, agua y cuidados adecuados a su salud y bienestar;
- b) Se limitará absolutamente al mínimo cualquier restricción relativa al grado en que un animal de experimentación pueda satisfacer sus necesidades fisiológicas y etológicas.
- c) Las condiciones ambientales en las que se críen, custodien o utilicen los animales de experimentación se verifiquen a diario.

d) El bienestar y el estado de salud de los animales de experimentación sea observado por una persona competente para prevenir el dolor así como el sufrimiento, la angustia o el daño duradero inútiles;

e) Se dispongan medidas que garanticen que cualquier defecto o sufrimiento que se descubra sea eliminado lo más rápidamente posible.

Para la aplicación de las disposiciones de las letras a) y b), los Estados miembros prestarán atención a las líneas directrices establecidas en el Anexo II.

Artículo 6

1. Cada Estado miembro designará a la autoridad o a las autoridades responsables de verificar la aplicación apropiada de las disposiciones de esta Directiva.

2. En el marco de la aplicación de la presente Directiva, los Estados miembros adoptarán las medidas necesarias para que la autoridad designada, mencionada en el apartado 1, pueda recabar el consejo de los expertos competentes en relación con estos problemas.

Artículo 7

1. Los experimentos sólo se realizarán por personas competentes autorizadas o bajo la responsabilidad directa de tales personas, o cuando el experimento u otro proyecto científico en cuestión se autorice con arreglo a las disposiciones de la legislación nacional.

2. No deberá realizarse un experimento si se dispone de otro método científicamente satisfactorio, razonable y factible para obtener el resultado perseguido, y que no implique la utilización de un animal.

3. Cuando tenga que realizarse un experimento, la elección de las especies se considerará minuciosamente y, en su caso, se declarará a la autoridad. Al elegir entre diversos experimentos, se seleccionarán aquellos que utilicen el menor número de animales, que afecten a animales con el grado más bajo de

sensibilidad neurofisiológica, que causen el menor dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero y que puedan proporcionar los resultados más satisfactorios.

4. No podrán llevarse a cabo los experimentos con animales capturados en la naturaleza a menos que los experimentos con otros animales no sean suficientes para los objetivos del experimento.

5. Todos los experimentos deberán realizarse de forma que eviten la angustia y el dolor o el sufrimiento innecesario en los animales de experimentación. Deberán estar sujetos a las disposiciones previstas en el artículo 8. Las medidas establecidas en el artículo 9 deberán adoptarse en todos los casos.

Artículo 8

1. Todos los experimentos deberán llevarse a cabo con anestesia general o local.

2. El anterior apartado 1 no será de aplicación cuando:

a) se considere que la anestesia es más traumática para el animal que el experimento mismo;

b) la anestesia sea incompatible con los fines del experimento. En tales casos, deben adoptarse las medidas legislativas y/o administrativas adecuadas que garanticen que no se lleve a cabo innecesariamente el experimento.

La anestesia debería usarse en el caso de que se inflijan lesiones graves que puedan causar dolores intensos.

3. Si la anestesia no fuera posible, deberían usarse analgésicos u otros métodos adecuados a fin de garantizar en la medida de lo posible que el dolor, el sufrimiento, la angustia o el daño queden limitados y que, en cualquier caso, el animal no sufra dolor, angustia o sufrimiento intenso.

4. Siempre que tal acción sea compatible con los fines del experimento, un animal anestesiado, que sufra dolor considerable después de haber sufrido la anestesia, deberá ser tratado a tiempo con medios para calmar el dolor o,

cuando esto no sea posible, deberá ser sacrificado inmediatamente según métodos humanos.

Artículo 9

1. Al final de todo experimento, deberá decidirse si el animal debe mantenerse vivo o ser sacrificado mediante un método humano, teniéndose en cuenta que no se conservará con vida si, aun habiendo recuperado la salud normal en todos los demás aspectos, es probable que sufra un dolor o angustia duradero.

2. Las decisiones mencionadas en el apartado 1 serán adoptadas por una persona competente, preferiblemente un veterinario.

3. Cuando, al final de un experimento:

a) se vaya a conservar con vida un animal, éste deberá recibir el cuidado adecuado a su estado de salud, ser sometido a la vigilancia de un veterinario u otra persona competente y ser mantenido en las condiciones conformes a las exigencias del artículo 5. Sin embargo, las condiciones establecidas en la presente letra podrán suspenderse cuando, en opinión de un veterinario, el animal no vaya a sufrir como consecuencia de tal suspensión;

b) no se vaya a conservar con vida a un animal o no pueda beneficiarse éste de las condiciones del artículo 5 relativas a su bienestar, deberá ser sacrificado lo antes posible, mediante un método humano.

Artículo 10

Los Estados miembros deberán cerciorarse de que toda utilización repetida de los animales en experimentos es compatible con las disposiciones de la presente Directiva.

En particular, no deberá utilizarse un animal más de una vez en los experimentos que entrañen un dolor intenso, angustia o sufrimiento equivalente.

Artículo 11

A pesar de las disposiciones de la presente Directiva, cuando se haga necesario para los fines legítimos del experimento, la autoridad podrá permitir que el animal afectado sea puesto en libertad, siempre que se haya satisfecho la adopción del máximo cuidado posible para salvaguardar el bienestar del animal, en la medida en que su estado de salud lo permita y que no haya peligro para la salud pública y el medio ambiente.

Artículo 12

1. Los Estados miembros deberán establecer procedimientos con arreglo a los cuales se notifiquen anticipadamente a la autoridad los experimentos mismos o los datos relativos a las personas que los efectúen.
2. Cuando se vaya a someter a un animal a un experimento en el que sufra o pueda sufrir un intenso dolor que pueda prolongarse, este experimento tendrá que ser específicamente declarado a la autoridad y justificado o específicamente autorizado por ella. La autoridad adoptará las medidas judiciales o administrativas oportunas cuando la importancia del experimento para satisfacer las necesidades esenciales del hombre o de los animales no esté suficientemente demostrada.

Artículo 13

1. Basándose en las solicitudes de autorización y en las notificaciones recibidas, y de acuerdo con los informes elaborados, la autoridad en cada Estado miembro recogerá y, en la medida de lo posible, publicará

periódicamente la información estadística sobre la utilización de animales en experimentos con respecto a:

- a) el número y las especies de animales utilizados en los experimentos;
- c) el número de animales, por categorías seleccionadas, utilizados en los experimentos mencionados en el artículo 3;
- d) el número de animales, por categorías seleccionadas, utilizados en los experimentos exigidos por la legislación.

