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

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

Identificación de metabolitos secundarios y evaluación del efecto antiinflamatorio y cicatrizante del extracto etanólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala"

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Carlos Javier VARGAS CARBAJAL

ASESOR

Dra. Delia Yolanda WHU WHU

Lima, Perú

2022



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

Vargas C. Identificación de metabolitos secundarios y evaluación del efecto antiinflamatorio y cicatrizante del extracto etanólico de rizomas de Niphidium crassifolium (L.) Lellinger “Calaguala” [Tesis de doctorado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2022.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Carlos Javier Vargas Carbajal
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25651926
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4016-0095
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Delia Yolanda Whu Whu
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07386356
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1239-4575
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07371298
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Jorge Luis Arroyo Acevedo
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06785241
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	José Alfonso Apesteguia Infantes
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	09359857

Datos de investigación	
Línea de investigación	Ciencia de la Salud: Farmacología
Grupo de investigación	Fitofármacos y Salud
Agencia de financiamiento	Autofinanciado
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.056445 Longitud: -77.085994
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2018 – Diciembre 2020
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Siendo las **08:00 horas 23 de junio de 2022** se reunieron mediante la plataforma de Google Meet de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Evaluador de Tesis, presidido por el Dr. Luis Miguel Visitación Felix Veliz e integrado por los siguientes miembros: Dra. Delia Yolanda Whu Whu (asesora), Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo y Dr. José Alfonso Apesteguia Infantes; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y CICATRIZANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE RIZOMAS DE *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "CALAGUALA"**, presentado por el Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos **CARLOS JAVIER VARGAS CARBAJAL.**

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación, el Jurado Evaluador de Tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

DIECISIETE (17) MUY BUENO

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Magíster en Recursos Vegetales y Terapéuticos **CARLOS JAVIER VARGAS CARBAJAL** el Grado Académico de **Doctor en Farmacia y Bioquímica**.

Siendo las 09.30 hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las 09.30 hrs. del 23 de junio de 2022.

Dr. Luis Miguel Visitación Felix Veliz (P.P., T.C.)
Presidente

Dra. Delia Yolanda Whu Whu (P. P., T.C)
Miembro - Asesora

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (P. P., T.C.)
Miembro

Dr. José Alfonso Apesteguia Infantes (P. P., T.C.)
Miembro

Observaciones:.....

Jr. Puno 1002 – Lima 1
Apartado Postal 4559 Lima 1
Teléfono 619-7000 anexo 4812
Email:upg.farmacia@unmsm.edu.pe

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Unidad de Posgrado

EL DIRECTOR DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS QUE SUSCRIBE DEJA,

CONSTANCIA

00046-FFB-UPG-2021

Que mediante procedimiento de la evaluación de originalidad según Resolución Rectoral N° 043005-R-18, de la tesis intitulada **IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO Y CICATRIZANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE RIZOMAS DE *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger_("CALAGUALA")**, presentado por **CARLOS JAVIER VARGAS CARBAJAL,** con fecha de recepción 25/08/2021, con fecha de aplicación al programa de similitud el 28/09/2021 con el software utilizado el TURNITIN, con la configuración de exclusión de textos entrecomillas, bibliografías y cadenas menores a 40 palabras, mediante el procedimiento de la evaluación de originalidad, el porcentaje de similitud según programa detector es **7%**, por lo que, cumple los criterios de originalidad sin observación, según informe adjunto.

Se expide la presente constancia para el trámite de expedito, según lo establecido en el Reglamento General de Estudios de Posgrado 2018, aprobado con RR. 04790-R-18.

Lima, 04 de octubre de 2021

UNMSM
Firmado digitalmente por JAVE NAKAYO Jorge Leonardo FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.10.2021 23:12:43 -05:00

DR. JORGE LEONARDO JAVE NAKAYO
DIRECTOR

JLJN/ecj

DEDICATORIA

“AL CREADOR DE TODO, EL CUAL GUIA SIEMPRE MI CAMINO”

A MIS FAMILIARES POR SU APOYO INCONDICIONAL

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la cual me forje como profesional y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica mi alma mater.

