Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Actividad antitusiva del extracto acuoso liofilizado de flores de Cosmos peucedanifolius Wedd. (Panti panti) en cobayos, investigación toxicológica en ratones

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Viviana Rita JAHUIRA HUARCAYA

ASESORES

Dr. Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Dr. José Ernesto RAEZ GONZÁLEZ

Lima, Perú

2010



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Jahuira, V. Actividad antitusiva del extracto acuoso liofilizado de flores de Cosmos peucedanifolius Wedd. (Panti panti) en cobayos, investigación toxicológica en ratones. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2010.

DEDICATORIAS

A la memoria de mis padres Miguel y Teodora, quienes en vida enseñaron que el logro de un objetivo de trabajo es a base de perseverancia, dedicación y fuerza de voluntad, asumiendo la labor con responsabilidad y armonía.

A mi hermano Faustino por creer y confiar siempre en mi, apoyándome en todas las decisiones que he tomado en mi vida; y motivación constante para la culminación del trabajo de investigación.

A mis hermanas: Genoveva, Narcisa, Antonia y Estela por su comprensión y colaboración que de una u otra forma han contribuido para la finalización del presente trabajo

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceras muestras de agradecimiento a los asesores del presente trabajo de investigación:

Al Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera (Profesor de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica) Por su incesante apoyo en orientar, guiar y disponer su tiempo permanente.

Al Dr. José Ernesto Raez González (Director de la Escuela de Post Grado de la Facultad de Medicina Humana) por su constante ayuda en los estudios, transmisión de amplio conocimiento y experiencia, demostrando interés en orientar el trabajo de investigación experimental.

Durante el tiempo transcurrido de elaboración del trabajo, hubo Docentes en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina- UNMSM especialmente Dr. Jorge Arroyo Acevedo, quienes contribuyeron con su apoyo al desarrollo de la investigación. Al Sr. Ernesto Sonco por su ayuda técnico y siempre disposición de tiempo. Desde aquí reflejo toda la gratitud. No sería posible la culminación de este trabajo de investigación sin ellos.

ÍNDICE

	Resumen	Pag.
	Abstract	
	Resumo	
I	Introducción	1
II	Generalidades	3
2	Antecedentes de estudio	3
2.1	Descripción botánica de la especie en estudio	3
2.2	Habitat y descripción geográfica de la especie en estudio	4
2.3	Bioagricultura	5
2.4	Investigación fitoquímica	6
2.5	Investigación farmacológica	7
2.6	Investigación toxicológica	8
2.7	La tos	10
2.7.1	Mecanismo de acción de la tos	11
III	Parte experimental	13
3.1	Materiales y métodos	13
3.2	Metodología	14
IV.	Resultados	21
V.	Discusión	33
VI.	Conclusiones	45
VII.	Referencias Bibliográficas	46
VIII.	Anexos	53

RESUMEN

El objetivo del estudio del extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd (panti panti) fueron: identificar metabolitos secundarios; demostrar la actividad antitusiva, vía oral en ***Cavia porcellus*** –cobayos; evaluar toxicidad aguda; subcrónica y análisis histopatológico en órganos del ratón, a fin de determinar su inocuidad. El estudio fitoquímico del extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd se realizó mediante la marcha fitoquímica según O. Lock, 1994, encontrándose metabolitos secundarios como flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, alcaloides, saponinas, esteroides, triterpénicos, lactonas sesquiterpénicas, glúcidos, y aminoácidos. Luego, se efectuó la separación de los metabolitos secundarios predominantes en cromatografía de capa fina utilizando diferentes solventes orgánicos y se elucidó las estructuras químicas por espectrofotometría UV-visible, como resultado se determinaron presencia de flavonas. La actividad antitusiva del extracto acuoso liofilizado de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd se evaluó a través del método de Ulcelay et al. (1991). Se observó que con dosis de 1000mg/kg produjo una reducción de eventos tusivos 84,6% mayor que la codeína fosfato cuya dosis de 10mg/kg produjo 74,6% de inhibición de toses. Por otro lado, la aplicación de las dosis de 500 y 250mg/kg condujo a inhibiciones de 58.1%, y 50,1% los cuales resultan ser mayores a la aplicación del control negativo (suero fisiológico a 5mL/kg) cuya acción apenas llega a 32.8%. La evaluación de la toxicidad aguda en ratones realizada por el método de la clase toxica aguda 423, a las dosis de 25, 200 y 2000mg/kg, el análisis de leucocitos con coloración Wright y el estudio histopatológico por el método Hematoxilina - Eosina no mostró toxicidad aguda. Finalmente, se evalúo toxicidad subcrónica a las dosis de 250, 500 y 1000mg/kg. con el método dosis repetida 90 días 408 OECD, como resultado no se evidenció alteraciones histopatológicas por lo tanto no presentó toxicidad subcrónica. En conclusión el extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd mostró contenido de flavonas presumiendo sean responsables de la actividad antitusiva, con respecto a la toxicidad aguda y subcrónica no se evidenciaron ni acompañaron signos de algún grado de toxicidad.

Palabras clave: ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd, actividad antitusiva, toxicidad aguda y subcrónica

ABSTRACT

The objective of the study of freeze dried aqueous extract of the flowers of ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd (panti panti) was: to identify secondary metabolitos; show antitussive activity oral guinea pig ***Cavia porcellus***, assess acute toxicity, subchronic and histopathological análisis of mouse organs in order to determinate it's safety. The phytochemical study of freeze-dried extract of flowers of Cosmos peucedanifolius Wedd was made by phytochemical as O. Lock 1994, finding secondary metabolites such as flavonoids, phenolics compounds, tannins, alkaloids, saponins, steroids, triterpenic, sesquiterpens lactons, carbohydrates, and amino acids. Then, was carried out separating the predominant secondary metabolites in thin layer chromatography using different solvents and chemical structures were elucidated by UV-visible spectrophotometry, as a result were determined the presence of flavones. The antitussive activity of lyophilized aqueous extract of ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd was evaluated by the method of Ulcelay et al. (1991). It was noted that a dose of 1000mg/kg was a reduction in events tusivos 84.6% higher than codeine phosphate dose of 10mg/kg produced 74.6% inhibition of coughs. Moreover, the application of doses of 500 and 250mg/kg led to inhibitions of 58.1% and 50.1% of which turn out to be greater than the application of negative control (saline 5mL/kg) whose only action reaches 32.8%. The evaluation of acute toxicity in mice by the method of the acute toxic class-423 at doses of 25, 200 and 2000mg/kg, the analysis of leukocytes with Wright staining and histopathological study by the method Hematoxylin - Eosin showed no acute toxicity. Finally, subchronic toxicity was evaluated at doses of 250, 500 and 1000mg/Kg. with the method repeated-dose 90 days-408. OECD, as a result showed no histopathological alterations therefore not subchronic. In conclusion, freeze-dried aqueous extract of flowers of ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd showed predominantly flavones content are assuming responsibility for antitussive activity, regarding acute and subchronic toxicity showed no signs or accompanied by some degree of toxicity.

Key words: ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd, antitussive activity, Acute and subchronic toxicity.

RESUMO

O objetivo do estudo da liofilização do extrato Aquos ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd (panti panti) foram: to identify secondary metabolites; mostram atividade antitussígeno, oral-guiné porco ***Cavia porcellus***; avaliar a toxicidade acute, subchronic and análise histopatológica em órgãos do rato a fim de determinar sua segurança. O estudo fitoquímico de liofilizado de extrato aquos de flores de Cosmos peucedanifolius Wedd foi feita por marcha fitoquímico de acordo O. Lock, 1994 encontrando metabólitos secundários como flavonóides, compostos fenólicos, taninos, alcalóides, saponinas, esteróides, triterpenos, lactonas sesquiterpênicas, carboidratos e aminoácidos. Então ele fez a separação dos metabólitos secundários predominante em cromatografia em camada fina utilizando diferentes solventes orgânicos e estruturas químicas foram elucidadas por espectrofotometria UV-visível, como resultado foi determinada a presença de flavonas. A atividade antitussígeno do extrato aquoso liofilizado de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd foi avaliada pelo método de Ulcelay et al. (1991). Notou-se que uma dose de 1000mg/kg-se uma redução em eventos tusivos 84,6% maior do que a dose de fosfato de codeína 10mg/kg como o óleo produzido 74,6% de inibição da tosse. Além disso, a aplicação de dose 500 e 250 mg/kg conduziu à inibição de 58,1% e 50,1% das quais acabam por ser maior do que a aplicação do controle negativo (salina 5mL/kg) cuja acção chega 32,8%. A avaliação da toxicidade aguda em ratos pelo método da classe de toxicidade aguda-423, em doses de 25, 200 e 2000mg/kg, a análise dos leucócitos com estudo histopatológico e coloração de Wright pelo método de Hematoxilina - Eosina não apresentaram toxicidade aguda. Finalmente, subcrónica foi avaliado em doses de 250, 500 e 1000mg/kg. com o método de repetir a dose 90 dias-408. OCDE, como resultado não apresentou alterações histopatológicas, por tanto, não subcrônica. Em conclusão, liofilizados extrato aquoso de flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd mostrou conteúdo predominantemente flavonas estão assumindo a responsabilidade para a actividade antitussígeno, com relação à toxicidade aguda e subcrônica não mostrou nenhum sinal ou acompanhado por algum grau de toxicidade.

Palavras chave: ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd, atividade antitussígeno, toxicidade aguda e subcrônica.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace miles de años, el hombre ha transmitido el conocimiento empírico de medicina tradicional, como expresa Shen Nung, quien ha estudiado, probado y fundamentado las propiedades medicinales de cientos de hierbas utilizadas en el tratamiento de enfermedades desde épocas antiquísimas 2696 a.C [(1)].

Esta tendencia de uso de hierbas naturales estudiada hoy por la etnociencia viene validando el comportamiento medicinal y el uso adecuado de estos recursos en beneficio de la salud del hombre, por ello, la OMS en la actualidad recomienda el uso de las plantas medicinales, como acto de aplicación directa en la atención primaria de los sistemas de salud, basados en estudios científicos que demuestren calidad, efectividad y seguridad sobre la salud de los seres humanos [(2).] Noción que ha motivado la ejecución del presente estudio teniendo como precedente empírico el uso de la especie de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd- panti panti como hierba medicinal para el tratamiento de la tos en la población rural altoandino del país.

La tos, síntoma causado por infección respiratoria tiene una etiología diversa, pudiendo ser provocada por factores extrínsecos como la exposición del individuo a temperaturas bajas, falta de abrigo, vivienda, por factores intrínsecos como la susceptibilidad biológica del individuo a infección vírica, bacteriana y otros factores epidemiológicos propios de la enfermedad. Sin embargo, su prevalencia e incidencia ha tomado cada vez más importancia no solo a nivel nacional sino también en el contexto internacional. Así, se conoce que en Estados Unidos la tos provocada por infección respiratoria viral es la principal causa de consulta médica, y en nuestro país sobre todo de la zona alto andina, la infección respiratoria regularmente van en aumento requiriendo necesariamente contar con mayor disponibilidad de medicamentos para la atención de su demanda creciente [(3)].

El concepto de la tos considerado en el pasado como un signo o síntoma de las enfermedades del aparato respiratorio; ha producido en los últimos años cambios que incluye el proceso mismo de su ocurrencia, esto se debe a la nueva tendencia de análisis integral e inmunohistoquímica y pruebas en el área de neurofisiología respiratoria que ha permitido transformar un concepto exclusivamente diagnóstico a la tos, resultante como expresión semiológica de la patología respiratoria, en una visión más funcional como un proceso necesario en los mecanismos de defensa respiratoria [(4)]

En nuestro país, esta nueva forma de expresión semiológica ha tomado mayor importancia en los últimos años, ya que la estadística nacional demuestra que las infecciones respiratorias constituyen la prevalencia de enfermedad más importante, en tanto, instituciones como Ministerio de Salud - MINSA reportan 11,23%. Y otros casos análogos reportados 9,59% por consultorios de ESSALUD hacen que la enfermedad respiratoria sea una preocupación importante del sector salud y de la población [(5)].

Esta problemática agravada en las zonas altoandinas del país, principalmente en la región de Puno ha demostrado que las causas de mortalidad durante el año 2004 hayan estado lideradas por la Influenza (gripe) y la neumonía llegando esta estadística al 26% [(6)].

Esta información muestra claramente la necesidad de buscar alternativas de tratamiento a la tos y a las enfermedades respiratorias, motivo por el cual en el marco de la medicina tradicional nos proponemos estudiar las propiedades y bondades del extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd -panti panti con los objetivos de: a. Identificar algunos metabolitos secundarios y observar su probable relación con la actividad antitusiva. b. Demostrar la actividad antitusiva en cobayos (***Cavia porcellus)*** expuestos a nebulización de ácido cítrico al 20% y por ende a la provocación de la tos. c. Evaluar la toxicidad aguda y subcrónica del extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd administrados a ratones albinos buscando dilucidar su inocuidad. Estas razones motivaron la ejecución del trabajo que están ligadas al esclarecimiento del conocimiento respecto a la reducción de eventos tusivos su probable relación con los metabolitos secundarios e incluso dispensación eficiente de las flores de panti panti en los sistemas de tratamiento médico alternativo, los cuales esperamos validarla de manera científica estableciendo a la vez su inocuidad.

II. GENERALIDADES

2. ANTECEDENTES DE ESTUDIO

El género ***Cosmos*** del cual forma parte el ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd pertenece a la familia Asteraceae. Este es un género pequeño que agrupa a 34 especies. La mayoría de las especies crecen en México pero su distribución geográfica se extiende desde los Estados Unidos de Norteamérica hasta Perú y Bolivia. Sus inflorescencias (cabezuelas) son muy vistosas, lo que convierte a estas plantas como elementos de ornato [7].

Perú y Bolivia son los países que emplean las flores de panti-panti como tratamiento medicinal consumida como infusión para la tos y resfríos [8, 9], sin embargo en nuestro medio esta planta desde el punto de vista medicinal carece de estudios fitoquímicos, farmacológicos y toxicológicos.

2.1 DESCRICIÓN BOTANICA DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

Cosmos peucedanifolius Wedd adopta diversos nombres comunes en ámbitos geográficos diferentes, así en nuestro país, sobre todo en las zonas de Puno, Cuzco, Cajamarca, Junín, Huancayo, Huancavelica se la conoce con el nombre popular de panti panti o simplemente panti; en otros países como México es conocida con el nombre de girasol, o cosmos palabra que se origina del término griego "κόσμος", que significa orden u ornamentos entendida como la antítesis del caos [10]. En Corolina del Norte –EEUU esta especie se conoce con el nombre de Girasol morado, mirasol hidalgo. Planta herbácea, anual, raíz, tallo, florífero alargado; hojas pinnetisectas de borde dividido. Inflorescencia en capitulo solitario. Las flores radicales son liguladas, cáliz membranoso, corola ligulada de color lila y las tubulares son pentadentados, androceo con 5 estambres, con ovario, fruto en aquenio (seco y no se abre). Hierba de 30 cm. de Alto [11].

Esta especie es rústica y prefiere suelos francos bien drenados. Florece desde la primavera hasta principios de otoño y se mantiene durante todo el verano. La especie es relativamente abundante en su rango de distribución; aparentemente fuera de peligro, puede usarse exclusivamente como especie ornamental como macizos en centros de parques, avenidas, patios y jardines [12].

2.2 HABITAT Y DESCRIPCIÓN GEOGRÁFICA DE LA ESPECIE EN ESTUDIO

En el Perú la especie de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd se encuentra en la Sierra Andina entre los 2500 a 4500 m.s.n.m., en los departamentos del sur como Puno, Cuzco, Tacna, Arequipa, las flores son conocidas por sus propiedades antitusivas que proviene desde civilizaciones precolombinas tipificadas como culturas ecológicas que lograron convivir de manera respetuosa con la naturaleza [13].