2. Los Estados miembros adoptarán todas las medidas necesarias para garantizar la protección del carácter confidencial de las informaciones que presenten un interés comercial particular que se comuniquen conforme a esta Directiva.

Artículo 14

Las personas que lleven a cabo experimentos o tomen parte en ellos y las personas que estén al cuidado de animales utilizados en experimentos, incluyendo las tareas de supervisión, deberán tener la preparación y formación apropiada.

En particular, las personas que lleven a cabo o supervisen la realización de experimentos deberán haber recibido formación en una disciplina científica relacionada con el trabajo experimental que se realice y deberán ser capaces de tratar y estar al cuidado de animales de laboratorio; deberán también certificar que han alcanzado un nivel suficiente de formación para llevar a cabo dichas tareas.

Artículo 15

Los establecimientos de cría y los establecimientos suministradores deberán ser aprobados o registrados por la autoridad y deberán ajustarse a lo

dispuesto en los artículos 5º y 14º, salvo que se haya hecho una excepción de acuerdo con el apartado 4 del artículo 19º o el artículo 21º. Un establecimiento suministrador sólo podrá obtener animales a partir de establecimientos de cría o de otros establecimientos suministradores, a no ser que el animal haya sido legalmente importado y no sea salvaje o vagabundo.

Podrá hacerse una excepción, general o particular, a esta última disposición, para un establecimiento suministrador, conforme a las modalidades que determine la autoridad.

Artículo 16

La aprobación o el registro contemplados en el artículo 15º indicarán la persona competente responsable del establecimiento encargado de administrar u organizar la administración de un cuidado apropiado de los animales criados o mantenidos en el establecimiento y de garantizar la conformidad con lo dispuesto en los artículos 5º y 14º.

Artículo 17

1. Los establecimientos de cría y los establecimientos suministradores deberán anotar el número y la especie de animales vendidos o suministrados, la fecha de venta o de suministro, el nombre y dirección del destinatario y el número y especie de los animales muertos durante su estancia en el establecimiento de cría o en el establecimiento suministrador en cuestión.

2. Cada autoridad determinará qué registros deberá conservar y tener a su disposición la persona responsable del establecimiento mencionado en el apartado 1; dichos registros deberán conservarse durante al menos tres años a partir de la fecha de la última inscripción y deberán someterse a inspección periódica a cargo de los funcionarios que designe la autoridad.

Artículo 18

1. Todo perro, gato o primate no humano de cualquier establecimiento de cría, suministrador o usuario deberá contar, antes de su destete, con una marca de identificación individual realizada de forma que cause el menor daño posible, excepto en los casos contemplados en el apartado 3.
2. Cuando un perro, gato o primate no humano no marcado sea llevado a un establecimiento por primera vez tras su destete, deberá ser marcado lo antes posible.
3. Cuando un perro, gato o primate no humano sea trasladado de un establecimiento de los que se citan en el apartado 1 a otro establecimiento, antes de su destete, y no sea posible marcarlo previamente, el establecimiento receptor deberá conservar un registro documental completo, con indicación, en particular, de los datos de la madre, hasta que sea marcado.
4. Deberán incluirse en los registros de cada establecimiento los detalles particulares relativos a la identidad y origen de todo perro, gato o primate no humano.

Artículo 19

1. Los establecimientos usuarios deberán estar registrados o aprobados por la autoridad. Se harán las adaptaciones oportunas para que los establecimientos usuarios tengan las instalaciones y el equipo apropiado para las especies de animales que se utilicen y para la ejecución de los experimentos que allí se lleven a cabo; su proyecto, construcción y método de funcionamiento deberán garantizar que los experimentos puedan ejecutarse con la mayor efectividad posible, de forma que se obtengan resultados coherentes con el menor número posible de animales y se produzca el mínimo grado de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero.

2. En cada establecimiento usuario:

- a) deberán mencionarse el nombre de la persona o personas que sean responsables administrativamente del cuidado de los animales y del funcionamiento del equipo;
- b) deberá disponerse de personal cualificado y en número suficiente;
- c) se tomarán las disposiciones oportunas para que se pueda contar con asesoramiento y tratamiento veterinarios;
- d) se encargará a un veterinario o a otra persona competente de tareas de asesoramiento en relación con el bienestar de los animales.

3. Podrán llevarse a cabo experimentos fuera de los establecimientos usuarios con autorización de la autoridad.

4. En los establecimientos usuarios, sólo se utilizarán animales procedentes de establecimientos de cría o de establecimientos suministradores, salvo excepción, general o particular, concedida según las modalidades que determine la autoridad. Siempre que sea posible se deberán utilizar animales de cría. No se utilizarán en los experimentos los animales vagabundos de especies domésticas. Una excepción general que se haga conforme a las condiciones del presente apartado no podrá extenderse a los perros y gatos vagabundos.

5. Los establecimientos usuarios deberán conservar el registro de todos los animales utilizados y deberán presentarlos siempre que la autoridad lo requiera. En particular, en dichos registros deberá constar el número y especie de todos los animales adquiridos, dónde fueron adquiridos y la fecha de su llegada. Dichos registros deberán conservarse al menos tres años y deberán ser presentados a la autoridad que así lo solicite. Los establecimientos usuarios deberán estar sujetos a inspecciones periódicas a cargo de los representantes de la autoridad.

Artículo 20

Cuando los establecimientos usuarios críen animales para su uso en sus propias instalaciones, sólo será necesario un registro o aprobación a los fines de los artículos 15º y 19º. No obstante, los establecimientos deberán ajustarse a las disposiciones pertinentes de la presente Directiva en lo que se refiere a los establecimientos de cría y a los establecimientos usuarios.

Artículo 21

Los animales que pertenezcan a las especies enumeradas en el Anéxo I destinados a la utilización en experimentos deberán ser animales de cría, a no ser que se haya obtenido una excepción general o especial, conforme a las modalidades que determine la autoridad.

Artículo 22

1. Con objeto de evitar duplicaciones innecesarias de experimentos que tengan como fin cumplir las disposiciones de las legislaciones nacionales o comunitarias en materia de salud y seguridad, los Estados miembros deberán reconocer, en la medida de lo posible, la validez de los datos obtenidos mediante los experimentos llevados a cabo en el territorio de otro Estado miembro, a no ser que alguna prueba posterior sea necesaria para la protección de la salud pública y la seguridad.

2. A tal fin, los Estados miembros, cuando sea factible y sin perjuicio de lo dispuesto en las directivas comunitarias existentes, deberán proporcionar información a la Comisión sobre su legislación y procedimientos administrativos relativos a experimentos con animales, con inclusión de los requisitos que haya que cumplir antes de la comercialización de los productos; deberán también aportar información objetiva sobre los experimentos realizados en su territorio y sobre las autorizaciones y demás detalles de carácter administrativo relacionados con dichos experimentos.