Al Laboratorio Farmacéutico ACFARMA el cual me brindo todas las facilidades para mi tesis y también para los excelentes profesionales Químicos Farmacéuticos que allí laboran.

Al Laboratorio de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por brindarme sus instalaciones y equipos para la lectura espectral.

A mi asesora la Dra. Delia Whu Whu por sus sugerencias, conocimientos y sobre todo por su calidad humana.

Al Dr. Jorge Arroyo Acevedo el cual contribuyo con mi trabajo de investigación en la parte farmacológica, sobre todo como inspirador de muchos profesionales por ser un destacado investigador que prestigia nuestra profesión.

Al honorable jurado Evaluador y Calificador:

Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz (Presidente)

Dra. Delia Yolanda Whu Whu (Miembro - Asesora)

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo (Miembro)

Dr. José Alfonso Apesteguia Infantes (Miembro)

A todos ellos por sus sugerencias y valiosos conocimientos

INDICE GENERAL

DEDICATORIA ii

AGRADECIMIENTO iii

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS iv

RESUMEN v

SUMMARY vi

RESUMO vii

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN 1

1.1 Situación Problemática 1

1.2 Formulación del Problema 1

1.3 Justificación 2

1.4 Objetivos 3

1.5 Hipótesis 3

1.6 Identificación de variables 3

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO 4

2.1 Marco Filosófico 4

2.2 Bases Teóricas 7

2.3 Antecedentes de la investigación: 13

CAPITULO III: METODOLOGÍA 16

3.1 Materiales, Reactivos y Equipos 16

3.2 Animales de experimentación 20

3.3 Recolección y clasificación taxonómica de la especie vegetal 20

3.4 Tratamiento de la muestra 20

3.5 Obtención del extracto etanólico 20

3.6 Estudio fitoquímico y Análisis preliminar 21

3.7 Estudio cromatográfico 21
3.8 Estudio del efecto antiinflamatorio en ratones 22
3.9 Estudio del efecto cicatrizante en ratones 24
3.10 Análisis estadístico 26
3.11 Consideraciones éticas 26
CAPITULO IV: RESULTADOS 27
CAPITULO V: DISCUSIÓN 46
CAPITULO VI: CONCLUSIONES 52
CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 53
CAPITULO VIII: ANEXOS 61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Conformación de grupos por lote para el estudio del efecto antiinflamatorio**.** 23
Tabla 2 Preparación de crema base. 23
Tabla 3 Conformación de grupos por lote para el estudio del efecto cicatrizante. 25
Tabla 4 Prueba de solubilidad en el extracto etanólico. 27
Tabla 5 Estudio fitoquímico del extracto etanólico. 28
Tabla 6 Estudio cromatográfico del extracto etanólico 29
Tabla 7 Procedimiento de inflamación en oreja de ratón. 30
Tabla 8 Valoración del efecto antiinflamatorio en ratón. 31
Tabla 9 Pesos obtenidos de las secciones circulares extraídas de las orejas sin tratar (mg) y de las orejas tratadas (mg). 32
Tabla 10 Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el extracto al 5% con el estándar. 33
Tabla 11 Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el extracto al 10% con el estándar. 34
Tabla 12 Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el extracto al 20% con el estándar. 35
Tabla 13 Análisis de múltiples comparaciones para el efecto antiinflamatorio. 36
Tabla 14 Análisis de varianza para el efecto antiinflamatorio. 37
Tabla 15 Análisis descriptivo del efecto antiinflamatorio en ratones. 37
Tabla 16 Prueba de homogeneidad de varianzas para el efecto antiinflamatorio. 38
Tabla 17 Análisis de múltiples comparaciones para el ensayo del efecto cicatrizante. 39
Tabla 18 Efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el estándar con el extracto al 5%. 40
Tabla 19 Efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el estándar con el extracto al 10%. 41
Tabla 20 Efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el estándar con el extracto al 20%. 42
Tabla 21 Anova. Análisis de varianza de la fuerza necesaria para abrir las lesiones en el efecto cicatrizante en ratones. 43
Tabla 22 Análisis descriptivo del ensayo del efecto cicatrizante**.** 43
Tabla 23 Prueba de homogeneidad de varianzas para el efecto cicatrizante 44
Tabla 24 Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6 y desplazamiento batocrómico. 45
Tabla 25 Delta del peso y porcentaje de inhibición de inflamación. 64
Tabla 26 Valoración del efecto cicatrizante en ratones 65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala" 6
Figura 2. Departamento de Ancash 8
Figura 3. Clasificación de Flavonoides 9
Figura 4. Flujograma del trabajo experimental 19
Figura 5. Comparación después del Tto estándar vs Extracto 5% 33
Figura 6. Comparación después del Tto. Estándar vs Extracto 10% 34
Figura 7. Comparación después del Tto estándar vs Extracto 20% 35
Figura 8. Comparación después del Tto. estándar vs Extracto 5% 40
Figura 9. Comparación después del Tto. estándar vs Extracto 10% 41
Figura 10. Comparación después del Tto. estándar vs Extracto 20% 42
Figura 11. 4,7 - Dihidroxiflavona. 45
Figura 12. Medios +- Error medio Efecto antiinflamatorio 62
Figura 13. Valores medios – Efecto cicatrizante 62
Figura 14 Recolección 67
Figura 15. Lavado de rizomas 66
Figura 16 Trozado de rizomas 66
Figura 17. Secado de rizomas 66
Figura 18. Secado 3 días. 66
Figura 19. Trozado de rizomas 66
Figura 20. Estudio fitoquímico 67
Figura 21. Cromatofolio 67
Figura 22. Corrida de placa 67
Figura 23. Sembrado del extracto 67
Figura 24. Revelado UV 67
Figura 25.Revelado UV 67
Figura 26. Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico tal cual. 68
Figura 27. Lectura al espectrofotómetro de la muestra n°6. Desplazamiento batocrómico MeONa a los cero minutos. 69
Figura 28. Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico MeONa a los 5 minutos. 70
Figura 29. Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico AlCl3 .. 71
Figura 30.Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico AlCl3 + HCl 72
Figura 31.Lectura al espectrofotómetro muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico con NaCH3COO a los 2 minutos 73