También la especie se encuentra en otros ámbitos geográficos como los andes centrales de Quílcas, departamentos de Huancayo y Junín [14], en la Microcuenca del río Pachachaca-Huancavelica [15] y en el departamento de Cajamarca en la cordillera de tarros- Cutervo.

En el ámbito internacional se encuentra expandida desde América central hasta Argentina [16]. En Bolivia es identificada como ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd variedad ***tiraquensis*** (Kuntze) Sherff [17]. fig.1 conociéndose además que especies similares a su familia han sido tipificadas como ***Bidens peucedanifolia,*** variedad ***cochabambensis*** **Kuntze**; ***Bidens peucedanifolia,*** variedad ***soratensis*** **Kuntze;** ***Bidens peucedanifolia*** variedad ***tiraquensis*** **Kuntze;** ***Cosmos integrifolius*** Wedd [18].

En Estados Unidos y particularmente en Carolina del Norte es conocida con el nombre de ***Cosmos bipinnatus Cav,*** tiene una floración entre los meses de julio a octubre [19]. fig. 2**,** mientras que en México se identifica como ***Cosmos bipinnatus*** [20]. fig. 3 distribuida en la Costa y Sierra en altitudes que oscilan entre 500-3200 m.s.n.m.



Fig. 1 ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd. var. **tiraquensis** (Kuntze) Sherff . Bolivia [17]



Fig.2 ***Cosmos bipinnatus Cav.*** Se encuentra en Carolina del Norte., 9-29-02. [19]



Fig.3 ***Cosmos bipinnatus.*** México [20]

2.3 BIOAGRICULTURA

En la sierra peruana y particularmente en el altiplano de Puno, ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd es considerada una planta silvestre, crece en temporada de lluvia (diciembre a abril), por ello la recolección de flores y semillas se lleva entre abril y mayo. Su reciente cultivo esta siendo aplicado y dirigida a cosechar flores en buen estado de calidad para uso medicinal.

En México la planta es sembrada en el mes de mayo a una pulgada de profundidad, su manejo aun no tecnificada de forma completa, coloca trasplantes en jardines después de todo peligro de heladas, desarrollando así hasta 3 o 4 pies de altura. Su cultivo aparece como una actividad sencilla ya que se resiembran por sí mismos de forma natural, sobre todo cuando hay riego regular [21].

El cultivo tradicional se produce haciendo uso de semilla con tratamiento pre-germinativo, es decir en remojo con agua fría por 24 horas, produciéndose la germinación entre 8 a 14 días, debiendo realizarse esta operación al inicio del período de lluvias y con distanciamientos de 0.5 a 1 m entre plantas [12].

2.4 INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA

En el ámbito de investigación fitoquímica, la carencia de estudios sobre las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd -panti panti permitió revisar previos estudios de plantas medicinales con similar propiedad biológica antitusivo, así mismo la probable relación con la actividad antitusiva, es decir conocer el supuesto compuesto orgánico responsable que causa la inhibición de eventos tusivos; detallando a continuación las especies siguientes:

Thymus vulgaris *L.* (tomillo) contiene flavonoides, apigenina, ácidos fenólicos, triterpenos, saponina, serpelina, y aceite esencial 5%. Las propiedades de la planta incluye su poder antitusígeno eficaz y seguro además de sus cualidades de expectorante, la inhibición del crecimiento bacteriano, el efecto antiespasmódico y antiséptico, de modo que algunas indicaciones terapéuticas fueron aprobadas por la Comisión del Ministerio de Sanidad Alemán[22]. ***Origanum vulgaris L*** (orégano) en su composición química se encuentra flavonoides, apigenina, luteolol, esencias de timol y carvacrol, dihidroquersitina etc. [23]. Las flores de ***Tymus serpyllum L*** (serpol) contiene carvacrol, timol, presentando un predominio de aceites esenciales [24], y la ***Inula helenium*** (Enula o Helenio) contiene aceites ricos en lactonas sesquiterpénicas, mucílagos, flavonoides etc [25].

Otras especies como ***Tusílago farfara L***. (tusílago o farfara); ***Borago oficinales*** (borraja); ***Pulmonaria officinalis L***. (Pulmaria), las flores de ***Malva sylvestris L***. (malva); ***La Althaea officinalis*** (Malvavisco); La ***Tilia platyphyllos scop*** (tila) y ***Viola odorata*** (violeta), contienen flavonoides, alcaloides, glucosa, taninos, destacando metabolitos secundarios de los mucílagos [24].

Finalmente, especies que actúan a nivel del centro de la tos como la ***Papaver rhoeas L***., (Amapola) que contiene alcaloides isoquinoleínicos (0.05-0.10%). Roeadina, roeagenina, mucílagos que ejercen efecto sobre la mucosa respiratoria, inhibiendo el reflejo de la tos y bronquitis; produce una depresión del sistema nervioso central, disminuyendo el período de inducción del sueño. La raíz de ***Nelumbo nucifera gaertn*** (loto) contiene alcaloides (nuciferina, romerita, entre otros) actúa sobre el centro de la tos, mucolítico, expectorante y normalización de la función cardiorrespiratoria. ***Chelidoniun majus L*** (celidonia) tiene alcaloides derivados de la fenantridina (chelidonina es la principal) y derivados isoquinoléicos: protopina, este metabolito secundario le confiere propiedad antitusiva[25].

2.5 INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA

Estudios experimentales en especies de las plantas medicinales demostraron tener efecto antitusivo en cobayos, siendo destacadas las siguientes:

En Irán se investigo el efecto antitusivo de la especie ***Plantago lanceolada***. La tos fue producida por exposición a nebulización con solución acuosa de ácido cítrico al 0,1 g/mL durante siete minutos. Se utilizo extractos obtenidos por Soxhlet y maceración cada una de ellas a concentraciones de 2,5% y 5%; y codeína 0,03g/mL. Se demostró que a mayores concentraciones de 5% hubo una inhibición mayor en el número de toses (9,50±0,88 y 9,50±1,78) con respecto a concentraciones de 2,5% (11,65±0,94 y 11,63±1.51); no hubo diferencias significativas ($p<0,001$) entre los efectos de extractos en maceración y soxhlet comparado con la codeína-9.75±1,08 [(26)].

Otro estudio de la planta ***Rosa de Damascena*** demostró actividad antitusiva en cuyes. La tos fue producida por exposición a nebulización con solución acuosa de ácido cítrico. La investigación se realizo en dos extractos diferentes: extracto etanólico a concentraciones de 5% y 10% el número de eventos tusivos disminuyeron a 11,33±071 y 10,0±0,36; el extracto acuoso a las mismas concentraciones causó inhibición de toses a 13,83±0,60-10,66±0,49 respectivamente, en cuanto al efecto, ambas concentraciones frente a la codeína no se encontraron diferencias significativas $p<0,001$, aunque el extracto etanólico al 10% era perceptiblemente mayor que el extracto acuoso a la misma concentración [(27)].

Con el mismo protocolo anterior se realizo el efecto antitusivo en la especie de las flores de ***Nigella sativa***, se preparo cuatro diferentes extractos acuosos y macerados a concentraciones al 3,3% y 5%, así como también un extracto hervido de semillas al 5%, como control positivo utilizó la codeína a concentración de 0,03g/mL y solución salina control negativo. Los resultados mostraron que a concentración de extracto acuoso de 3,3% se ha reducido el número de eventos de toses a 10,00 ± 1,34 y extracto acuoso de 5% redujo 4,14 ± 1,58, mientras que el macerado de 3,3 % inhibió 10,00 ± 1,07 y de 5% a 5,71 ± 0,92 en tanto el extracto hervido al 5% disminuyó a 4,86 ± 1,62 y la codeína a 3,17 ± 2,01, todas las muestras incluida el control positivo comparados con el control negativo 17,43 ± 1,77 no fue significativamente diferente ($p<0,01$ y $p<0,001$, Igualmente las concentraciones acuosos, macerados y extracto hervido comparado con la codeína [(28)].

Finalmente en Brasil, investigaciones sobre efecto antitusivo de dos diferentes formulaciones fitoterapias conocidas en el mercado brasilero demostró que la solución fimatosan® tubo mayor inhibición de 71,3 ± 7,05 % que Abrilar® presentando 61,9 ± 7,14 %, comparados con el control positivo presento 84,2 ± 4,39 de clorhidrato de morfina a concentración de 1mg/kg^{-1}, no hubo diferencia significativa entre las formulaciones fitoterapias y el control ($p<0,05$) [29]. Como vemos, todos estos trabajos fueron realizados con el modelo propuesto en el presente trabajo. Además se utilizo de control la codeína fosfato debido que este medicamento fue catalogado como el mejor para el tratamiento de la tos según información de Meneghello [30].

2.6 INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA

No todas las plantas medicinales con efecto antitusiva tienen estudios toxicológicos, ni se conoce la clasificación del grado de toxicidad, sin embargo es necesario tener conocimiento sobre las dosis, efectos adversos y toxicidad que pudieron generar las plantas, siendo relevante mencionar algunas especies antitusivas con estudios toxicológicos descritos a continuación:

Toxicidad aguda del extracto liofilizado de ***Plecthranthus ambroinicus*** (Lour.) Spreng conocido con el nombre común Orégano, fue administrado en ratas Wistar vía oral a dosis 2000mg/kg como resultado se demostró la ausencia de mortalidad, no encontrándose alteraciones patológicas. En el estudio toxicológico subagudo reportó que se mantuvieron normales en los parámetros hematológicos y bioquímicas, catalogándola como no toxica a la planta en estudio [31].

Plantago lanceolada L. (llantén) Los ensayos de toxicidad aguda y subcrónica han demostrado que en ratas a dosis de 2g/kg, 300mg/kg y 900mg/kg/día no provocó toxicidad [32].

El ***Thymus Vulgaris L***. (tomillo) se debe tener precaución con la esencia puede dar lugar a reacciones alérgicas, sobre todo en niños y, a dosis elevadas presenta fenómenos convulsivos. Se recomienda no exceder la dosis oral en hojas secas de 10g y sobre todo que contengan fenol 0,03% (calculado como timol) por día, el timol a dosis altas puede causar toxicidad hepática, albuminuria y hematuria [33].

El ***Tusílago farfara L***. una hierba común usada en Japón con efectos contra la tos. Contiene el alcaloide senkirkina en concentraciones elevadas como 150 ppm (0,015%) es sumamente tóxico [34]. La ***Cassia grandis* L.** (Cañandonga) en Cuba se evaluó la toxicidad aguda oral, se

administro con dosis de 2 000 mg/kg de peso corporal en ratas *Wistar* de ambos sexos macho y hembra, se evidenció la no toxicidad a la dosis mencionada anteriormente. [35]

La ***Ephedrae herba*** (efedra) con propiedades biológicas antitusivo, antiasmática, también consumido como suplemento dietético, no obstante, algunos casos presenta vasculitis y miocarditis además, el principio activo efedrina eleva la glucemia, el consumo de esta droga por enfermos diabéticos, principalmente si se asocia con cafeína puede originar grandes problemas para el control de la enfermedad [36].

Actualmente, Estudios toxicológicos de las diferentes especies con propiedades antitusivas se aplican por método de la clase toxica aguda, y la toxicidad subcrónica, dosis repetida. 90 días.

La toxicidad aguda en ratas Wistar vía oral de extracto tánico de ***Pinus caribaea Morelet***, fue administrado a dosis de 2000mg/kg/día no observandose síntomas tóxicos ni mortalidad en el período experimental; considerándose no toxico de acuerdo a la clasificación de las clases de toxicidad de la Comunidad Europea [37, 38].

Así mismo, se estudió la toxicidad aguda oral del extracto fluido y vehículo hidroalcohólico de ***Mentha spicata L*** (hierba buena) determinaron Dosis Letal Media en ratones hembras con extracto fluido y vehículo hidroalcohólico a dosis 30, 50 y 70mg/kg. Se cuantificaron las variaciones del peso corporal y alteraciones patológicas. Se demostró que en ambos extractos no existieron diferencias significativas [39].

La especie ***Peperomia pell, Lucida*** (L.) H.B.K. (corazón del hombre) reportó toxicidad aguda a las dosis de 25, 200 y 2000 mg/kg., como resultados no se evidenciaron signos tóxicos ni muerte a 2000 mg/kg., por lo que la decocción de la especie mencionada se clasificó como no tóxica por vía oral [40].

Finalmente, en la investigación de toxicidad subcrónica del extracto acuoso liofilizado de las hojas y brotes florales de ***Stachytarpheta jamaicensis L***. (Verbena) demostró que los animales experimentados en grupos de 10 ratones tanto hembras como machos fueron administrados con 2000 mg/kg de dosis del extracto acuoso de las hojas, y a otro grupo de 10 animales con 1000mg/kg de las flores durante 90 días. Como resultado se obtuvo que las hojas del extracto causa el 40% de mortalidad en ambos sexos y con 1000 mg/kg del extracto acuoso de las flores no produjo mortalidad [41].

2.7 LA TOS

La tos es un mecanismo fisiológico de protección del aparato respiratorio no obstante, en enfermedades diversas se presenta como signo o síntoma. Tradicionalmente la tos ha sido categorizada a base de la duración del tiempo siendo estas, tos aguda considerada menos de 3 semanas, tos subaguda de 3 a 8 semanas y tos crónica mayor a 8 semanas; la tos aguda se puede distinguir por la descarga post goteo nasal causada por la gripe en el tracto respiratorio superior del área de infección [(42)]**.** Y la causa mas frecuente de la tos crónica esta dada por infección respiratoria: bronquitis crónica, asma, también se evidencian en pacientes que presentan enfermedad pulmonar crónica obstructiva (COPD), reflujo gastroesofágico (GERD), bronquiolitis y bronquiectasia entre otros [(43)]. La tos crónica se adapta como síntoma a enfermedades respiratorias crónicas pueden ser representadas en condiciones extrapulmonares, siendo difícil de controlar [(44)].

La ubicación anatómica de la vía aferente comprende el nervio vago y ramas del glosofaríngeo que llegan al centro de la tos, ubicado en el sistema nervioso central, a nivel de la médula oblonga. La vía eferente que comprende los nervios vago, frénico y espinales motores, que van a inervar faringe, diafragma, músculos de la pared torácica, músculos de la pared abdominal y del piso pélvico [(45)].

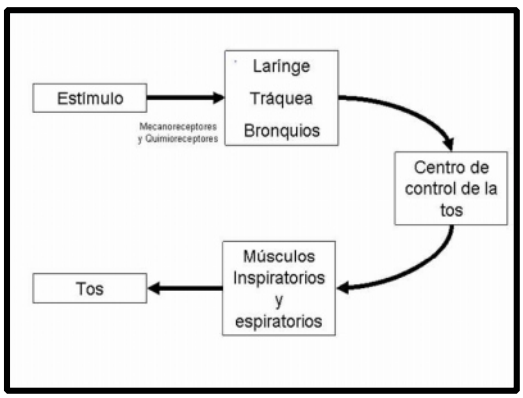


Fig. 4. Arco reflejo de la tos. El inicio de la respuesta de la tos es un estimulo [(46)].

La tos es una respuesta explosiva para eliminar el material en las vías respiratorias, esta se caracteriza por un proceso complejo de elementos reflejo aferente y eferente que requiere de un arco con componentes aferentes (receptores), un centro integrador y componentes efectores como se observa en la fig. 4 [(46)].