3. La Comisión creará un Comité consultivo permanente en el que estarán representados los Estados miembros y que asistirá a la Comisión en la organización del intercambio de informaciones apropiadas, velando por la confidencialidad de las informaciones, y que asistirá igualmente a la Comisión en lo que respecta a los demás asuntos que se derivan de la aplicación de la presente Directiva.

Artículo 23

1. La Comisión y los Estados miembros deberán fomentar la investigación sobre el desarrollo y la confirmación de técnicas alternativas que puedan aportar el mismo nivel de información que el obtenido en experimentos con animales, que supongan el uso de menos animales o que impliquen procedimientos de menor dolor, y darán los pasos oportunos, en la medida en que lo consideren apropiado, para fomentar la investigación en este campo. La Comisión y los Estados miembros seguirán de cerca la evolución de los métodos experimentales.

2. La Comisión informará, antes de finalizar 1987, sobre la posibilidad de modificar las pruebas y orientaciones establecidas en la legislación comunitaria existente, teniendo en cuenta los objetivos contemplados en el apartado 1.

Artículo 24

La presente Directiva no limitará el derecho de los Estados miembros a aplicar o adoptar medidas más estrictas para proteger a los animales utilizados en experimentos, o para controlar o limitar la utilización de animales en experimentos. En particular, los Estados miembros podrán solicitar una autorización previa para experimentos o programas de trabajo que notifiquen de acuerdo con el apartado 1 del artículo 12º.

Artículo 25

1. Los Estados miembros tomarán las medidas necesarias para dar cumplimiento a la presente Directiva a más tardar el 24 de noviembre de 1986. Informarán de ello inmediatamente a la Comisión.
2. Los Estados miembros comunicarán a la Comisión las disposiciones de la legislación nacional que adopten en el campo que abarca la presente Directiva.

Artículo 26

Con intervalos regulares que no superen los tres años, y por primera vez cinco años después de la notificación de la presente Directiva, los Estados miembros deben informar a la Comisión de las medidas que se hayan tomado en este campo y presentarán el correspondiente resumen de la información recogida conforme al artículo 13º; la Comisión preparará un informe para el Consejo y para el Parlamento Europeo.

Artículo 27

Los destinatarios de la presente Directiva son los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 24 de noviembre de 1986. Por el Consejo

El Presidente

W. WALDEGRAVE

La presente investigación se realizó respetando las normas aquí estipuladas.

ANEXO 07

INFORME TOXICIDAD AGUDA: METODO UP – DOWN

1. Sustancia de ensayo

Naturaleza física : Extracto hidroalcohólico seco de *Achyrocline alata* color verde oscuro, de naturaleza pastosa, soluble en agua destilada – desionizada (solventes polares), y con alta cantidad de compuestos fenólicos.

Identificación :

Reino : Vegetal
División : Magnoliophyta
Clase : Magnoliopsida
Subclase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : Gnaphalieae
Especie: *Achyrocline alata*
N. vulgar : Huira – Huira

Vehículo : Agua desionizada, se utilizó dicho vehículo debido a la buena solubilidad del extracto en ella, y al ser inocuo, no interfirió en ningún proceso durante su administración

2. Animal de ensayo

Especie - Cepa : *Ratus norvegicus*, cepa Holtzman.
Situación microbiológica : Ratas albinas certificadas por el Instituto Nacional de Salud, en buenas condiciones sanitarias.
Número, edad y sexo : Quince (15) ratas albinas hembra de 8 a 12 semanas de las cuales se tomaron al azar para el análisis experimental de toxicidad aguda. Se tomaron ratas hembra, debido a su susceptibilidad frente a agentes tóxicos, y su menor capacidad de desintoxicación que las ratas macho, tal como lo recomienda el protocolo de toxicidad aguda - método Up – down de la OCDE.

Condiciones de alojamiento y Alimentación

: Los animales de experimentación se mantuvieron en un ambiente ventilado e iluminado, a temperaturas entre 20 - 25 °C aproximadamente y en jaulas que les daban un espacio de suelo promedio por rata de 400 cm² (el espacio recomendado es de 350 cm² por animal) con una altura de 20 cm. (Recomendado; 14 cm.). Su alimentación fue en base a alimento para roedores, "Cuyina"®, con los ingredientes necesarios para su desarrollo. (Salvador Cabos, 2000).

Pesos individuales

:

	Inicial	07 días	14 días
Rata 1	215.5 g.	220.5 g.	222.5 g.
Rata 2	214.2 g.	223.2 g.	224.0 g.
Rata 3	213.2 g.	225.5 g.	225.0 g.

3. Condiciones de prueba

Selección de dosis

: La dosis seleccionada debido a los antecedentes de la especie en estudio, y a que durante el proceso de administración, para determinar el efecto hipocolesterolemia la dosis de 500 mg/Kg, no causaba ningún cambio visible, fue de 2000 mg/Kg; como dosis límite, ya que dosis mayores, solo son justificables por determinados imperativos legales.

Formulación de la Sustancia de ensayo

: Se midieron; 400 mg/ml

	Peso	Volumen a administrar
Rata 01	215.5 g.	1.07 ml.
Rata 02	214.2 g.	1.07 ml.
Rata 03	213.2 g.	1.06 ml.

Administración de la Sustancia

: Se administró la dosis dividida en dos, uno cada media hora, debido a que el volumen es un poco elevado para ser administrado de forma entera.

Detalles de la alimentación

: La administración de comida y agua fue normal, sin embargo durante el período de observación no probaron alimento pero si agua.

RESULTADOS:

Cambios en el peso y cuerpo de los animales: No se observaron cambios durante la observación. Tampoco signos de toxicidad.

Análisis Histopatológico: Se tomaron como órgano diana el hígado de cada animal para llevarlo al especialista, y se obtuvieron los siguientes resultados.

Nro. lamina	Órgano	Congestión	Edema	Regeneración	Microhemorragia	Inflamación
H1	Hígado	Severa	No	Moderada	Mod. Sinusoidal	Cr. leve
H2	Hígado	Moderada	Sinusoidal	Leve	Mod. sinusoidal	Cr. Leve
H3	Hígado	Moderada	Leve sinusoidal	Leve	Leve. Sinusoidal	Cr. Portal leve

Discusión e interpretación de resultados:

Como se observó, no existen indicios de Toxicidad aguda, en los animales de experimentación, por lo que no fue necesario ningún cálculo estadístico.

Conclusión:

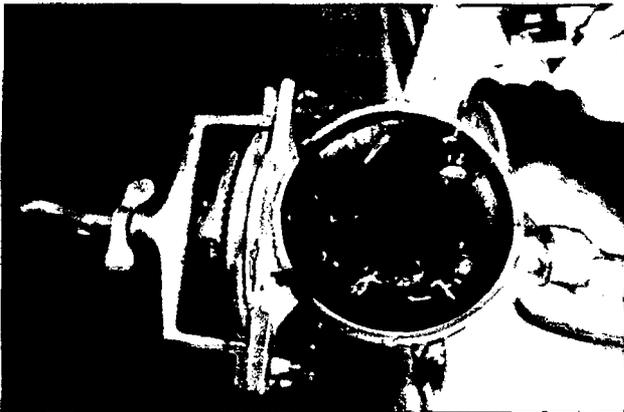
El extracto hidroalcohólico de *Achirocline alata* no presenta toxicidad aguda en ratas albinas hembra.

ANEXO 08

GALERIA DE FOTOS



Recolección de la especie en estudio: *Achyrocline alata* (Huirá Huirá), en el complejo arqueológico "de Sacsayhuaman a 3489 m.s.n.m.



Molienda en molino de granos.



Producto después de la molienda



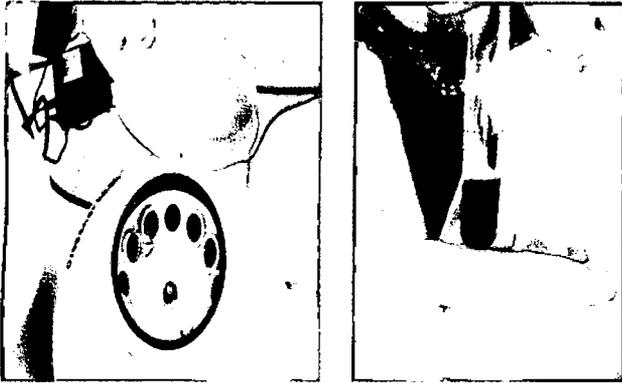
Administración del extracto seco hidroalcohólico de *Achyrocline alata* (Huirahuirá) y colesterol vía oral a los animales de experimentación (rata albina cepa Holtzman).



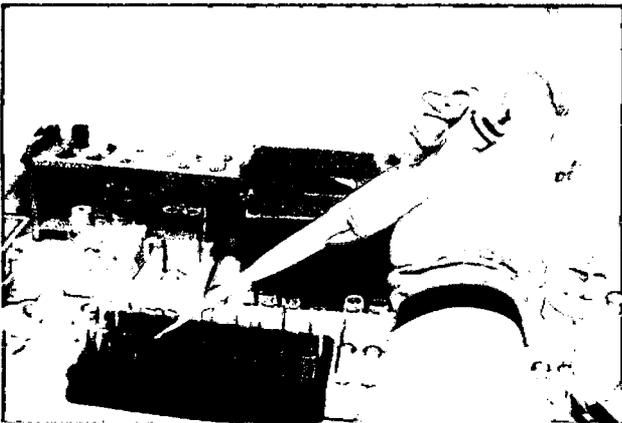
Extracción de sangre por punción intracardiaca del animal de experimentación.



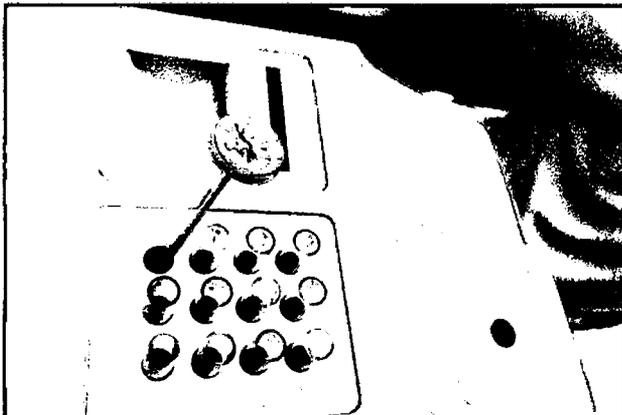
Sacrificio y disección de los animales de experimentación para extraer los órganos blanco (corazón en caso de colesterol e hígado en caso de la toxicidad aguda)



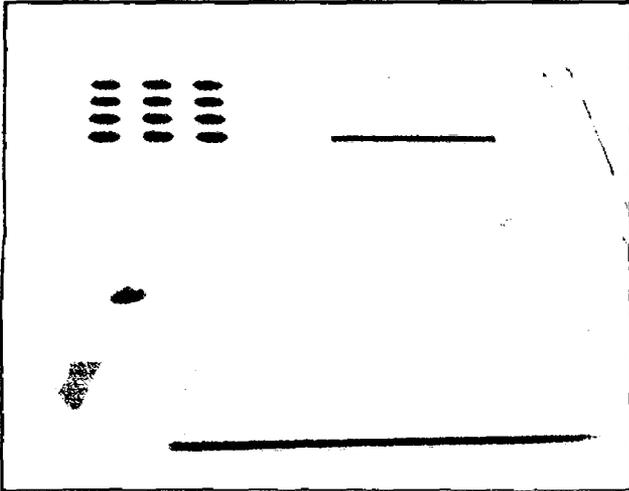
Obtención del suero para el análisis de colesterol y triglicéridos.



Proceso de análisis cuantitativo de colesterol y triglicéridos séricos por métodos colorimétricos.



Proceso de incubación en Baño maria.



Lectura de las muestras en el espectrofotómetro.



Muestra de hígado de los animales de experimentación obtenidos para análisis histopatológico como consecuencia de la prueba de toxicidad aguda (Método UP - DOWN)



Muestra de corazón de los animales de experimentación obtenidos para análisis histopatológico para la observación de posibles ateromas o formaciones grasas.

EFFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE Y TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO SECO HIDROALCOHOLICO DE *Achyroclinealata* "Huirahuirah" EN RATAS ALBINAS

HYPOCHOLESTEROLEMIC EFFECT ACUTE TOXICITY AND DRY HYDROALCOHOLIC *Achyroclinealata* "HUIRA HUIRA" IN ALBINO RATS

Bach. Suel Huaman Cristian Alvaro, Mgtr. Del Castillo Yañez Tatiana.