2.7.1 Mecanismo de acción de la tos

Para conocer las vías que regulan el reflejo de la tos han tenido que realizar de 5 a 10 pruebas de investigaciones en animales experimentales, entendiendo que los nervios aferentes de la vía vagal son las que regulan el reflejo de la tos. Las terminaciones del nervio vago aferente fueron encontradas abundantemente en la mucosa de la vía aérea superior, bronquiolos terminales y parénquima pulmonar; que se identifico subtipos de receptores (RARs, SARs, Fibras C) diferenciados por su sensibilidad fisicoquímica, velocidad de conducción, mielinización, sencibilidad neuroquímica y lugares de terminación en las vías aéreas como se presenta en la fig. 5. [47].

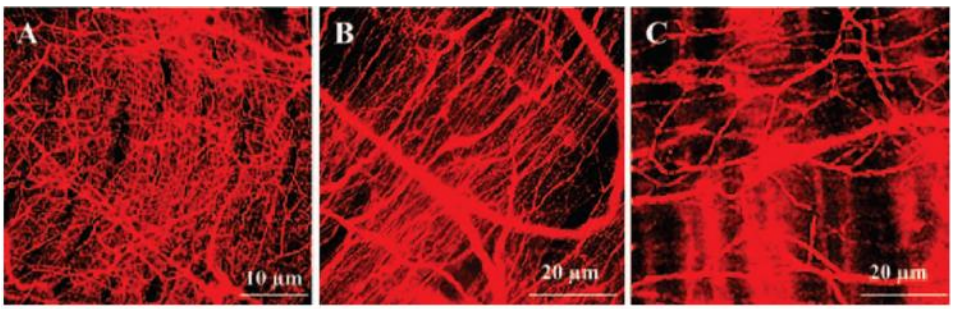


Fig.5. Mucosas de traqueas: A. rata, B. conejillo, C. humanos. Efectuada a través de la prueba inmunohistoquímica con antisuero de una proteína no especifica. Plexo neuronal denso se encuentro debajo y dentro del epitelio de las vías respiratorias. Dr. S.B. Mazzone -observaciones no publicadas- (47).

Como se menciono anteriormente existen diferentes receptores que intervienen en la producción de la tos entre los cuales se reconocen los receptores de adaptación rápido- RARs se activan por la dinámica de estímulos que desencadenan la inflación y deflación del pulmón resultando mas activos en el incremento del volumen de inflación, por lo mismo que la actividad del RARs se correlaciona con la frecuencia respiratoria así, en los conejillos de indias, las ratas y recién nacidos de todas las especies esta función alcanza entre 16 a 27 impulsos por segundo mientras que en los grandes animales como el perro este valor es entre 1 a 5 por segundo. [47]

El RARs es esporádico, dinámico y la activación depende del volumen de inflación a mayor volumen mayor actividad. El RARs es insensible a muchos estímulos de productos químicos, sin embargo la evocación es activada por estímulos de broncoespasmo u obstrucción resultante de la secreción de moco o edema. Las sustancias como la histamina capsaicina, sustancia P,

bradiquinina activan al RARs pero al mismo tiempo lo inhibe mediante el efecto de órganos

que producen estos estímulos. Lo que indica que serian responsables en la regulación de la tos, además, alternativamente podrían actuar sinérgicamente con otros subtipos de nervios aferentes para inducir la tos. El receptor de adaptación de estiramiento lento -SARs ante las fuerza mecánica de los pulmones durante la respiración son altamente sensibles, este tipo de receptor aumenta su actividad durante la inspiración justo al inicio de la espiración con pulmones adecuadamente inflamados. Podría diferenciarse con los RARs en la conducción de velocidad, falta de adaptación sostenida en la inflación del pulmón que está distribuido en todas las vías respiratorias. Todas estas propiedades hacen que cumpla un rol importante en el reflejo de la tos. Finalmente se menciona a otro receptor las fibras C, en las vías respiratorias la mayoría de las fibras C aferentes son amielinicas a diferencia del RARs y SARs son insensibles con respecto a la estimulación mecánica y la inflación del pulmón. También las fibras C se diferencia del RARs por ser activadas por impulsos directos de la bradiquinina, capsaicina y no a través de los efectos del músculo liso o la vascularización. Por otra parte, las prostaglandinas E2, adrenalina y adenosina son broncodilatadores y podrían inhibir la activación del RARs [47].

Como se ve estas interacciones entre los subtipos de receptores en los nervios aferentes seria los que evocan la tos observándose en la siguiente fig. 6

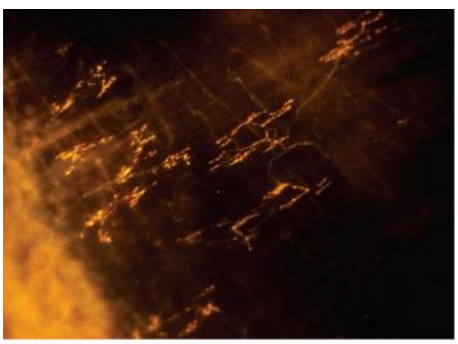


Fig 6. Receptores de la tos en mucosa bronquial de guinea

Terminaciones que derivan de los nudos ganglionares por impulso mecánico o ácido. Interceptaciones de los receptores en el músculo liso y el epitelio. Encontrándose en cobayo la cantidad de 200 a 300 receptores (4 a 5 campos) comparado con la rata que tiene 10 y en algunos casos no lo tiene [47].

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y métodos

3.1.1 Equipos

Balanza analítica AB Meter Toledo

Balanza electrónica básica (serie Acculab V)

Cromatoplacas de vidrio 20 x 20 cm. con 3 mm de espesor

Campana de vidrio transparente

Compresora o nebulizadora, modelo 1125. Thomas – Pumps.

Spectophotometet UV Hewlett Packard (cectra 8452 A)

3.1.2 Materiales de vidrio

Tubos de ensayo, laminas porta objetos, pipetas, Vaso de precipitados, etc.

3.1.3. Reactivos

Ácido cítrico, porcentaje de pureza 99.5-100.5%. PM 210.14 g/mol.

Ácido sulfúrico qp.

Acido clorhídrico qp

Alcohol absoluto- etanol -qp.,

Alcohol metililo-metanol qp. Laboratorio puriquim reagent.,

Carbonato disodico de potacio. Cloroformo qp. Laboratorio Merk,

Codeína fosfato 10mg/kg. Laboratorio roxfarma

Eosina azul de metileno. Laboratorio spectrum chemical Ltd.

Hematoxilina. Laboratorio spectrum chemical Ltd

Reactivo de feling; dragendorff; Feling; mayer; gelatina shinoda; ninhidrina; liebermann burchard, tricloruro de aluminio,

Silicagel 60 –Laboratorio Merck.etc.

3.1.4 Material biológico

Cobayos de raza albino Ingles (*Cavia porcellus)* de lote: C-08-2007 -Instituto Nacional de Salud

Ratones albinos de especie Mus músculus de cepa BALB/cC53 SNPV-Instituto Nacional de Salud.

Alimento para cobayos -crecimiento y libertad. Universidad Agraria la Molina.

Alimento para ratones- dieta comercial pelletizada. Instituto Nacional de Salud- INS.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Recolección de la muestra de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

La recolección y selección de flores de panti panti se realizó en la comunidad de Chamchilla, distrito de Acora ubicado en la parte sur de la Provincia y Departamento de Puno, al sur del Perú. Limita con el norte con el distrito de Pichacani y Platería; con el sur con la provincia del Collao, distrito de Santa Rosa y Condoriri; por el este con Ilave y el lago Titicaca y por el oeste con el distrito de Pichacani y el departamento de Moquegua[48]. La muestra (panti panti) fue recolectada durante el mes de abril en época de lluvia, de los suelos de textura franco arcillosa y adecuada fertilidad [49], su crecimiento y desarrollo es de forma natural del ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd fig. 7



Fig.7 ***Cosmos peucedanifolius Wedd.*** (panti panti) Distrito de Acora-Puno.

3.2.2 Identificación taxonómica de la especie en estudio

De acuerdo con el estudio descriptivo de la planta muestreada, realizada por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la planta medicinal panti panti tomada en la comunidad de Chamchilla - Acora, tiene la posición taxonómica abajo indicada, según el sistema de clasificación de Cronquist (1988).

DIVICIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

GENERO: ***Cosmos***

ESPECIE: Cosmos peucedanifolius Wedd

3.3 Metodología del estudio fitoquímico cualitativo

3.3.1 Obtención del extracto acuoso de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd.

Las flores fueron trituradas y sometidas a infusión poniendo en contacto y reposo en agua hervida durante 15 minutos, siendo filtrado y sometido a un proceso de liofilización [(50)].

En esta identificación de metabolitos secundarios del extracto acuoso liofilizado de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd se investigó solubilidad en distintos solventes: agua, metanol, etanol, cloroformo y n-hexano. Se realizó la **marcha fítoquímica,** según la técnica de Olga Lock de Ugaz, 1994 [(51)].Xorge Domínguez 1985 [(52)].

La detección de los metabolitos secundarios predominantes fue determinada haciendo uso de la técnica cromatográfica en capa fina utilizando como sistema de solventes cloroformo/metanol (3:1). La separación de estos metabolitos requirió el uso de la técnica cromatografía en columna, para ello, se empacó la columna con silicagel en cloroformo. A continuación la muestra del extracto liofilizado acuoso de las flores de ***Cosmos pseudanifolius*** Wedd (disuelto en metanol) se sembró y eluyó con el sistema de solventes cloroformo/metanol en proporción de 6: 1; luego 3:1 y finalmente 2:1. (Anexo 1)

Una vez obtenida las fracciones de elución en tubos de ensayo fueron separados los compuestos órganicos mediante cromatografía en capa fina, seleccionando fracciones similares de las placas correspondientes, y se procedido al aislamiento mediante cromatografía en capa fina a escala preparativa con placas de silicagel de 20x20cm con un espesor de 2mm, utilizando como fase móvil cloroformo/metanol 6:1. Luego cada fracción se extrajo con etanol. Finalmente, se procedió a elucidar las estructuras químicas tomando como premisa las lecturas de cada metabolito por espectrofotometría UV-visible.

3.4 Metodología del estudio farmacológico

3.4.1 Material Biológico

Del Instituto Nacional de Salud, se han adquirido 25 cobayos de raza albino Ingles de especie ***Cavia porcellus*** de lote: C-08-2007 con peso de 550 a 700g en condición de salud óptima y en buen estado nutricional (balanceado). Los animales fueron ambientados previamente en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNMSM, durante 7 días recibiendo agua y alimento a libertad, de nombre “crecimiento y reproductor”- adquirido de la Universidad Agraria La Molina.

3.4.2 Técnica de análisis farmacológico experimental

La actividad tusígena es provocada con ácido cítrico en cuy según Ulcelay et al, 1991 [53] [54].

Procedimiento

1. **Selección de animales:**

   Previo al experimento los animales fueron nebulizados con ácido cítrico, siendo seleccionados 25 cuyes caracterizados por presentar en promedio de 15 eventos tusivos durante 10 minutos. Estos animales fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos de 5 animales.

2. **Evaluación de la actividad antitusiva**

   Según la técnica Ulcelay et al, 1991 los 25 cobayos fueron sometidos a ayuno durante 24 horas con libre disponibilidad de agua, distribuidos en el siguiente cuadro según el diseño experimental.

Tabla 1. Tratamiento Antitusivo por grupos experimentales

Nº	**n**	**Tratamiento**	**Nebulización tusígena**	**Condición grupal**
1	5	Solución salina fisiológica 5mL/kg	+ Ácido cítrico 20%	Control negativo
2	5	Codeína fosfato 10mg/kg	+ Ácido cítrico 20%	Control positivo
3	5	Extracto 250 mg/kg	+ Ácido cítrico 20%	Tratamiento experimental
4	5	Extracto 500 mg/kg	+ Ácido cítrico 20%	Tratamiento experimental
5	5	Extracto 1000 mg/kg	+ Ácido cítrico 20%	Tratamiento experimental

n= número de muestra de animales por grupo.

Una vez aplicado el tratamiento, al cabo de una hora fueron expuestos por 10 minutos a nebulización con ácido cítrico al 20% registrándose luego: el tiempo de inicio de la primera tos, número total de toses en periodos de 5 minutos.

3.5 Técnica de análisis de toxicidad aguda

3.5.1 Material biológico

Se utilizo ratones albinos de especie Mus músculus de cepa BALB/cC53 SNPV (Centro nacional de productos biológicos) con promedio de peso 36.7g. Los animales se mantuvieron en salas climatizadas a temperatura de 20 ± 5ºC, luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron como alimento dieta comercial pelletizada de procedencia del Instituto Nacional de Salud - Ministerio de Salud; Lima. El agua fue de calidad apta para consumo humano. El acceso al agua y alimento fueron *ad libitum*.

3.5.2 Técnica de la Clase tóxica aguda (CTA) 423

Descrito por la Organización para Cooperación y Desarrollo Económico- OECD [55].

Los animales fueron sometidos a inspección diaria de salud durante 5 días antes de iniciar el experimento.

La administración del extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** *Wedd* por vía oral fue llevada a cabo mediante cánula intragástrica a cada animal del grupo experimental.

24 ratones albinos fueron divididos aleatoriamente en 8 grupos de tres animales cada uno según el cuadro experimental indicado.

Tabla 2. Distribución de animales para evaluación tóxica aguda

Nº	**n**	**Sexo**	**Tratamiento**	**Condición experimental**
1 2	3 3	macho hembra	Solución salina fisiológica 10mL/kg	Control
3 4	3 3	macho hembra	Extracto 25 mg/kg	Tratamiento experimental
5 6	3 3	macho hembra	Extracto 200 mg/kg	Tratamiento experimental
7 8	3 3	macho hembra	Extracto 2000 mg/kg	Tratamiento experimental

n= número de muestra de animales por grupo.

Los animales fueron observados individualmente durante el tiempo de 14 días, siendo observadas las 4 primeras horas diarias, sobre todo los primeros 30 minutos.

Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte o alteración de cambios orgánicos, signos y síntomas de toxicidad incluyendo su comienzo y duración, además cambios: de piel, membranas mucosas y ojos, sistema respiratorio, y en la conducta. Se prestó especial atención al potencial ocurrencia de salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma.

Se controló el peso de los animales todo los días durante los 14 días. Al concluir el tiempo de experimento se administro medicamento anestésico pentobarbital 30mg/kg se extrajo sangre por el método de punción cardiaca luego, se realizó el frotis para el análisis de leucocitos y finalmente, se tomaron muestras de los órganos siguientes: cerebro, hígado, riñón, y pulmón para el estudio histopatológico respectivo.

3.5.2.1 El estudió histopatológico fue realizado mediante la técnica de Harris. Tinción Hematoxilina - Eosina (H-E) [56].

Mediante el procedimiento adjunto se ha teñido las estructuras celulares (núcleo, citoplasma) y tejidos principalmente el conectivo, aplicando los siguientes pasos:

Procedimiento de fijación

Xilol 5 minutos (2 baños).Alcohol absoluto 5 minutos. Alcohol corriente 5 minutos (2 baños). Agua de caño.

Procedimiento de coloración

Hematoxilina 3 minutos. Agua de caño. Eosina 2 minutos. Alcohol corriente 5 minutos (dos baños). Alcohol absoluto 5 minutos. Xilol 5 minutos (2 baños)

Procedimiento de montaje

En la preparación de la lámina fue cubierta la porción que contiene el tejido con una laminilla. Esto hace a la lámina permanente y permite el examen microscópico.

3.5.2.2 Técnica de coloración Wright

Para el análisis de leucocitos se utilizo el reactivo de coloración de Wright preparada de la forma siguiente: 0,5 g de bicarbonato sódico y 1 g de azul de metileno en 100 ml de agua destilada. La mezcla se caliento a 100º C durante 1 hora. Se enfrío y se añadió una solución de eosina al 1%. El precipitado se recogió en un filtro, se seca y disuelve en alcohol metílico en la proporción de 0.5 g/litro de alcohol.