Carrera profesional de Farmacia y Bioquímica, Cusco, 2012.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo determinar el efecto hipocolesterolemizante y la toxicidad aguda del extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (Huirahuirah) en ratas albinas; para ello se recolectaron las partes aéreas de la especie vegetal, se llevaron a sequedad a temperatura ambiente, se pulverizaron en molino, y luego fueron sometidas a maceración hidroalcohólica por espacio de 15 días, luego se filtró y se llevó a baño maría a 35 – 40 °C, obteniéndose como resultado el extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata*. Luego se realizaron las pruebas siguientes: Benedict, Ninhidrina, Cloruro férrico, Shinoda - Amoniaco, Gelatina-sal, Dragendorff - Mayer, Afrosimétrico, Liberman-Burchard, Borntrager, según Dominguez.

Para determinar el efecto hipocolesterolemizante se utilizaron 30 ratas albinas machos cepa Holtzmann con peso promedio de 180 ± 20 gramos procedentes del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú), con condicionamiento previo de 5 días, con agua y alimento a libertad. La hipercolesterolemia fue inducida, considerando el método seguido por Arroyo, con colesterol puro administrado por vía oral en dosis de 62,5 mg/kg suspendido en goma tragacanto al 2%. Se trabajó con cinco grupos de seis ratas, un grupo sin inducción de hipercolesterolemia; otro con inducción y sin tratamiento, y los otros tres grupos recibieron tratamiento con diferentes dosis del extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (100, 250 y 500 mg/kg) administrado por vía oral durante 60 días. Posteriormente se extrajeron muestras de sangre para evaluar el nivel de colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos, según el método del kit enzimático VALTEK. Adicionalmente, se realizaron cortes histológicos de la arteria aorta en muestras de corazón para observar los efectos del extracto seco hidroalcohólico sobre este tejido.

El modelo de toxicidad UP DOWN consistió en dosis única con una dosis límite de 2000 mg/Kg observando si los animales de experimentación presentaban algún signo de toxicidad. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, seguido de una prueba de Tukey, para buscar diferencias significativas entre los grupos. Se consideró que existen diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

En el estudio fitoquímico se encontraron gran cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto hidroalcohólico de *Achyroclinealata*. En el análisis estadístico, según ANOVA (Análisis de varianza) existen diferencias significativas en la medición del COLESTEROL TOTAL ($p < 0,05$) y en LDL COLESTEROL ($p < 0,05$), es decir se acepta la hipótesis planteada; la especie *Achyroclinealata* reduce significativamente los niveles de COLESTEROL TOTAL y LDL COLESTEROL, a diferencia de TRIGLICERIDOS Y HDL COLESTEROL, en los cuales el extracto no presenta efecto.

Solo presentan depósitos grasos tanto el grupo control positivo como el de la dosis de 500 mg/dl, lo cual está relacionado con los incrementos de COLESTEROL TOTAL y LDL COLESTEROL, esto significa el inicio de formación de ateromas, los cuales a medida que pasa el tiempo conducen a un cierre parcial de las arterias, causando en la mayoría de los casos enfermedades cardíacas. En cuanto a la Toxicidad aguda se considera al extracto seco como atóxico.

PALABRAS CLAVE: Hipocolesterolemizante, colesterol, ácidos caféicos, ateromas.

ABSTRACT

This study aims to determine the cholesterol-lowering effect and acute toxicity of the hydroalcoholic dry *Achyroclinealata* (Huirahuirah) in albino rats, for it was collected aerial parts of the plant species, were taken to dryness at room temperature, pulverized in a mill, and then underwent hydroalcoholic maceration for 15 days, then filtered and took bath at 35-40 °C obtained as a result of the dry hydroalcoholic *Achyroclinealata*. Then the following tests were performed: Benedict, ninhydrin, ferric chloride, Shinoda - Ammonia, gelatin-salt, Dragendorff - Mayer, Afrosimétrico, Liberman-Burchard, Borntrager, as Dominguez.

To determine the cholesterol-lowering effect involved 30 male albino rats Holtzmann strain with an average weight of 180 ± 20 grams from the National Institute of Health (Lima, Peru), with 5 days prior conditioning with food and water ad libitum. Hypercholesterolemia was induced, whereas the method used by Arroyo, with pure cholesterol administered orally at a dose of 62.5 mg / kg suspended in 2% gum tragacanth. We worked with five groups of six rats, a group without induction of hypercholesterolemia, another with induction and untreated, and the other three groups were treated with different doses of hydroalcoholic dry *Achyroclinealata* (100, 250 and 500 mg / kg) administered orally for 60 days. Subsequently blood samples were drawn to assess the level of total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides according to the method of VALTEK enzymatic kit. Additionally, histological cuts of the aorta in heart samples to observe the effects of the dry hydroalcoholic this tissue.

The model UP DOWN toxicity consisted of taking a female rat per dose up to a dose limit of 2000 mg / kg observing whether the experimental animals showed any signs of toxicity. Data were submitted to analysis of variance followed by Tukey test for differences between groups. It is considered that there are significant differences at $P < 0.05$.

The phytochemical study found large amount of phenolics and flavonoids in the extract hydroalcoholic *Achyroclinealata*.

In the statistical analysis, according to ANOVA (analysis of variance) significant differences in the measurement of total cholesterol ($p < 0.05$) and LDL cholesterol ($p < 0.05$), ie the hypothesis is accepted, the species significantly reduces *Achyroclinealata* levels of total cholesterol and LDL cholesterol, triglycerides and HDL unlike cholesterol, in which the extract has no effect. Only fatty

deposits occur both as the positive control group at a dose of 500 mg / dl, which is associated with increases in total cholesterol and LDL cholesterol, this means the initiation of atheroma formation, which as it passes the time lead to a partial closure of the artery, causing in most cases heart disease. Regarding the acute toxicity is considered as non-toxic dry matter.

KEYWORDS: cholesterol-lowering cholesterol, caffeic acid, atheromas.

INTRODUCCION

Desde tiempos pasados el hombre ha buscado solución a sus enfermedades utilizando la flora y fauna de su entorno, y por ello al ir experimentando con diferentes sustancias que la naturaleza le proveía, este conocimiento fue pasando de generación en generación hasta nuestros tiempos en los que la ciencia y la tecnología han tenido un avance sorprendente, motivo por el cual la ciencia nos ayuda a investigar sobre las diferentes propiedades que se le atribuye a las diferentes especies vivas.

Achyroclinealata, "Huiru Huiru", "Wirawira" o "Vira vira" es una especie vegetal nativa perteneciente a la familia de las Asteraceas y cuyo nombre común es de origen quechua, que fue recolectada a las alturas descritas en bibliografía (Femenía Hugo, 2002); dentro del Departamento del Cusco, y cuyas características intrínsecas de la especie ayudan a su reconocimiento dentro de la flora regional. Según Jorge Hugo Femenía quien comenta sobre dicha especie vegetal y sus propiedades en su artículo "Flora del Famatina": "Los mapuches la emplean para los daños de la vista y como expectorante" además para corregir trastornos digestivos.