Las extensiones de sangre secadas al aire libre se cubrieron con el colorante durante 2 min.

Se lavo con agua destilada, se coloco solución tampón durante 4 minutos, se seco al aire libre y se observó en el microscopio [57].

3.6 Técnica de análisis de toxicidad subcrónica

3.6.1 Material Biológico

Los ratones albinos tuvieron masa corporal promedio 36.6g. Los animales se mantuvieron en ambientes climatizadas a una temperatura de 20 ± 5ºC, luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron como alimento dieta comercial pelletizada (procedencia del Instituto Nacional de Salud- Ministerio de Salud; Lima. El agua fue de calidad apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y al agua fue *ad libitum*. Los animales fueron sometidos a inspección de salud diaria 7 días antes del inicio al experimento y durante los 90 días respectivamente.

3.6.2 Técnica Dosis repetida -90 días, 408- OECD (Organización para Cooperación y Desarrollo Económico) [58] resulta útil para el análisis de la toxicidad subcrónica. Para ello, 50 animales albinos fueron divididos aleatoriamente en 10 grupos de 5 grupos cada uno según diseño experimental siguiente:

Tabla 3. Distribución de animales para evaluación tóxica subcrónica

Nº	**n**	**Sexo**	**Tratamiento**	**Condición experimental**
1 2	5 5	macho hembra	Solución salina fisiológica 10mL/kg	Control
3 4	5 5	macho hembra	Extracto 250 mg/kg	Tratamiento experimental
5 6	5 5	macho hembra	Extracto 500 mg/kg	Tratamiento experimental
7 8	5 5	macho hembra	Extracto 1000 mg/kg	Tratamiento experimental
9 10	5 5	macho hembra	Extracto 1000mg/kg	Centinela

n= número de muestra de animales por grupo

Se administro a los ratones albinos el extracto acuoso liofilizado de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd vía oral mediante cánula intragástrica. Los animales fueron observados todos los días durante las primeras 3 horas en los 90 días de experimentación, observando la presencia de

síntomas de toxicidad y otras alteraciones en su organismo mencionadas anteriormente en la toxicidad anterior. Por otro lado, los análisis de leucocitos y estudio histolopatológico fueron hechos con los mismos procedimientos de la toxicidad aguda (Anexo 2), previo administración intraperitoneal de pentobarbital 30mg/kg. Hecho que se consideró de vital importancia el cuidado de estos animales a fin de aliviar o minimizan el dolor, sufrimiento y estrés de los animales, de manera que se elevó su bienestar sin comprometer el resultado del experimento. Esta forma de eutanasia en los animales conduce a investigaciones más seguras, ya que el dolor y el estrés generan cambios biológicos en el animal que pueden distorsionar el resultado. Incluye mejorar las condiciones de vida de los animales y su dieta, reducir el número de inyecciones y el volumen administrado, utilizar agujas del menor tamaño y calibre posible requerirlo [(59)]. Actuar desde el punto de vista ético es pretender llegar a un buen fin (ayuda al hombre) de realizar algo correcto (la investigación) teniendo presente no producir daño a los animales (que no es querido directamente solo tolerado) teniendo presenta la regla de las 3Rs reemplazar, reducir y refinar [(60)]. Unido a una cuarta R de responsabilidad por parte de los investigadores [(61)].

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los estadígrafos obtenidos como resultados fueron expresados como la media, la desviación estándar, los rangos de variación y el coeficiente de variabilidad, los cuales son expresados como promedios además de cálculo porcentual expresados en cuadros, tablas y gráficos respectivamente. La estadística de significancia fue llevado por un diseño de tratamientos randomizado de los cuales derivaron el análisis de varianza (ANOVA) correspondiente. La estadística comparativa fue llevado bajo la prueba de Duncan, utilizando un nivel de significación de $p<0,01$

IV. RESULTADOS

4.1 Detección de metabolitos secundarios

La primera etapa experimental de solubilidad del extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd dio el resultado siguiente:

Tabla 4 Solubilidad de extracto liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Solventes	Solubilidad
Metanol	+ + +
Etanol	+ + +
Agua	++
Cloroformo	++
N-Hexano	-

Leyenda: - insoluble; ++ soluble; +++ muy soluble.

Los metabolitos secundarios detectados en el extracto estudiado mediante el sistema de Screening fitoquímico son expresados en la tabla siguiente:

Tabla 5.
Screening fitoquímico del extracto liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Reactivos	Metabolitos secundarios	
Cl_3Fe	+ + +	Compuestos Fenoles
Shinoda	+ + +	Flavonoides
Gelatina	+ + +	Taninos
Mayer	+ +	Alcaloides
Dragendorff	+ +	Alcaloides
Espuma	+ +	Saponina
Alfa naftol y H_2SO_4	+ +	Glúcidos
Liebermann Burchard	+	Esteroides y/o Terpenoides
Wagner	+	Alcaloides
Kedde	+	Lactonas sesquiterpenicas
Ninhidrina	-	Aminoácidos

Leyenda: (-) No hay, (+) Escasa presencia, (++) Regular presencia, (+++) Abundante Presencia

Respecto al revelado del extracto en estudio en el sistema de cromatografía en capa fina, se obtuvieron los resultados siguientes:

Tabla 6. Cromatografía en capa fina del extracto liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** **Wedd**

Reactivos	**Metabolitos**	
Cl_3Fe 1%	Compuestos Fenólicos	+++
Vapores de amoníaco	Compuestos Fenólicos	+++
Dragendorff	Alcaloides	++
Liebermann Burchard	Esteroides, Terpenos	+
Kedde	Lactonas Sesquiterpenicas	+

Leyenda: (+) escasa presencia, (++) regular presencia, (+++) abundante presencia de metabolito.

Por su parte, después de la obtención de 5 muestras tras el procedimiento de cromatografía en columna se procedió a la lectura espectrométrica UV- visible de los compuestos fenólicos, con reactivos de desplazamiento tales como Metóxido de Sodio, Ácido Clorhídrico y Tricloruro de Aluminio se obtuvieron los espectros siguientes:

Tabla 7. Espectros UV-visible de compuestos elucidados del extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd.

M1:

$\lambda_{máx}^{EtOH}$ **:** 274, 314 nm; $\lambda_{máx}^{Metox.Na}$ **:** 274, 314 nm; $\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3}$ **:** 274, 314 nm;

$\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3+HCl}$ **:** 274, 314 nm

M2:

$\lambda_{máx}^{EtOH}$ **:** 270, 330 nm; $\lambda_{máx}^{Metox.Na}$ **:** 280, 395 nm; $\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3}$ **:** 310, 365 nm

$\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3+HCl}$ **:** 310, 365 nm

M3:

$\lambda_{máx}^{EtOH}$ **:** 268, 330 nm; $\lambda_{máx}^{Metox.Na}$ **:** 274, 380 nm; $\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3}$ **:** 275, 350 nm;

$\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3+HCl}$ **:** 275, 350 nm

M4:

$\lambda_{máx}^{EtOH}$ **:** 270, 333 nm; $\lambda_{máx}^{Metox.Na}$ **:** 270, 390 nm; $\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3}$ **:** 270, 345 nm

$\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3+HCl}$ **:** 270, 345 nm

M5:

$\lambda_{máx}^{EtOH}$ **:** 268, 334 nm; $\lambda_{máx}^{Metox.Na}$ **:** 270, 392 nm; $\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3}$ **:** 270, 336 nm

$\lambda_{máx}^{EtOH+AlCl_3+HCl}$ **:** 274, 336 nm

Leyenda. Muestras: M1, M2, M3, M4, M5.

4.2 Resultado de la actividad antitusiva del extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

El número de toses encontrado como respuesta antitusivo obtenido después de haber aplicado varias dosis del extracto estudiado en animales expuestos a nebulización con solución de ácido cítrico al 20% dio los resultados siguientes.

Tabla 8. Número de accesos de tos de cobayos tratados con extracto acuoso liofilizados de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Accesos de tos		% Inhibición
		Antes	Después	
Control SSF. 5mL/kg	5	10,10±0,22	6,80±1,04	32,76±9,35
Codeína F. 10mg/kg	5	10,70±0,84	2,70±1,60	*74,56±16,03
250 mg/kg	5	10,60±0,89	5,30±0,76	50,09±4,89
500 mg/kg	5	10,70±0,76	4,50±0,71	*58,08± 4,71
1000 mg/kg	5	11,40±0,96	1,80±1,60	*84,64±12,87

*Número de accesos de tos expresados como media ± desviación estándar. Significativo *p<0.01comparado con el grupo* ***control negativo****. Intervalo de confianza 95%.*

SSF= suero fisiológico. Codeína F= codeína fosfato. n=número de muestra

Los resultados mostraron que el tratamiento antitusivo con dosis de 500 y 1000mg/kg del extracto en estudio, produjo una reducción significativa ($p<0.01$) de eventos tusivos en animales experimentados en comparación con el grupo control (SSF).

El porcentaje de inhibición comparado en animales tratados con dosis diversas del extracto estudiado puede observarse en la presente figura.

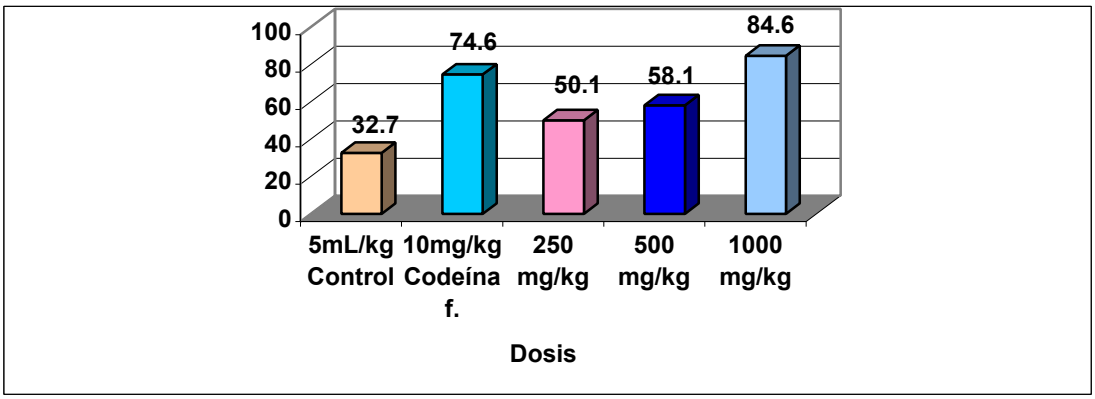


Fig. 8 Porcentaje de inhibición de la actividad antitusiva en cobayos tratados con extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peusedanifolius*** Wedd

4.3 Evaluación de la toxicidad aguda del extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

El primer parámetro de toxicidad aguda aplicado a ratones por administración oral directa de extracto es el peso vivo, cuya respuesta se evalúan entre el 1ro. y 14 avo, día mostrado en el cuadro siguiente.

Tabla 9. Evolución de peso corporal (grs) de ratones tratados con extracto acuoso liofilizado de flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd durante 14 días

Sexo	**Evolución de peso vivo** / **Dosis**	**n**	**Inicial**	**7días**	**14 días**
Machos	Control 10mL/kg	3	31.00±3,00	31,67±3,21	32.00±3,46
	25 mg/kg	3	37,33±1,15	37,33±0,58	38,00±1,00
	200 mg/kg	3	44,33±3,21	44,67±2,08	44,33±3,21
	2000 mg/kg	3	34,33±1,15	34,33±0,58	33,67±0,58
Hembras	Control	3	30,33±2,08	31,67±1,53	30,67±1,15
	25 mg/kg	3	29,00±1,00	28,67±2,08	28,67±1,15
	200 mg/kg	3	31,67±2,08	30,33±3,21	29,67±1,15
	2000 mg/kg	3	30,00±2,00	29,33±2,31	28,33±2,52

n = número de muestra

Los resultados expresan que los pesos corporales de los ratones machos y hembras durante el primer día hasta el día 14, no demostraron variaciones significativas ($p<0.01$) entre los grupos de tratamientos y el grupo control, de modo que su evolución según sexos la observamos en las siguientes figuras.

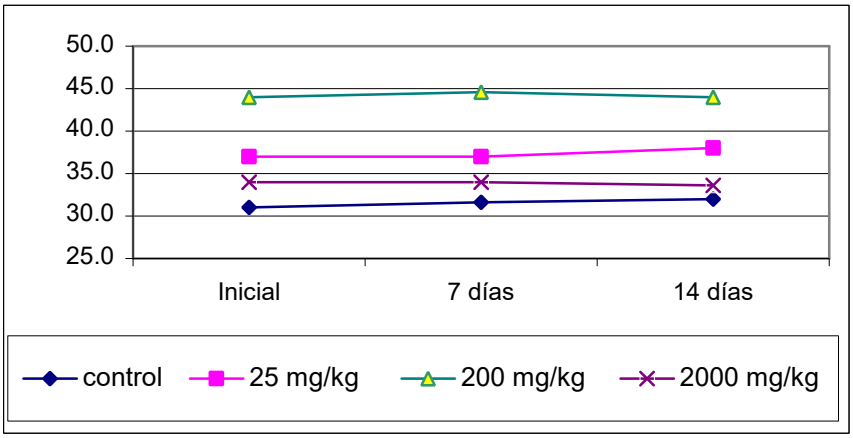


Fig. 9 Evolución de peso corporal de ratones machos tratados con extracto acuoso liofilizado de las flores ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd

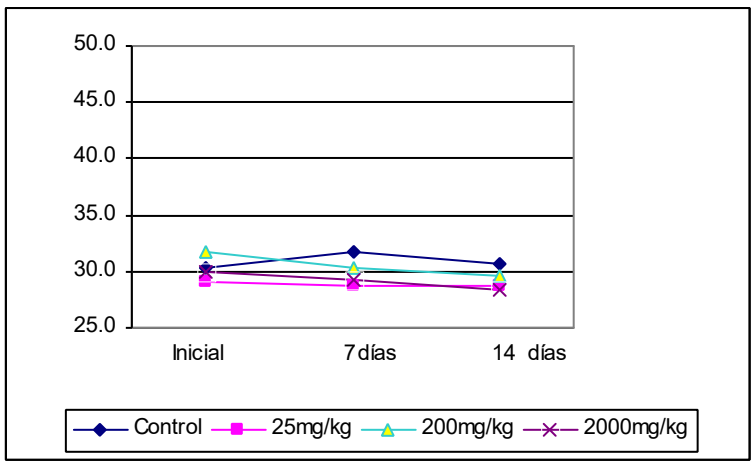


Fig.10 Evolución de peso corporal de ratones hembras tratados con extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd

Los resultados de toxicidad aguda evaluada mediante el diagnóstico de glóbulos blancos en sangre de ratones se muestra en la tabla a siguiente.

Tabla 10. Fórmula leucocitaria de ratones machos y hembras tratadas con extracto acuoso liofilizadote las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

		Abastonados	Segmentados	Basófilos	Eosinófilos	Linfocitos	Monocitos
Machos	**n**	**%**					
Control	3	1,30±0,58	1,00±1,000	0,67±1,16	0,33±0,58	88,33±1,53	8,33±0,577
25 mg/kg	3	1,33±1,528	2,33±0,577	0,00±0,00	1,00±1,00	87,67±2,89	9,67±1,528
200 mg/kg	3	1,00±1,000	1,33±0,577	0,00±0,00	0,67±1,155	89,00±1,00	8,67±3,215
2000 mg/kg	3	1,00±,000	1,33±1,528	0,33±0,577	0,33±0,577	89,00±3,46	8,33±2,309
Hembras							
Control	3	0,00±,000	1,33±0,577	0,00±0,00	0,67±0,58	92,67±0,58	8,33±0,577
25 mg/kg	3	0,33±,577	1,67±1,528	0,00±0,00	0,00±0,000	88,67±4,62	9,33±5,508
200 mg/kg	3	1,00±1,000	1,33±0,577	0,33±0,577	1,00±1,000	88,33±3,79	8,00±4,000
2000 mg/kg	3	0,33±,577	1,33±0,577	0,00±0,000	0,67±1,155	90,00±5,20	8,00±3,464

El recuento diferencial leucocitario de ratones tratados con el extracto ensayado ha dado lugar a un aumento de segmentados (2,33±0,577) y eosinófilos (1,00±1,00) en machos tratados con una dosis de 25mg/kg., sin embargo no se observó variaciones significativas ($p<0,01$) entre machos y hembras respecto al grupo control.

La evaluación toxicología aguda de carácter histopatológico en diversos órganos de ratones las visibilizamos en las tablas 11, 12, 13, y 14.

Tabla 11. Evaluación toxicológica aguda del cerebro de ratón administrado con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Congestión+		Normal	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%
Control	6	0	0	6	100
25 mg/kg	6	0	0	6	100
200 mg/kg	6	1	17	5	83
2000mg/kg	6	0	0	6	100

n=número de muestra; Congestión+ = leve

El análisis histopatológico de cerebro de ratones tratado con el extracto en estudio no demostró alteración alguna en este órgano, salvo el caso del tratamiento de animales con

200mg/kg, que denota 17% de casos con congestión pasiva leve (1 animal), el mismo que no tiene mayor significancia por cuanto que el 100% de los animales tratados con 2000mg/kg no presentan alteración alguna en este órgano evaluado.

Respecto al hígado, con dosis de 2000mg/kg del extracto estudiado se encontró congestión pasiva en el 50% de animales, 33.33% con congestión activa y 16.67% con hígado graso como se observa en la tabla adjunta

Tabla 12 Evaluación toxicológica aguda del hígado de ratón tratados con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Congestión+		Congestión++		Graso+		Graso++		Normal	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Control	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6	100
25 mg/kg	6	2	33.33	0	0	2	33.33	0	0	2	33.33
200 mg/kg	6	3	50	3	50	0	0	0	0	0	0
2000mg/kg	6	3	50	2	33.33	0	0	1	16.67	0	0

n = número de muestra; Congestión+=congestión pasiva; Congestión++ activa=; Graso+=baja Graso++=alta

Respecto al riñón los resultados encontrados en el cuadro adjunto, muestran que la aplicación de dosis de 2000mg/kg provoca 16.67% de casos de congestión pasiva, 66.67% de animales con esclerosis leve, y 16.67% de casos normales.

Tabla 13 Evaluación toxicológica aguda del riñón de ratones tratados con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Congestión+		Esclerosis+		Microvacuolado		Normal	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Control	6	0	0	0	0	3	50	3	50
25mg/kg	6	2	33.33	1	16.67	0	0	3	50
200 mg/kg	6	3	50	0	0	0	0	3	50
2000mg/kg	6	1	16.67	4	66.67	0	0	1	16.67

n = número de muestra; Congestión+=congestión pasiva; esclerosis+leve.

Los pulmones en cambio permanecen en condición aparentemente normal ya que solo en el 16.67% de casos encontramos cogestión pasiva como se muestra en el cuadro siguiente.

Tabla 14 Evaluación toxicológica aguda del pulmón de ratones administrados con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Congestión+		Normal	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%
Control	6	0	0	6	100
25 mg/kg	6	1	16.67	5	83.33
200 mg/kg	6	2	33.33	4	66.67
2000mg/kg	6	1	16.67	5	83.33

n= número de muestra.. Congestión+=congestión pasiva

4.4 Resultados de la evaluación de toxicidad subcrónica del extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

La evaluación tóxica subcrónica establecida en el periodo de 12 semanas demostró que el peso corporal de los animales machos y hembras sufren incrementos no significativos ($p<0,05$) respecto al grupo control, implicando ello que el peso corporal de los animales tratados con 500 mg/kg y 1000 mg/kg de extracto no tienen retrazo alguno en su proceso de ganancia de peso corporal, como se demuestra en el cuadro adjunto.

Tabla 15 Evolución de peso corporal de los ratones machos administrados con extracto acuoso liofilizado de *Cosmos peucedanifolius* Wedd durante 90 días

		Peso corporal grs por semanas											
Dosis	n	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Machos													
Control	5	34,0	35,0	38,8	35,4	38,6	34,8	36,4	38,0	38,4	39,2	38,2	37,2
250 mg/kg	5	36,6	37,2	33,8	38,4	38,8	39,0	37,2	35,0	33,8	31,0	32,0	36,0
500 mg/kg	5	43,0	43,4	41,6	40,8	43,2	42,8	43,0	41,0	45,4	43,8	44,8	46,2
1000 mg/kg	5	34,4	37,0	38,4	37,6	39,6	39,2	38,8	39,4	39,8	40,8	41,4	42,0
Centinela	5	35,4	39,4	41,4	41,8	39,6	39,2	38,8	39,0	39,0	40,0	42,0	41,4
Hembras													
Control	5	31.6	31.4	31.4	31.6	31.8	32.8	32.2	32.6	33.4	29.6	29.8	29.8
250 mg/kg	5	34.0	30.6	31.8	30.2	31.4	32.0	31.8	32.8	32.0	33.8	33.2	34.4
500 mg/kg	5	32.6	32.6	33.2	31.4	33.2	32.4	32.4	33.2	33.6	34.6	34.4	34.0
1000 mg/kg	5	33.2	33.0	33.0	32.0	31.8	32.0	31.0	33.8	34.2	33.4	33.8	33.8
Centinela	5	33.6	33.4	33.8	32.6	33.8	32.2	34.2	33.2	34.4	34.4	34.4	34.4

n = número de muestra. Pesos promedio cada 7 días hasta la semana 12.

Los cambios evolutivos en la ganancia de peso corporal pueden observarse en las figuras siguientes.

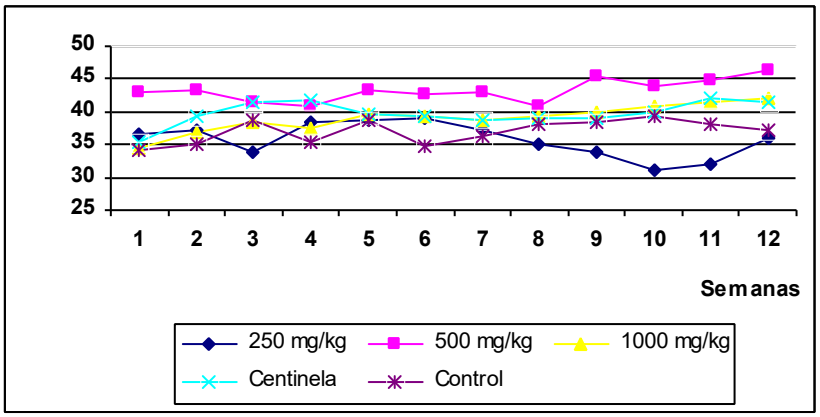


Fig.11 Evolución de peso corporal de ratones machos tratados con extracto acuoso liofilizado de ***Cosmos peucedanifolius*** *Wedd*

El peso corporal a través del tiempo manifestó un comportamiento ondulante pero no significativo ($p<0,05$) como lo muestra la figura 11.

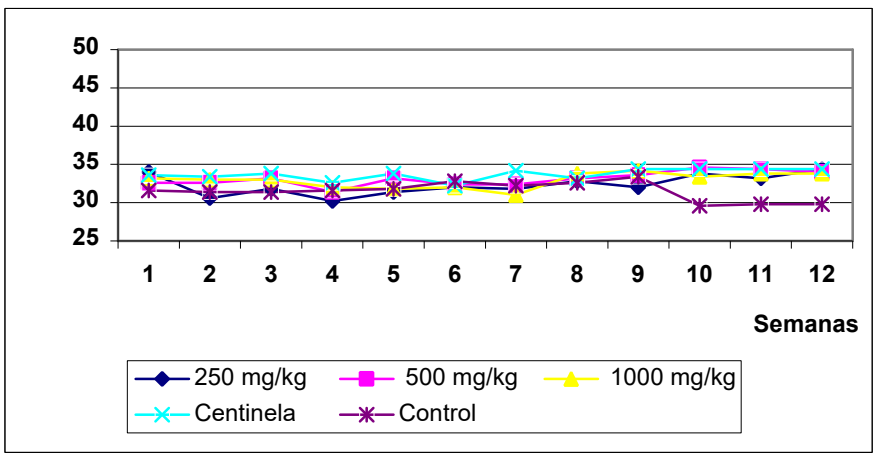


Fig. 12. Evolución de peso corporal de ratones hembras tratados con extracto acuoso de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd

En la presente figura 12 se observa los pesos corporales de ratones hembras sometidos a tratamientos distintos muestran márgenes de variación más estrechos. Los pesos variaron levemente durante las 12 semanas pero no se observaron diferencias significativas (p<0,05).

Respecto a la fórmula leucocitaria de los animales experimentados machos y hembras tratados con extracto de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd se observó lo siguiente:

Tabla 16 Fórmula leucocitaria de los ratones tratados con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd en toxicidad subcrónica-90días

Dosis		**Abastonados**	**Segmentados**	**Basófilos**	**Eosinófilos**	**Linfocitos**	**Monocitos**
Machos	**n**	**%**					
Control	**5**	0,4±0,89	4,6±1,14	1,0±1,00	0,4±0,55	81,0±6,12	12,6±3,91
250 mg/kg	**5**	2,2±1,10*	0,0±0,00	0,2±0,45	1,2±1,64*	89,4± 2,61*	7,0±3,67
500 mg/kg	**5**	0,8±0,84	1,4±1,52	1,6±1,52*	0,2±0,45	88,0±10,91*	8,0±7,58
1000 mg/kg	**5**	3,4±1,14 *	1,6±0,55	2,0±1,41*	0,2±0,45	85,2±3,56*	8,0±3,94
Centinela	**5**	1,6±1,52	6,2±2,95*	2,0±1,41*	2,4±1,67*	74,2±3,35	13,6±3,85*
Hembras							
Control	**5**	0,2±0,45	3,4±1,82	1,6±1,52	0±0,00	79,2±10,08	15,6±8,56
250 mg/kg	**5**	0,6±0,89	0,6±0,89	0,8±1,79	0,2±0,45	94,6±4,72 *	13,2±2,49
500 mg/kg	**5**	6,2±2,59 *	7,0±3,32*	1,0±0,71	0,0±0,00	72,8±5,85	13,0±4,24
1000 mg/kg	**5**	6,2±2,39 *	7,4±1,52*	0,6±0,55	0,4±0,55	73,2±10,13	11,6±5,77
Centinela	**5**	6,6±1,82 *	7,6±2,88*	1,2±1,30	0,2±0,45	68,6±7,96	15,8±6,22

*n= número de muestra. *p<0,01*

En los animales machos, los que presentan diferencias significativas con respecto al grupo control fueron: aumentaron a dosis de 250mg/kg abastonados (2,2±1,10), eosinófilos (1,2±1,64) y linfocitos (89,4± 2,61); a 500mg/kg basófilos (1,6±1,52) linfocitos (88,0±10,91); a 1000 mg/kg abastonados (3,4±1,14) basófilos (2,0±1,41) linfocitos (85,2±3,56) y centinela (1000mg/kg) segmentados, basófilos, eosinófilos, monocitos. *(p<0,01)

En las hembras, solo se observaron diferencias significativas en aumentos de linfocitos (94,6±4,72) en la dosis de 250mg/kg; a las dosis de 500 1000 y centinela (1000mgkg) abastonados y segmentados con relación al grupo control. *(p<0,01)

La evaluación histopatológica de toxicidad subcrónica en los órganos estudiados expresan sus resultados en las tablas 17, 18, 19 y 20.

Tabla 17. Evaluación toxicológica subcrónica del cerebro de ratón administrado con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Edema discreto		Normal	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%
Control	10	0	0	10	100
250 mg/kg	10	3	30	7	70
500 mg/kg	10	0	0	10	100
1000mg/kg	10	2	20	8	80
Centinela	10	0	0	10	100

n = número de muestra.

Así, el cerebro de ratones tratados con diversas dosis del extracto en estudio, denotó entre el 70 al 100% de animales normales, presentando una proporción menor al 30% de casos con edema discreto.

Tabla 18. Evaluación toxicológica subcrónica del hígado de ratón con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Congestión+		Congestión++		Esclerosis		Microvacuolado		Normal	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	10	100
250 mg/kg	10	1	10	0	0	0	0	9	90	0	0
500 mg/kg	10	2	20	1	10	1	10	6	60	0	0
1000mg/kg	10	0	0	3	30	0	0	7	70	0	0
Centinela	10	1	10	8	80	0	0	1	10	0	0

n=número de muestra. Congestión+=congestión pasiva ;congestión ++= congestión activa ; esclerosis leve

De otra parte el hígado de animales tratados con el extracto mostraron diversas lesiones leves entre los cuales guarda importancia 30% de casos de congestión activa, y 70% de animales con hígado microvacuolado leve tratados con una dosis de 1000mg/kg de extracto.

Tabla 19. Evaluación toxicológica subcrónica del riñón de ratón con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Congestión+		Congestión++		Esclerosis+		Esclerosis++		Normal
		Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia
Control	10	0	0	0	0	0	0	0	0	10
250 mg/kg	10	3	30	1	10	2	20	4	40	0
500 mg/kg	10	2	20	2	20	2	20	4	40	0
1000mg/kg	10	2	20	2	20	1	10	5	50	0
Centinela	10	1	10	7	70	0	0	2	20	0

n= número de muestra por grupo (5 por cada sexo).Congestión+=congestión pasiva;congestión activa; esclerosis+= esclerosis leve; esclerosis++= esclerosis moderado.

Respecto al daño en los riñones, los animales con dosificación más alta (1000mg/kg de extracto) se encontró 20% de casos de congestión pasiva, 20% de casos de congestión activa, 10% de esclerosis leve y 50% de esclerosis moderada.

Tabla 20. Evaluación toxicológica subcrónica del pulmón de ratón con extracto acuoso liofilizado de las flores de *Cosmos peucedanifolius* Wedd

Dosis	n	Congestión+		Congestión++		Normal	
		Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Control	10	0	0	0	0	10	100
250 mg/kg	10	3	30	1	10	6	60
500 mg/kg	10	3	30	2	20	5	50
1000mg/kg	10	3	30	2	20	5	50
Centinela	10	6	60	3	30	1	10

n= número de muestra).Congestión+=congestión pasiva; congestión activa

Finalmente los daños registrados en los pulmones con dosis de 500 y 1000mg/kg están vinculados cada grupo de animales al 30% de casos con congestión pasiva y 20% de casos de congestión activa.

V. DISCUSIÓN

Al evaluar la solubilidad (tabla 4) del extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd, se observó que los solventes orgánicos metanol y etanol fueron más eficientes para disolver, ya que el agua y el cloroformo generan solubilidad normal, mientras que el N-Hexano no sería disolvente apropiado para los componentes químicos orgánicos del extracto estudiado. Esto permitió mostrar que los solventes más eficientes disolvieron a los metabolitos secundarios flavonas del extracto estudiado siendo de naturaleza de alta polaridad.

De otra parte, los metabolitos secundarios fueron detectados mediante el screening fitoquímico (tabla 5) obteniendose compuestos fenólicos, taninos, y flavonoides como los metabolitos mas abundantes e importantes en comparación a las menores proporciones de glúcidos, alcaloides, saponina, esteroides, triterpenos. alcaloides, y lactonas sesquiterpenicas.