El contenido fitoquímico que indica la presencia de ácidos cafeilquínicos, responsables del efecto hipocolesterolemiante en algunas especies vegetales, llevó a la determinación del efecto de manera experimental, para lo cual se utilizaron métodos previamente validados.

Es por eso que se ha planteado como objetivo principal determinar dicho efecto en ratas albinas, induciéndolas a hipercolesterolemia con colesterol puro y dosificado.

También se prueba en la determinación de la toxicidad aguda el método UP-DOWN recomendado por la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), mediante el cual y se prueba en los animales de experimentación hasta una dosis límite de 2000 mg/kg de peso y si en este caso existiera muerte del animal de experimentación se prueba en un grupo mayor dicha dosis, evitando así el sacrificio de muchos animales de experimentación.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO:

- **Preparación del extracto hidroalcohólico de *Achyroclinealata*.**

Hojas y tallos de *Achyroclinealata* (Huiru huiru) que se recolectó cerca al complejo arqueológico de Sacsayhuaman entre 3467 – 3489 m.s.n.m. (13° 30' 61" según GPS) perteneciente a la Provincia y Departamento del Cusco. La extracción se realizó en medio hidroalcohólico al 50%, para la cual se utilizó la planta seca y molida, y se sometió a un tipo de maceración por agotamiento de metabolitos.

ESTUDIO FITOQUÍMICO

Para determinar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios se realizaron pruebas químicas de caracterización (reacción de Dragendorff, reacción de Shinoda, prueba de la espuma, reacción del tricloruro férrico, reacción de la gelatina, reacción de Lieberman-Burchard, reacción de laNinhidrina y Borntrager), según Dominguez.

MODELO EXPERIMENTAL

EFFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE

La prueba experimental inició con la inducción de la hipercolesterolemia, pudiendo ser iniciada junto con la administración del extracto seco, o 30 días antes. Para el protocolo se utilizaron 05 grupos de seis animales, uno de control y otro blanco, y los otros tres con dosis ascendentes.

Se utilizaron 30 ratas albinas machos cepa Holtzmann con peso promedio de 180 ± 20 gramos procedentes del Instituto Nacional de Salud (Lima, Perú), con condicionamiento previo de 48 horas, con agua y alimento a libertad.

La hipercolesterolemia fue inducida considerando el método seguido por Arroyo con modificación en la forma de administración del colesterol, que fue por vía oral en dosis de 62,5 mg/kg suspendido en goma tragacanto al 2% durante el primer mes.

Se trabajó con cinco grupos de seis ratas cada uno, al grupo control negativo no se le indujo hipercolesterolemia y a los otros cuatro sí; tres de ellos recibieron tratamiento con diferentes dosis del extracto del extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (100, 250 y 500 mg/Kg) los siguientes 60 días, la administración fue en forma simultánea junto al colesterol.

TOXICIDAD AGUDA

Se utilizó el modelo experimental de toxicidad aguda UP-DOWN (OCDE 425) con dosis única, tomando como dosis límite 2000 mg/ kg de peso.

Se observa si hay muertes en las próximas 24 horas.

MEDICION DEL EFECTO HIPOCOLESTEROLMIANTE

Luego de los 60 días se extrajeron las muestras de sangre para determinar los valores de Colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol y Triglicéridos, mediante el método enzimático elegido por el laboratorio. Adicionalmente, se realizaron cortes histológicos de arteria aorta para observar los efectos del extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (Huirá Huirá).

RESULTADOS Y ANALISIS

El análisis fotoquímico se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 01: Analisis fitoquímico del extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (Huirá huirá)

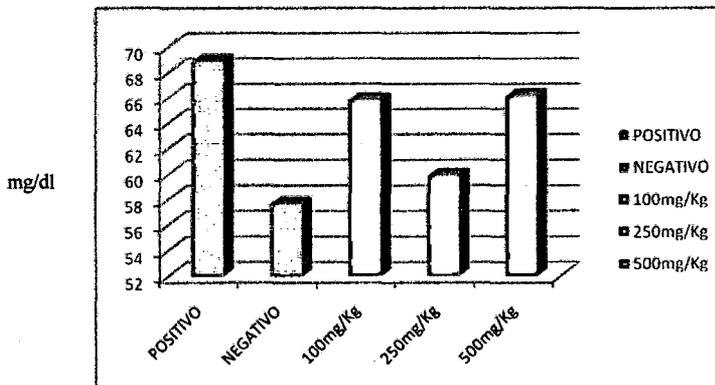
Metabolito secundario	Reactivo	Extracto Hidroalcohólico
Azucares Reductores y Glucósidos	Benedict	+--
Aminoácidos	Ninhidrina	--
Comp. Fenólicos	Cloruro férrico	+++
Flavonoides	Shinoda - Amoniaco	+++
Taninos	Gelatina-sal	--
Alcaloides	Dragendorff-Mayer	--
Saponinas	Afrosimétrico	--
Triterpenoides y Esteroides	Liberman-Burchard	+--
Antraquinonas-Naftoquinonas	Borntrager	+--

Al observar los resultados se denota gran cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos que fueron caracterizados por los reactivos de Shinoda y cloruro férrico respectivamente, en el extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (Huirá Huirá)

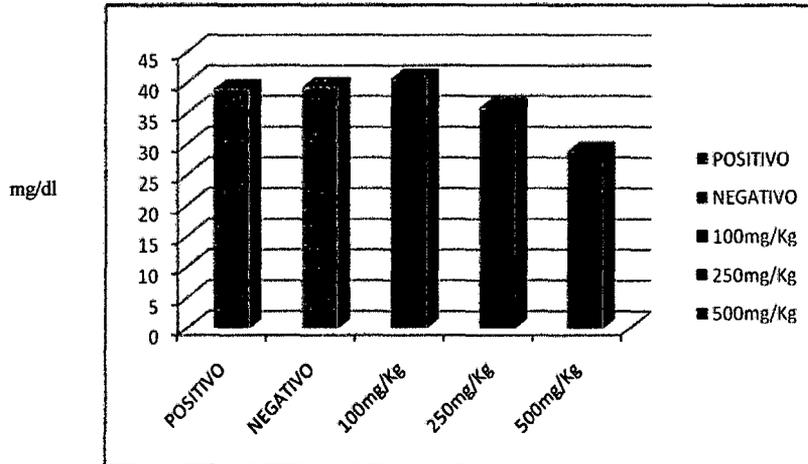
Los datos de hipercolesterolemia y lipoperoxidación fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey, para buscar diferencias significativas entre los grupos. Se consideró que existe diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Los resultados de los experimentos son presentados como la media \pm el error estándar.