Los compuestos fenólicos revelados también en cromatograma silicagel con reactivos diversos (tabla 6), confirman la existencia de alcaloides, esteroides y/o terpenoides y lactonas Sesquiterpenicas, sobre todo compuestos fenólicos en abundancia.

De otro lado, se obtuvo 5 muestras: M1, M2, M3, M4 y M5 a través del procedimiento por cromatografía en columna. Tabla 7. Por su parte, la espectrometría UV- visible usando etanol como líquido de compensación para ajustar la línea base y reactivos de desplazamiento como metóxido de sodio, tricloruro de aluminio y ácido Clorhídrico, permitieron establecer el espectro, mediante la lectura de absorbancias en un barrido entre una longitud de onda de 200 a 400 nm, encontrándose absorbancias entre $A_{268\ y}$ A_{390} nm.

La observación de picos máximos de absorvancia, la intensidad de las bandas y los desplazamientos obtenidos tras la adición de reactivos permiten determinar las características de las 5 muestras anteriormente mencionadas obtenidos del cromatograma, la cual según la información proporcionada por Mabry et al,[(62)] permiten determinar los sustituyentes estructurales de los metabolitos secundarios.

Las muestras M1, M2, M3, M4 y M5, respondieron a las características de flavonas, elucidando por su correlación espectral las siguientes estructuras:

Para el caso de metabolito M1 los resultados fueron

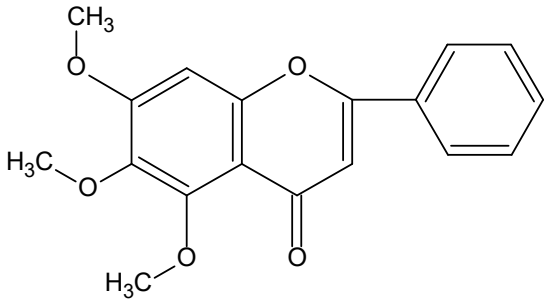


Fig. 13. M1. 5, 6, 7- trimetoxi flacona

Según el espectro en etanol el esqueleto básico que corresponde a esta fracción, es de una flavona (Fig.13), al tratarlo con metóxido de sodio no hay variación lo que nos indicaría que el compuesto no tiene hidroxilos libres, al hacer reaccionar con tricloruro de aluminio no se observa efecto batocrómico, que luego al tratarlo con HCl mantiene el valor, esto nos indica ausencia de hidroxilos libres; en la posición 5 no existe un OH libre para que forme un complejo con el tricloruro de aluminio.

Para el caso del metabolito M2 los resultados fueron

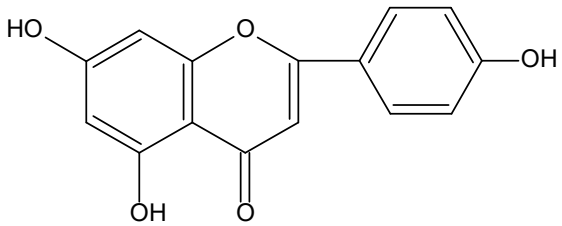


Fig. 14. M2. 4', 5,7- trihidroxi flavona o apigenina

Según el espectro en etanol el esqueleto básico que corresponde a esta fracción es de una flavona (Fig.14), pues al tratarlo con metóxido de sodio hay un efecto bactocromico de 10 nm y de 65 nm, lo que nos indicaría que el compuesto tiene hidroxilos libres, principalmente en la posición 7 y 4', al hacer reaccionar con tricloruro de aluminio se observan también efectos batocrómicos de 40 nm y 35 nm lo que nos confirma la presencia de hidroxilos libres y luego al tratarlos con HCl se mantienen las señales, esto nos indica que en posición 5 existe OH libre

para que forme un complejo con el tricloruro de aluminio que no es roto por el HCl. Este comportamiento es similar al de la apigenina.

Para el caso del metabolito M3 los resultados fueron

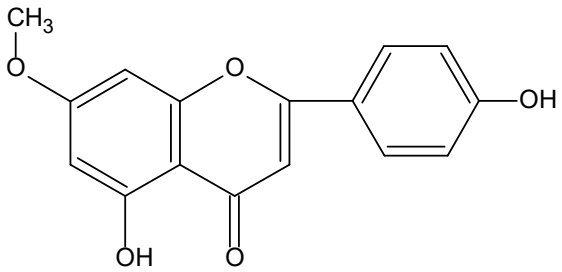


Fig. 15. M3. 4',5-dihidroxi-7- metoxi flavona

Según el espectro en etanol el esqueleto básico que corresponde a esta fracción es de una flavona (Fig. 15), pues al tratarlo con metóxido de sodio hay efecto batocrómico de 6 nm y de 50 nm lo que nos indicaría que el compuesto tiene hidroxilo libre en posición 4', al hacer reaccionar con tricloruro de aluminio también se observa efecto batocrómico de 7 nm y 20 nm, confirmando la presencia de OH libre en 4' y 5; luego al tratarlo con HCl no hay variación, esto nos indica presencia de hidroxilo libre en la posiciones 5, pues se forma un complejo con el tricloruro de aluminio y el carbonilo adyacente, que es fuerte y no se rompe con el HCl esto confirma nuestra presunción.

Para el caso del metabolito M4 los resultados fueron

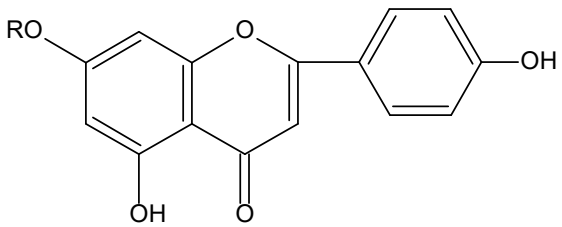


Fig. 16 M4. 4', 5- dihidroxi- 7 – O R flavona

Según el espectro en etanol el esqueleto básico que corresponde a esta fracción es de una flavona (Fig.16), pues al tratarlo con metóxido de sodio hay un efecto batocrómico de 57 nm lo que nos indicaría que el compuesto tiene hidroxilo libre, principalmente en la posición 4', al hacer reaccionar con tricloruro de aluminio se observa un efecto batocrómico de 12 nm, que

luego al tratarlo con HCl se mantiene al valor de la segunda señal esto nos indica presencia de hidroxilo libre en las posiciones 5; es decir en la posición 5 existe un OH libre que forma un complejo con el tricloruro de aluminio, por lo que se observó un ligero efecto batocrómico de 12 nm, que al ser tratado con ácido no se rompe por lo que no regresa a su valor original, esto confirma lo anterior.

Para el caso del metabolito M5 los resultados fueron

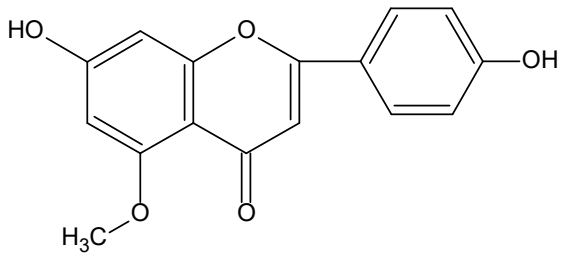


Fig. 17. M5. 4', 7- dihidroxi- 5 - metoxi flavona

Según el espectro en etanol el esqueleto básico que corresponde a esta fracción es de una flavona (Fig.17), pues al tratarlo con metóxido de sodio hay un efecto batocrómico de 58 nm lo que nos indicaría que el compuesto tiene hidroxilos libres, principalmente en la posición 4' y 7, al hacer reaccionar con tricloruro de aluminio no se observa efectos batocrómicos, que luego al tratarlo con HCl se mantiene los valores, esto nos indica ausencia de hidroxilo libre en la posición 5; es decir en la posición 5 no existe un OH libre que forme un complejo con el tricloruro de aluminio.

Tabla 8 El extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd al ser comparada con el porcentaje de inhibición de número de toses de la codeína fosfato 74,56±16,03 demostró que solamente el tratamiento con 1000 mg/kg supera el porcentaje de inhibición a 84,64 ± 12,87, valor superior a la codeína fosfato, implicando ello una ventaja mayor de hasta 10,08% más en la reducción de eventos tusivos.

De otra parte, el tratamiento con codeína fosfato con 500 mg/kg del extracto de ***Cosmos peusedanifolius*** Wedd resultaron eficientes para el tratamiento de la tos, esta eficiencia antitusiva resulta menor para el segundo, ya que la comparación de la inhibición antitusiva de la codeína (74,56±16,03) respecto al tratamiento de cobayos con 500 mg/kg de extracto (58,08± 4,71),

demostró una inhibición superior en 16,48 puntos porcentuales siendo así menos eficiente la dosis experimental de 500 mg/kg ensayado.

Contrariamente, en el grupo experimental tratado con 250 mg/kg alcanzo un efecto de inhibición porcentual de accesos de toses menor, es decir de 50,09% ± 4,89, sin embargo este valor comparado al grupo control -suero fisiológico (32,76±9,35) al análisis estadístico no resulta significativo. Por lo tanto, el grupo que presentó el porcentaje de inhibición más bajo fue el tratado con dosis de 250 mg/kg (50,09±9.35), mientras los animales a los que se les administró dosis de 500 y 1000 mg/kg mostraron porcentajes de inhibición de tos que supera el 50%.

Como vemos, el extracto acuoso liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd, manifiesta mayores ventajas sobre la codeína fosfato, ya que no solo tiene mayor actividad antitusiva que la codeína, sino también esta ultima administrada a repetidas dosis puede producir dependencia, ya que, la suspensión brusca del opioide desencadena un síndrome de abstinencia con signos y síntomas de un estado gripal, con bostezos, midriasis, rinorrea, dolor muscular, sudación, náuseas y vómitos, diarrea, fiebre, insomnio, además con sufrimiento de inquietud y ansiedad [(63)]. Este opioide produce cambios adaptativos a largo plazo en el cerebro que no solo constituyen a la consolidación de proceso adictivo sino que parecen participar en la mayor vulnerabilidad para la recaída después de un periodo prolongado de abstinencia [(64)].

Este comportamiento encontrado también en estudios de dispensación de medicamentos antitusivos en una red de 175 farmacias de Francia, demostraron que el sulfogaiacol + grindelia de codeína (neócodion-opiácea) fueron consumidos en cada vez mayor cuantía, manifestando hipotéticamente los autores, que los pacientes se convierten en adictos y buscan mantenerse con ese medicamento [(65)].

Sin embargo, contrariamente a la codeína visto como causa de dependencia y daño progresivo del SNC, las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd no generan anomalías de dependencia, planteando a estas flores como una fuente de actividad antitusiva de mayor condición salubre, ya que por un lado no causa daño a nivel SNC, y por otro, el análisis histopatológico no demostró lesiones considerables en el cerebro ni en el sistema nervioso central de ratón como se demuestra en los resultados de la tabla 11 donde incluso de un grupo de animales con dosis de 2000mg/kg del extracto muestra 100% de animales sin alteración alguna.

Esta respuesta favorable, encontrada en el tratamiento del extracto probablemente actué principalmente en los receptores de adaptación rápida- RARs, y los receptores fibras C [29] periféricos de la tos, concentrados en los plexos nerviosos de la laringe, traquea, bronquios y otros tejidos del sistema respiratorio, los cuales una vez activados, viajan a través del nervio aferente vagal hasta el centro de la tos, para luego generar un respuesta por vía eferente a, grupos de músculos encargados de realizar el acto mecánico de la tos [66], presumiendo así, que el estimulo de la tos actúa a nivel periférico, y no a través de mecanismos sobre el SNC como ocurre en el caso de la codeína. Es mas, en Brasil, investigaciones sobre efecto antitusivo de diferentes formulaciones fitoterapias la solución fimatosan® y Abrilar® administrados por vía oral como plantas antitusivas también sugieren que tiene acción a nivel traquiobronquial [29].

Estudios previos han desarrollado con la técnica de Ucelay et.al. (1991) en Inglaterra, en cobayos nebulizados con ácido cítrico al 10%, plantea el análisis de 03 plantas medicinales distintas: ***Pteleopsis suberosa***; ***Entada africana root*** y ***Crossopteryx febrifuga,*** obteniendo los resultados siguientes: los extractos de cada planta administrados a dosis de 250, 500, 1000 mg/kg^{-1}, teniendo como control a grupos de animales tratados con $10mg/kg^{-1}$ de codeína, demostraron que la ***Crossopteryx febrifuga*** tubo mayor efecto antitusivo a concentración de 1000 mg/kg^{-1} ya que logro inhibir 77,4% eventos tusivos, mas que ***Pteleopsis suberosa*** trabajada a concentración de 1000 mg/kg^{-1} cuya inhibición antitusiva llego a 73,7 % , mientras que la planta ***Entada africana root*** a concentración similar solo produjo una inhibición de 61,4%. Estos tratamientos comparados entre si con la codeína no difieren uno del otro significativamente ($P< 0,01$) ya que el tratamiento con codeína presenta 76,3% de inhibición [54].

De otro lado, los metabolitos secundarios especialmente las flavonas encontrados en el ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd posiblemente tendría relación en la reducción de las toses, componentes orgánicos similares a los encontrados en diversas plantas medicinales como las especies ***Plecthranthus amboinicus*** (Lour) Spren (Orégano francés) y el Ginkgo biloba, demostrándose mediante estudios fitoquímicos en la primera, flavonoides, apigenina, flavonas, quercetina, ácido oxilacético, ácidos triterpénicos, luteolina y compuestos aromáticos de carvacrol a concentración de 50,07%; no obstante, en estudios realizados en dos extractos acuoso y etanólico al 30% comparado con la codeína con dosis de 20mg/kg, no especifica si

alguno de estos metabolitos (flavonoides, apigenina, flavonas) tuviesen relación con el efecto antitusivo [31].

El conjunto de las flavonas expuestas, conforman un subtipo químico de flavonoides, los cuales, parecen tener una función antitusiva favorable en el tratamiento del asma como lo enuncia Bruneton [67], quien explica la intervención de estas sustancias en el efecto broncoconstricción producida por las hojas del ginkgólido cuya composición química contiene considerable cantidad de flavonoides y flavonas los cuales explican el beneficio antiasmático.

Respecto a la evaluación de toxicidad aguda, en la tabla 9 se muestra que la evolución de los pesos corporales no tienen diferencias significativas ($p<0.01$), sin embargo, las ligeras variaciones aritméticas encontrados en machos con dosis de 2000mg/kg (de 34,3±1,55 a 33,7±0,58 grs), y las hembras tratadas de forma similar (de 30,00±2,00 a 28,33±2,52 grs) respecto del grupo control (de 30,33±2,08 a 30,67±1,15), serian aspectos resultantes del cautiverio de los animales experimentados, ya que su manejo implica frecuentemente procesos de estrés, sosteniendo una buena tolerabilidad del animal al extracto suministrado ya que en términos genéricos no altera la salud del animal en tanto no se observó trastornos metabólicos que afectan el desarrollo ni la composición corporal, que suelen modificarse cuando hay acción tóxica de diversos agentes [68,69].

En la tabla 10, los datos pertinentes a la fórmula leucocitaria de los ratones experimentados en toxicidad aguda no muestra variación significativa ($p<0,01$) entre los grupos tratados y el grupo control, sin embargo, el incremento de segmentados (2,33±0,577) y eosinófilos (1,00±1,00) en machos administrados con una dosis de 25mg/kg, estuvieron relacionados con comportamientos y signos de stress causado por el hábitat y la convivencia confinada de animales durante el experimento provocando una eosinófilia temporal, pero a la vez una fórmula leucocitaria que se encuentra dentro de los parámetros normales.

En la Tabla 11 el estudio histopatológico de cerebro del ratón administrado con 2000mg/kg de extracto liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd, presento el 100% de casos normales, en tanto no generaron alteraciones a nivel del sistema nervioso central, lo cual constituye una ventaja sobre el uso de la codeína que contrariamente es considerada como un producto que produce dependencia y lesión en cerebro sobre todo cuando se administra de forma

incontrolada generando una serie de cambios adaptativos a nivel celular y molecular en las diversos vías neuroquímicas a nivel del sistema nervioso central originando la aparición de un cuadro de dependencia crónica[63].

En la tabla 12, el análisis histopatológico de hígado, probada en 24 ratones administrados con extracto en estudio mostró presencia de dos tipos de congestión: la aplicación de 25 mg/kg provoco 33,33% casos de congestión pasiva, mientras que este resultado se incrementa al 50% cuando se administra a los animales a las dosis de 200 y 2000mg/kg, en tanto que los casos de congestión activa presentes en animales tratados con dosis de 200 y 2000 mg/kg de extracto no pasan del 50%.

Respecto al hígado graso, se encontró 33,33% de casos de grado leve en animales tratados con 25 mg/kg de extracto estudiado, mientras que 16,67% de animales dosificados con 2000mg/kg de extracto presentaron hígado graso de grado alto. Sin embargo, aun cuando la observación macroscópica del hígado denote tamaño y coloración aparentemente anormal e ingurgitado como consecuencia de la congestión sanguínea y la gran cantidad de sangre con aumento del volumen hepático, esta debe ser considerada normal si no existe ninguna alteración de nutrición y secreción [70]. De otra parte, el caso de hígado graso presentado en porcentaje bajo y caracterizado por exceso de grasa con presencia de múltiples vacuolas que desplazan al núcleo del hepatocito hacia la zona periférica de la célula son consideradas lesiones leves citotóxicas agudas [71], y en nuestro caso esta respuesta resulta atoxica porque solo se presenta en la minoría de casos (16,67%), y adopta un carácter focalizado que no remarca gravedad alguna. Consecuentemente si bien, estos datos muestran procesos de congestión pasiva, congestión activa, hígado graso de grado alto a dosis de 2000mg/kg, estas no representan niveles de riesgo grave en tanto no representa la dosis letal (DL_{50}), y por ello consideramos que la toxicidad aguda encontrada en los animales es no significativa en tanto se trata de alteraciones leves de carácter parcial no presentándose como lesión general.

Ahora, el análisis histopatológico de riñón de ratones tratados con 25mg/kg de extracto (tabla 13) esta vinculado a signos de congestión pasiva y/o esclerosis leve, cuyas frecuencias son del 33,33% para congestión pasiva y 16,67% para casos de esclerosis leve. Para los riñones de ratones experimentados a mayor dosis (2000mg/kg) encontramos mayor proporción de esclerosis (66.67%) y menor proporción de congestión (16,67 %) demostrando en la totalidad

de animales no mas del 50% de casos con lesión congestiva leve. Este conjunto de alteraciones en los estudios preclínicos de toxicidad es particularmente posible encontrar con suma frecuencia, ya que, el parénquima renal está expuesto a altas concentraciones de sustancias químicas debido a su gran flujo sanguíneo [(72)] y a los cambios renales que ocasionan las altas dosis de sustancias que se filtran y pasan a través del riñón eliminando así muchos fármacos y sus metabolitos. Hecho que explica que las lesiones intersticiales renales en los tres grupos experimentales no originan toxicidad, en tanto, adicionalmente las lesiones que aparecen con alguna frecuencia en esta especie animal, son atribuidas a las proteínas de la dieta [(73)].

Por su parte, la evaluación histopatológica del pulmón (tabla 14) en los tres grupos de animales experimentados denotan menos del 33.33% de casos con congestión pasiva, denotando ello que las diferentes dosis del extracto en estudio comparado con el grupo control mantuvieron condiciones aparentemente normales, en tanto esta última lesión puede deberse a la inspiración del ratón expuesto al formol (altamente volátil) antes de ser sometido a la eutanasia, comprometiendo la función del parénquima pulmonar y las vías de respiración alta donde produce irritación al ser inhalado, tal como ocurre en humanos que sufren de asma susceptibles a los efectos de inhalación de formaldehído[(74)]. Por ello concluimos que extracto en estudio no es toxico ya que no se observo síntomas de enfermedad pulmonar.

Referente a la evaluación en toxicidad subcrónica evidenciado mediante un seguimiento de 12 semanas se obtuvo los resultados siguientes:

El peso corporal de los animales machos y hembras sometidos a experimentación (tabla 15) en animales tratados con dosis de 500 mg/kg y 1000 mg/kg generaron incrementos de peso corporal de 3,2 grs. y 7,6 grs. respectivamente, sin embargo el grupo de animales machos administrados con dosis de 250mg/kg mostró un decremento desde 36,6 grs al primer día hasta 36,0 grs en la última semana. Este decremento excepcional no puede ser considerado como un indicador de toxicidad, en tanto las diferencias encontradas en animales con dosis mayores 500 y 1000mg/kg no muestran diferencias de modo que este comportamiento a priori es atípico pero no de importancia para el experimento.

Los pesos corporales de ratones hembras expuesto a tratamientos distintos mostró márgenes de variación más estrechos que los machos, ya que su variación es menos perceptible y al análisis

de varianza no demuestra diferencia significativa ($p<0,05$), denotando ello normalidad y criterio de buena tolerabilidad.

En la tabla 16, el análisis de la fórmula leucocitaria en ratones machos y hembras administrados con distintas dosis de extracto respecto al grupo control presentaron diferencias significativas ($p<0,01$), así la aplicación de 250mg/kg en machos generó un aumento de abastonados, eosinófilos (eosinofilia) y linfocitos (linfocitosis), mientras que en hembras solamente se observo aumento de linfocitos (linfocitosis).

Si bien el aumento de abastonados sugiere generación de inflamación y la eosinófilia muestra un indicador de síndrome de hipersensibilidad caracterizada por presentar una triada conformada por fiebre, erupción cutánea y compromiso de órganos internos [(75)]. Nuestro resultado no se acompaña de esta sintomatología, sugiriendo que mientras el incremento de abastonados seria una reacción fisiológica de sensibilidad a la presencia de compuestos del extracto considerando que esta actúa en el organismo como un cuerpo extraño, la eosinofilia y la linfocitosis seria consecuencia del estrés de los animales experimentados, ya que el aumento de linfocitos tampoco se acompañado con otras alteraciones físicas u orgánicas no obstante que este fenómeno esta relacionado con infecciones[(76)] .

Por su parte la dosificación de 500 mg/kg en machos generó basofilia y linfocitosis, mientras que en hembras los mayores valores fueron de abastonados y segmentados.

Cuando la dosis incrementa a 1000 mg/kg de extracto en ratones machos se produce un incremento de abastonados, basófilos y linfocitos, mientras que las hembras responden solamente con mayores índices de abastonados y segmentados. Este aumento de abastonados sugiere una desviación a la izquierda que significa aumento del número de abastonados en sangre periférica con aparición de células sanguíneas jóvenes [(77)]. Sin embargo la formula leucocitaria encontrada no mostró un diagnóstico de eosinófilia cuando se aplica 500 y 1000mg/kg de extracto, lo que hace considerar que el extracto de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd es inocuo.

La toxicidad subcrónica evaluada mediante el análisis histopatológico del cerebro (tabla 17) en animales administrados con 250 y 1000mg/kg denotaron proporciones no mayores al 30% de casos con edema discreto, sin embargo cuando se administra 500 mg/kg de extracto se observó ausencia de esta lesión (Anexo 3). Este comportamiento ligado a respuestas de edema discreto

que dependen consustancialmente de la condición natural de adaptación del animal al extracto de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd sobre la base de resistencia biológica del animal. Al respecto Grisolle menciona que estos accidentes en el cerebro persisten por lo común y pueden curarse espontáneamente por lo que su intensidad va disminuyendo de un modo sucesivo [(78)].

La tabla 18 muestra información referente al hígado. En el estudio macroscópico se observó un hígado aumentado de volumen y tamaño presentando una coloración café rojizo.

Sin embargo el análisis histopatológico del hígado de ratón los tres grupos tratados, como consecuencia de una congestión ya sea pasiva o activa representa en menos del 30% de lesiones los animales, sin embargo los casos de microvacuolado hepático son mas abundantes llegando al 70% cuando se aplica una dosis de 1000mg/kg, lo cual no demuestra toxicidad alguna porque esta corresponde a una acumulación celular de lípidos, glicógeno u otras sustancias acompañado de congestión e hipertrofia hepatocelular [(79)] considerando que en el experimento a la dosis de 250mg/kg produce mayor proporción de casos de microvacuolado (90%), seguida por el grupo de animales tratados con 1000 y 500mg/kg (70% y 60% respectivamente).

De otra parte, las dosis de 500, 1000 mg/kg aplicados a animales de experimentación presentaron congestión activa entre el 10% y 30%, observándose además al grupo centinela (1000mg/kg) con 80% de casos congestivos no obstante los cuadros de congestión activa solo manifestaron alteración parcial[(70)]. Sin embargo las congestiones pudieron deberse a un descenso de flujo sanguíneo secundario de estasis venoso, cuyos cambios se producen fundamentalmente por la anoxia que sufren las células y por irritación prolongada de estasis, donde el parénquima hepático se puede manifestar como hemorragias y congestión centro lobulillar entre otros [(80)].

Además que el hígado es un órgano vulnerable a la actividad toxica de diferentes sustancias por las amplias vías metabólicas que se lleva acabo [(71)].

La toxicidad subcrónica evaluada en la tabla 19, mostró lesiones renales en animales tratados en proporción diversa. Así los animales con tratamiento de 250mg/kg dieron lugar al 30% de casos con congestión pasiva, mientras que las mayores dosificaciones de 500 y 1000 mg/kg generan cada una 20% de casos de congestión activa.

De otro lado, con dosis de 500 y 1000mg/kg la presencia de esclerosis moderada (20 al 50% de casos) aparece en mayor proporción que la esclerosis leve (10 al 20% de casos), en tanto los cuadros de fibrosis arteriosclerótica renal constituyen una lesión espontánea, de las cuales la más común e importante en roedores es la neuropatía crónica como indica Tillan que esta lesión comienza entre los 3 y 6 meses de edad y se manifiesta a través de los túbulos renales basofílicos, ensanchamiento de los glomérulos de la membrana, fibrosis intersticial, focos de infiltrados celulares y glomeruloesclerosis. La patogénesis se relaciona con la perdida de proteínas tras el aumento de porosidad de la membrana basal.

Los signos de congestión pulmonar establecido en la tabla 20 como consecuencia del tratamiento de animales con las tres dosis establecidas demostraron tener cada una 30% de casos de congestión pasiva y menores proporciones de congestión activa (20%), los cuales resultan incluso inferiores a los encontrados en el grupo centinela que muestra 60% de casos con congestión pasiva y 30% de casos con congestión activa. Estos porcentajes de alteraciones observadas no es atribuible al extracto, debido a que los animales no mostraron síntomas de enfermedad pulmonar durante los 90 días de tratamiento, no significando riesgo de gravedad para los efectos de la salud de los animales experimentados.

Es mas, los cuadros comunes de toxicidad subcrónica compromete el acto reflejo de los animales como sucedió en el estudio con extracto acuoso liofilizado de las hojas de ***Plantago majo*r** (llantén) a dosis de 2000 mg/kg, al segundo día de administración del extracto genero una disminución del reflejo físico, y a partir del día 12 disminuyo su actividad prensil anterior y posterior, manteniéndose estos efectos hasta el periodo final del ensayo (toxicidad muy baja) [(81)]. Situación no observada con el extracto estudiado en los ratones administrados a diferentes dosis no alteró el estado de los reflejos físicos durante 90 días.

Finalmente el estudio de toxicidad en ratones administrados con extracto liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd por vía oral, no mostró toxicidad aguda empleando las dosis de 2000mg/kg ni toxicidad subcrónica ensayando dosis de 1000mg/kg de extracto ya que las alteraciones leves encontradas no provoca efectos significativos de toxicidad ni mortalidad atribuible a la sustancia de prueba. Lo cual permite clasificarlo de acuerdo a las normas de la comunidad europea como “producto no tóxico” (clasificación de la toxicidad aguda oral). [(82)]

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd (panti panti) contienen metabolitos secundarios tales como taninos, alcaloides, saponinas, esteroides, triterpenos, lactonas sesquiterpénicas, glúcidos; principalmente compuestos fenólicos de las cuales se elucidaron estructuras de flavonas: 5, 6, 7- trimetoxi flavona; 4', 5,7- trihidroxi flavona o apigenina; 4',5-dihidroxi-7- metoxi flavona; 4', 5- dihidroxi- 7 – O R flavona; 4', 7-dihidroxi- 5- metoxi flavona.

2. Se demostró que el extracto liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd es antitusiva en cobayos con inducción de tos por nebulización con ácido cítrico, encontrando mayor eficacia con dosis de 1000mg/kg (84.6%) que el efecto de codeína fosfato 10mg/kg (74,6%).

3. La investigación toxicológica en ratones con el extracto liofilizado de las flores de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd se ha evidenciado que es inocua en el estudio de toxicidad aguda hasta 2000mg/kg y en los ensayos de toxicidad a dosis repetida hasta 1000mg/kg durante 90días, administrados por vía oral.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Winston C. Proyecto creado por James Li Sir High School Grado 10. Historia. 2003. p.1-3.
2. Tyler V. Productos naturales y la medicina: una visión general. En: Balick M; Elisabetsky E.; Laird S. Medicamentos de los recursos forestales tropicales, la biodiversidad y su importancia para la salud humana. Nueva York: Columbia University Press. 1996. p. 3-10.
3. Organización Panamericana de Salud -OPS; Washington, DC. 29 de junio. Aumentan infecciones respiratorias en Perú después del terremoto, Promoviendo la salud en América. 2001.
4. Damiá A, Perpiñá T, M. Estudio y diagnóstico de la tos crónica en el adulto. Servicio de Neumología. Hospital Universitario La Fe. Valencia. Revisiones. Volumen 36, Número 4, Abril 2000. Disponible en: http://www.archbronconeumol.org/cgibin/wdbcgi.exe/abn/mrevista.fulltext?pident=9706
5. Análisis de la situación de Salud del Perú. Dirección general de Epidemiología. Serie Perú/MINSA/OGE/010. Ministerio de Salud, Dirección general de estadística e informática. Hecho el depósito legal en la Biblioteca Nacional del Perú. 2006.
6. Ministerio de Salud, Biblioteca virtual. Estadísticas de salud cuadros resúmenes de principales estadísticas actualizadas al 2006. Disponible en: http://www.minsa.gob.pe/portada/estadistica.htm
7. Rodríguez A. Harker M, Quezada-Solís A. y Casillas-Gaeta S. Diversidad y potencial ornamental del género ***Cosmos Cav***. (Asteraceae) en Jalisco. Departamento de Botánica y Zoología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. 2006. Disponible en: http://www.cucba.udg.mx/new/publicaciones/avances/avances_2006/Biologia/RodriguezContrerasAaron/Rodriguez_Contreras_Aaron_1.pdf
8. Zardini E. Etnobotánica de compuestas argentinas con especial referencia a su uso Famacológico. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata Paseo del Bosque. Acta Fam, Bonaerense. Argentina.1984. 3(1): 77-99. Disponible en: http://www.latamjpharm.org/trabajos/3/1/LAJOP_3_1_3_1_13O25V6KA8.pdf
9. Urrunaga SR. Conocimientos prácticos e innovaciones a los parientes silvestres. Proyecto Conservación In Situ de Cultivos Nativos y sus Parientes Silvestres. Perú. 1998. p. 61-71.