EFECTO HIPOCOLESTEROLEMIANTE

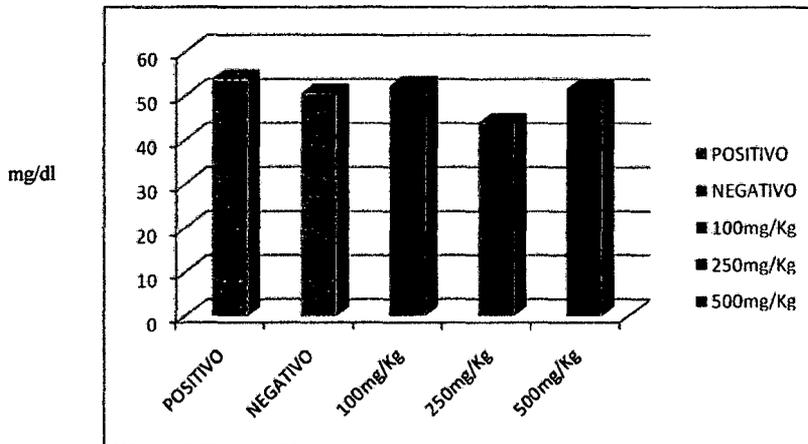
A. COLESTEROL TOTAL



B. HDL COLESTEROL



C. LDL COLESTEROL



D. TRIGLICERIDOS

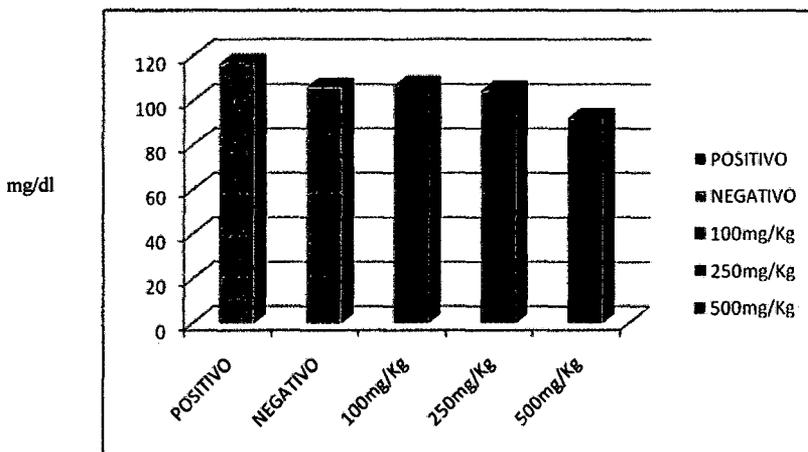


Figura 1: Efecto de la administración del extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (Huiria Huiria) en ratas albinas

Según la figura se tiene como resultado en la cuantificación del Colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos- colorimétricos, observándose que el efecto hipocolesterolemiante del extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyroclinealata* (Huiria huiria), es efectivo a la dosis de 250 mg/Kg, disminuyendo el COLESTEROL TOTAL en un 13.12 %, el LDL COLESTEROL en un 18.64 % y es estadísticamente significativo (ANOVA $p < 0.05$) en ambos casos.

Sin embargo no se obtuvo el efecto deseado para HDL COLESTEROL ni TRIGLICERIDOS (ANOVA $p > 0.05$).

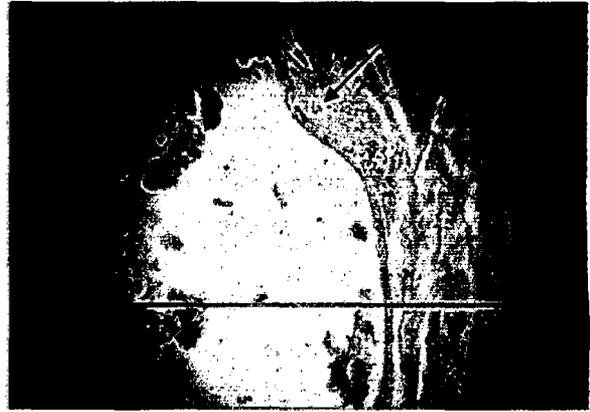


Figura 2: Depósitos grasos en muestras histológicas de corazón de ratas albinas (Grupos: CONTROL POSITIVO y 500 mg/Kg)

TOXICIDAD AGUDA

Al realizar los ensayo de toxicidad aguda por el método UP-DOWN con dosis límite de 2000 mg/Kg, se observó que el extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* es atóxico.

CONCLUSIONES

1. Se determinó que el efecto hipocolesteremiante del extracto seco hidroalcohólico al 50 % de *Achyroclinealata* (Huirá Huirá) con una dosis efectiva de 250 mg/Kg, para COLESTEROL TOTAL Y LDL COLESTEROL. Así también se evaluó la toxicidad aguda, mediante el método UP-DOWN, a una dosis límite de 2000 mg/Kg determinándose que el extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* es atóxico en ratas albinas hembras cepa Holtzman.
2. Se obtuvo el extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyroclinealata* (Huirá huirá), por maceración, con un porcentaje de rendimiento de 16.2%. Además en el análisis fitoquímico cualitativo se denotó mayor cantidad de ácidos fenólicos y flavonoides en el extracto.
3. Se cuantificó el Colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos- colorimétricos satisfactoriamente. Llegándose a la conclusión; que el efecto hipocolesteremiante del extracto seco hidroalcohólico al 50% de *Achyroclinealata* (Huirá huirá), es efectivo a la dosis de 250 mg/Kg, disminuyendo el COLESTEROL TOTAL en un 13.12 %, el LDL COLESTEROL en un 18.64 % y TRIGLICERIDOS en 10.35 %.
4. Se realizó el análisis histopatológico en las muestras de corazón de cada grupo de animales de experimentación (ratas), hallándose depósitos grasos tanto en el grupo control positivo así como en el grupo de 500 mg/Kg. Sin embargo en los demás grupos no se encontró nada relevante, confirmándose así el efecto hipocolesteremiante del extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (Huirá huirá).
5. Se seleccionó como dosis límite; 2000 mg/Kg del extracto seco hidroalcohólico de *Achyroclinealata* (Huirá huirá) para la toxicidad aguda (UP - DOWN), debido a antecedentes sobre la toxicidad aguda de dicha planta, no presentando signo de toxicidad en los animales de experimentación.
6. Se realizó el análisis histopatológico en las muestras de hígado de los animales de experimentación, no hallándose vestigios de toxicidad aguda en el órgano blanco.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso, Juan Ignacio (2000). DICCIONARIO ELECTRÓNICO ESPASA DE MEDICINA. Espasa Calpe. España.
2. Anguiano, Rueda C. (1992). DICCIONARIO DE CIENCIAS MÉDICAS. Editorial El Ateneo. Novena Edición. Argentina.
3. Azzimonti, Renzo J. C. (2000). BIOESTADÍSTICA APLICADA A BIOQUÍMICA Y FARMACIA. Editorial Universitaria. Segunda Edición. Argentina.
4. Beers, M.D Mark H. (1999). MANUAL MERCK. Editorial Harcourt. Décima edición. España.
5. Coma, Canella Isabel. (1991). EL COLESTEROL Y EL INFARTO. Editorial RIALP. España. 1991.
6. Domínguez, X. A. (1979). MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA. Editorial Limusa. Segunda edición. México.
7. DORLAND (1998). DICCIONARIO MÉDICO ILUSTRADO. Editorial Mc Graw - Hill. Veinticincoava edición. México.
8. Gaw Allan (2001), BIOQUÍMICA CLÍNICA. Editorial Harcourt. Segunda edición. Perú.
9. Gisbert, Calabuig Juan Antonio (1999), MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGIA. Editorial Masson S.A. Quinta edición. España.
10. Govantes, B. Jesús-Lorenzo F. Pedro-Govantes E. Carlos (1999). MANUAL NORMON. Editorial LABORATORIOS NORMON S.A. Séptima edición. España.
11. Mc. Phee, Stephen J., PapadakisMaxine A. (2010), DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO MÉDICO 2010. Editorial Mac Graw Hill. México.
12. Milikowski, MD Clara (2001). ATLAS DE HISTOPATOLOGÍA. Editorial Marbán. Primera edición. España.
13. Nelson, David L., Cox M. Michael, (2000) PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA LEHNINGER. Editorial Omega. Cuarta edición. España.
14. Pacheco Leal, Daniel (2001). BIOQUÍMICA ESTRUCTURAL Y APLICADA A LA MEDICINA – Editorial Del Instituto Politécnico Nacional. Primera edición. México.
15. Petenatti, Elisa M., Nievas, Carlos M., Petenatti Marta E., y Luis A. del Vito (2004). MEDICAMENTOS HERBARIOS EN EL CENTRO-OESTE ARGENTINO. “MARCELAS” Y “VIRA-VIRAS” EN MUESTRAS COMERCIALES. Acta Farm. Bonaerense 23 (4): 484-91.
16. Ruiz, Lara Rafael (1989). DICCIONARIO MEDICO TEIDE. Editorial TEIDE S.A. España. Cuarta Edición. 1989.
17. Runge, Marschall S., Ohman Magnus (2004). NETTER CARDIOLOGÍA. Editorial Masson. Primera edición. España.
18. Sherry, Eugene, Wilson Stephen F. (2002) MANUAL OXFORD DE MEDICINA DEPORTIVA. Editorial Paidotribo. Primera edición. España. 2002.
19. Tealdi, Juan Carlos (2008). DICCIONARIO LATINOAMERICANO DE BIOÉTICA - UNESCO. Cuarta edición. Colombia.
20. Tierney, M. Lawrence, Mc. Phee Stephen J., PapadakisMaxine A. (2006), DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y TRATAMIENTO. Editorial Manual Moderno. Cuarentiunava edición. México.
21. Trigo, Tavera, Francisco (2002), PATOLOGÍA GENERAL VETERINARIA. Editorial Universitaria. Cuarta edición. México.
22. Valencia, O. Ciria (1995). FUNDAMENTOS DE FITOQUÍMICA. Editorial Trillas. Primera edición. México.
23. Villar del Fresno, Angel M. (1998) FARMACOGNOSIA GENERAL. Editorial Síntesis. Segunda edición. España.
24. Villena, Tejada Magaly (2009), MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA. Perú.
25. Wallach, M.D. Jacques (2009), INTERPRETACIÓN DE TEST DE DIAGNÓSTICO. Editorial WoltersKluwer. Octava edición. España.

PAGINAS ELECTRONICAS

1. Cáceres, Pílares José. 1999. Sistema de Bibliotecas del universidad Nacional de San Marcos – *Niveles de Colesterol en pobladores de altura – Cusco*.
http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/situa/1999_n13/niveles.htm (Con acceso el 31 de enero del 2011)
2. Cáceres Pílares José. 2004. Sistema de Bibliotecas de la universidad Nacional de San Marcos - *Colesterol total y sus fracciones en adultos de 30 a 39 años, según género y sub-grupos de edad: Cusco*.
sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/situa/2004_n2/Pdf/a03.pdf(Con acceso el 31 de enero del 2011)
3. DIRESA Cusco. 2010 – Departamento de Estadística, Informática y comunicaciones- *“Principales causas de morbilidad: 2006 - 2010”*.
<http://www.diresacusco.gob.pe/estaditica/modulo1/morbilidad.htm> (Con acceso el 25 de Noviembre del 2011)
4. Hugo Femenia, Jorge. 2009. *Flora del Famatina*.
www.diariochilecito.com.ar/articulo/6582.html (Con acceso el 11 de enero del 2011)
5. Medina Tovar Sandro (2009). *Elevados niveles de colesterol en la población de Lima*. Diario El Comercio.
<http://elcomercio.pe/impresia/edicion/2009-02-19/ecvfl90209a13> (Con acceso el 15 de Marzo del 2011)
6. Nardini M., E. Cirillo, F.Natella, C.Scaccini (2002), *La Absorción de los ácidos fenólicos en humanos después del consumo de café*.
<http://www.Lacienciadelcafe.com.ar> (Con acceso el 21 de enero del 2011)
7. OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (2008) – *Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)* – TG. 425.
<http://www.oecd.org/dataoecd/17/51/1948378.pdf>(Con acceso el 20 de Febrero del 2011)
8. Zúñiga, M. Jesús (2010). Portal de veterinaria – ONLINE (2010). *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*.
<http://mimic.uab.es/~veteri/00009/> (Con acceso el 15 de mayo del 2011)

9. Vettorazzi, G. (2011), *Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas. PROGRAM# INTERNACIONAL DE SEGURIDAD DE LAS SUSTANCIAS QUIMICAS. OMS – GINEBRA - SUIZ#*. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_576_spa.pdf (Con acceso el 31 de enero del 2011).
10. Scribd (2011); *Apuntes de tecnología de mecanismos*. <http://www.scribd.com/doc/3954415/Apuntes-de-Tecnologia-de-mecanismos> (Con acceso el 10 de enero del 2011).