10. Wikimedia Foundation, Inc., 3 setiembre del 2008. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Cosmos

11. Tambonatura, secreto Inca de Salud y Belleza. Asteracea- ***Cosmos peucednifolius***. Alpakita producción. 2008. Disponible en: http://www.tambonatura.com/es/infusiones/filtrante-panty.html

12. Sanz M, Elías D, Sanchez D, Sobrino VE. Universidad Politécnica de Madrid, Departamento de Producción Vegetal: Botánica Universidad de Almería, Departamento de Biología Vegetal y Ecología. Aportaciones a la flora de la provincia de Segovia (España) II. Disponible en: http://www.ucm.es/BUCM/revistas/bio/02144565/articulos/BOCM0303110077B.PDF

13. Inkas Cusco, Información general. Travel agency. 2005. Disponible en: http://www.inkascusco.com/02p_24choquequirao.htm

14. Yarupaitán G; Albán J. Flora silvestre de los Andes centrales del Perú: un estudio en la zona de Quilcas, Junín. Rev. Biología. 2003;10(2):155-162.

15. Parra F, Torres G, Ceroni A. Composición florística y vegetal de una microcuenta andina Pachachaca. Universidad Nacional Agraria la Molina.2004;3(1,2) 11-14.

16. Brack E. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú Centro de estudios regionales Andinos, Programa de las Naciones Unidas para desarrollo, Bartolomé de las Casas. Perú.1999. p. 154

17. Bolivia Cheklist Browse the flora by. Family name. Generus name. Disponible en: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=40&taxon_id=108151

18. Anexo I Angiospermae Dicotyledoneae. Disponible en: http://www.ambiente.gov.ar/archivos/web/normativa/File/ANEXO1_R578.pdf

19. *Cosmos bipinnatus* Cav. Photographs and descriptions of the flowering and non flowering plants of Missouri, USA. 2008. Disponible en: http://www.missouriplants.com/Pinkopp/Cosmos_bipinnatus_page.html

20. Offering the best in natural supplements Cosmos.2002; (citado el 2008). Disponible en: http://fichas.infojardin.com/perennes-anuales/cosmos-bipinnatus-cosmos.htm

21. La Guía de plantas y flores. 2008. Disponible en: http://club.telepolis.com/mrpotato/PlantasW/Principal.htm?/mrpotato/PlantasW/PLANTA/199.htm

22. López TL. Tomillo propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. Ámbito farmacéutico. Fitoterapia (F.F.A.R) 2006; 25(1). Disponible en: http://external.doyma.es/pdf/4/4v25n01a13083626pdf001.pdf

23. Vekiaris A, Oreopoulou V, Tzia C, Thomopoulos C D. Oregano Flavonoids as Lipid Antioxidants. National tech. univ. Athens, dep. chemical eng, lab. food chemistry technology, 15780 Zografou, Grece. 1993; 70 (5): 483-487.

24. Fitoterapia. Scrib. 2007. Disponible en: http://www.scribd.com/doc/887349/Fitoterapia

25. Muñoz L M. Plantas medicinales españolas: ***Inula helenium*** L., ***Asteraceae,*** ínula. Botanica. Complut. 2004; (28):127-142.

26. Boskabady MH, Rakhshandah M, Afiat M, Amiri S. Antitussive effect of ***Plantago lanceolata*** in guinea pigs. Iran J Med. Sci. 2006; 31(3): 143-146.

27. Mohammad N. Efecto del Béquico de Rosa damascena en cuyes. El periódico Iraní de investigación farmacéutica. Irán.2003; p 231-234.

28. Boskabady M, Kiani S, Jandaghi P, Ziaei T, Zarei A. Antitussive effect of *Nigella sativa* in guinea pigs. Dept. of Physiology, Ghaem Medical Centre, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.: Pakistan Journal of Medical Sciences, 2004; 20 (3): 224-228.

29. Mello FB, Mello JRB. Eficácia antitussígena de duas formulações fitoterápicas. Arq. Brasil. Med. Vet. Zootec. 2007; 59 (3): 705-710.

30. Meneghello J, Fanta,N, París E, Puga T. Pediatría; Tomo I. Quinta edición; editorial. Médica. Panamericana;1997.

31. Menédez R, Pavón G. ***Plecthanthus amboinicus*** *(Lour.*)Spreng en: Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) Rev. Cubana Planta Med 1999; 3(3):110-115.

32. Ahmad MS, Ahmad MU, Osman SM. And new hydroxyolenifec acid from ***plantago mayor*** seed oil. Phytochemistry: 1980. http://www.hipernatural.com/es/pltllanten.html

33. Tomillo. *Thymus Vulgaris L.* http://www.ecovisiones.cl/ecovida/hierbas/Tomillo1.htm

34. Fitoterapia. Disponible en: http://personal.redestb.es/martin/PFITO.HTM http://www.ucm.es/BUCM/revistas/bio/02144565/articulos/BOCM0404110127A.PDF

35. Lagarto A, Guerra MI. Toxicidad aguda oral de 3 formas farmacéuticas a partir de C*assia grandis* L. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Departamento de Investigaciones Biológicas. Rev. Cubana Plant Med 2000; 5(2):68-70.

36. Carretero M. Plantas medicinales. Alcaloides: derivados de Fenil alanina. Revista Panorama Actual Médica 2001; 25(242) 341-346.

37. Vega R, Lagarto A, García A, Piloto J. Toxicidad de un extracto tánico de ***Pinus cabaea morelet***. Investigación y Desarrollo de Medicamento-CIDEM. Rev. Cubana de plantas medicinales 2005; may-agosto (10)2:1-7.

38. Álvarez Martín, S. Monografía "Contribución a la Farmacopea Vegetal de Cuba" (Inédito). Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/doc/sitios/mednat/monografias_plantas_medicinales.doc

39. Lagarto A. Tillán C, Cabrera Y. Toxicidad aguda del extracto fluido de ***Mentha spicata L*** (hierba buena). Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamento-CIDEM. Rev. Cubana plantas medicinales.1997; mayo-agosto (2)2:1-3. Disponible en:

40. Huerta I**,** Turiño **J**, Ferrándiz D, Martínez R, León María.Toxicología Aguda Oral de la decocción la ***Peperomia pellucida***, (L.) H.B.K. (Corazón de hombre) Rev. de toxicología en línea. 2003. Disponible en: http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=97

41. García M, Coto T, Gonzáles S, Pazos L. Toxicidad subcrónica del extracto acuoso de las hojas y los brotes florales de ***Stachytarpheta jamaicensis L.*** Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamento-CIDEM. Rev.Cubana plantas medicinales. 2002; 8 (2):1-3.

42. Melvin R, Wissam A. "Make The Cough Go Away". Revista Chest.2006; 129 (5)1121-1122.

43.Philippe L. Future Directions in the Clinical Management of Cough. Chest. 2006; 129: suppl 1:287S.

44. Rice Mc**,** Pavord I. Recommendations for the management of cough in adults. on behalf of the British Thoracic Society Cough Guideline Group Thorax. 2006; 61: Suppl 1:i1-i24.

45. Urbina P. Tos y Antitusivos I Fisiología y Clínica de la Tos. Universidad de Chile, Hospital Clínico San Borja Arriarán. Revista medwave 2004; 4 (6): 1-5.

46 Padilla C. La Tos. Revista de la Facultad de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Iberoamérica. UNIBE. 2009; 1(2) 2009

47. Brendan J Canning. Practice Guidelines Reflex: ACCP Evidence Based Clinical Anatomy and Neurophysiology of the Cough. Chest. Official publication of the American college of chest physicians. 2006; 129: suppl 1: 33S-47S.

48. Municipalidad Distrital de Acora. Gobierno local. 2007. Disponible en: http://www.muniacora.gob.pe/ubicacionmapa.php

49. Características agro-climática, Biológica y Socio-Económica de la Micro región Ilave. Centro internacional de investigaciones para el desarrollo 1997 nov. [citado en 1998] (aprox.4p.) disponible en: http://archive.idrc.ca/library/document/103453/index_s.html

50. Miranda Martinez M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Cuba. 2002

51. Lock de Ugaz O. Investigación fítoquímica; métodos en el estudio de productos naturales, 2da edición, Fondo Editorial Pontificia Universidad católica del Lima- Perú. 1994.

52. Domínguez X. Método de Investigación fitoquímica. Edición Lumuda S.A. México DF.1985.

53. Arroyo A, Rojas A. Investigación Farmacológica Preclínica y clínica. Métodos procedimientos e interpretación. 1ra. Edición: 2008; p.104-105.

54. Occhiuto R, Sanogo MP, Angelo VD, Pasquele R. Pharmacy and Pharmacology" Effects of some Malian medicinal plants on the respiratory tract of guinea- pigs. 1999; 51 (11):1299-1303.

55. OECD Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method 423. Adopted.17th December 2001.

56. Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de histopatológico. Ministerio de salud. Centro nacional de laboratorios de salud pública, serie de normas técnicas Frecuencia 24, Dic. Lima 1997.

57. La coloración de Wright es similar a la de May Grunwald-Giemsa?.2007. Disponible en: http://espanol.answers.yahoo.com/question/index?qid=20071115080458AAo1yUZ

58. OECD. Guideline for the Testing of chemicals Nº 408.Repreated Dose 90-Dey Study oral toxicity Stude in rodents.1998.

59. Álvarez J. La controversia sobre la vivisección. Rev. Acta bioeth. México.2007;13 (1): 53-60.

60. Apuntes de deontología biológica. Capitulo 28. Ética de la experimentación animal. 2009.p 177-193. disponible en: www.unav.es/humbiomedicas/.../experimentacion_animal.pdf -

61. Bermúdez T, Deodelsy: Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales

por un método alternativo. Redvet. Revista electrónica de Veterinaria. 2007; 8 (3): 1695- 1702.

62. Mabry TJ, Thomas MB. The systematic Identification of flavonoids. Springer- Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. 1970.

63. Yolanda A, Magi F. Farmacología de los opiodes. Instituto Municipal de Investigación médica. Universidad Autónoma de Barcelona.2005; 17:suppl 2: 21-40.

64. Valverde O; Maldonado R. Neurobiología de la adicción a opiáceos. Laboratorio de Neurofarmacologia, Facultat de Ciènces de la Salut i de la Vida, Universitat. 2005; 17 suppl 2: 41-56.

65. Olivier K, Maréchal M, Llau ME, Lapeyre, Damase-M, Montastruc J.Use of Codeine Non–Codeine Cough Suppressants. A Survey among a French Network of community pharmacists. Departament of Clinical Pharmacology. Rev. Clin Drug Invest 2002;22(6):339-402.

66 Castells Molina Silvia, Hernandez- Peréz. Farmacología en enfermería. Conceptos generales de formas farmacéuticas. Edición 2. España. 2007.p 268-269.

67. Bruneton, Jean Farmacognosia. Fitoquímica de plantas medicinales. Editorial Acribia, S.A. 2001- España.

68. Valiente D, Alfonso C, Bernardo M, Molina J, Valentina T. González C. Crecimiento y composición corporal de las crías de ratas sometidas a restricción alimentaría. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas. Rev. Invest Bimed.Cuba.1998; 18 (2): 104-110.

69. Gámez R, Noa M, Más R, Rodríguez M, Rodeiro I, Mendez R, et al. Toxicología Subcrónica Oral del D-003 en Ratones NMRI. Centro de Productos Naturales, Centro Nacional de Investigaciones Científicas Latin American Journal of Pharmacy. Lat. Am. J. Pharm. 2007; 26 (5):663

70. Edouard Monneret Louis Freury. Tratado completo de patología general y especial interna. Madrid. Volumen 2.1984. p.379- 382.

71. Bello G, Cerrain, A. Fundamentos de ciencia toxicológica. Editado en España. 2001.p 220-225

72. Hodgson, E., Levi, P.E. Modern toxicology. 2ªEd. Appeton & Lange, North Carolina.1997. p 206

73. Zúñiga J, Tur M, Milocco S, Piñero R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. McGraw Hill-Interamericana. En determinación de la toxicidad subcrónica de la Zebrina péndula en ratones. 2005; 14 enero, dic.: 67-77.

74. Wikipedia, la enciclopedia libre. Formaldehído. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Formaldeh%C3%ADdo

75. Sullivan JR, Shear NH. The drug hypersensitivity syndrome: what is the pathogenesis? Arch Dermatol. En Aguirre T, Hunayay R, Falconi L, Malaga A, Germán Síndrome de hipersensibilidad por uso de Trimetoprim/sulfametoxazol: Reporte de un caso**.** Rev Med Hered. 2006; 17(2):109-114.

76. Christopher P. Animals models in toxicology.Edited by Sayne Cox Gad, Becton Dickinson and Company. Research triangle park, North Carolina.New York. Basel. Hong Kong.1992. p 774-776

77. Velásquez J. Fisiología de la sangre y del sistema inmunológico. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.1996. p 81-82.

78. Grisolle A. Tratado elemental y práctico de patología interna. Prime tomo. Editado en Madrid.1857. p 170-175.

79. Greaves, P.Histopathology of preclinical toxicity studies, interpretation and relevance in drug safety evaluation. 2ª Ed. Elsevier science publishers. Amsterdan. 2000.

80. Lagarto A, Tillán J, Bueno V, Chavéz I, GuerraI, Vega Y, et al. Toxicidad aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de ***Ocimum tenuiflorum L.*** Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamento. Rev. Toxicológia 2004;18 (22):175-179.

81. García M, Coto T, Soto R, Gerardo A.Toxicidad sub-crónica y prueba de irritabilidad ocular del extracto acuoso de las hojas de ***Plantago major*** (Plantaginaceae). Rev. biol. trop. 2003; 51 (3,4): 635-638.

82. Commission of the European Communities Annex to Commission Directive 92/69/EEC. Adapting totechnical progress for the seventeenth time Council Directive67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packagingand labelling of dangerous substances. Acute toxicity (oral) Off. J. Eur. Comm. 1992; 383 (35): 110-112.

ANEXOS VIII.

Anexo 1

Procedimiento de separación de los metabolitos secundarios del extracto acuoso liofilizado de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd por cromatografía en columna, en el laboratorio de Química orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.



Fig. 19 Columna cromatográfica.

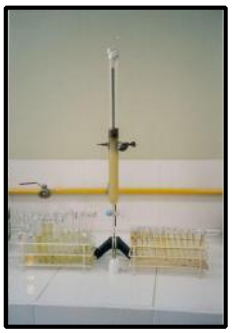


Fig.20 Recolección de eluyentes



Fig. 21 Sembrado de los eluyentes en Cromatoplacas de silicagel.

Anexo 2

Muestras de recolección de los órganos de ratones: cerebros, hígados, riñones, pulmones y frotis de sangre de ratones con extracto acuoso liofilizado de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd en toxicidad subcrónica, en el bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM.



Fig.22 Muestras de órganos de ratones cerebros, hígados, riñones y pulmón. Toxicidad subcrónica.

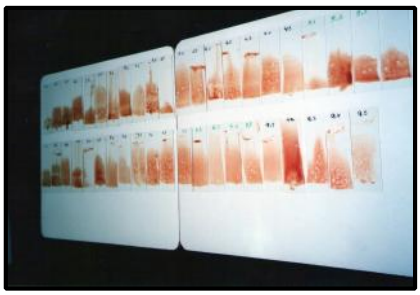


Fig.23 . Muestras de frotis de sangre de ratón Toxicidad subcrónica.

Anexo 3

Condición normal de cerebro de ratón después de 90 días con el extracto acuoso liofilizado de ***Cosmos peucedanifolius*** Wedd en el bioterio de la Facultad de Medicina humana de la UNMSM



Fig. 24 .Cerebro de ratón macho en

Condición normal. Toxicidad subcrónica.