Figura 32.Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico NaCH3COO a los 5 minutos. 73
Figura 33.Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico NaCH3COO + H3BO3 73

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, tiene como objetivo determinar los efectos terapéuticos (antiinflamatorios y cicatrizantes) del extracto etanólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger ("Calaguala"). Se utilizó rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger ("Calaguala") y 50 ratones de raza Swiss de aproximadamente 3 meses de edad y promedio de peso de 27,5 g. + - 2,5g. Los animales para el efecto antiinflamatorio fueron divididos en 5 grupos (Grupo Control crema base, con lesión y sin tratamiento, grupo con lesión y tratamientos con Extracto etanólico al 5%, 10%, 20% en crema base y Grupo con lesión y tratamiento Estándar Diclofenaco en gel al 1%). Para el efecto cicatrizante también fueron divididos en 5 grupos (Grupo Control crema base, con lesión y sin tratamiento, grupo con lesión y tratamientos con Extracto etanólico al 5%, 10%, 20% en crema base y grupo Estándar con lesión y tratamiento con el Fármaco Cicatrín el cual está constituido por Neomicina 0,350 U, Bacitracina 50,000 U, glicina, L-cisteina, DL-treonina) una vez adaptados los animales a T° 21°C se procedió al experimento. Se determinó flavonoides, flavonas, taninos y quinonas. Para el efecto antiinflamatorio y de acuerdo a la tabla N° 13 del análisis de múltiples comparaciones no existe ninguna diferencia significativa donde ($p>0,05$). Para el efecto cicatrizante, existe mayor diferencia significativa con el extracto al 20% donde ($p< 0,0001$), (ver Tabla N° 17 del análisis de múltiples comparaciones), se demostró efecto cicatrizante. No se demostró efecto antiinflamatorio**.**

PALABRAS CLAVE*: Niphidium*, "Calaguala", efecto antiinflamatorio, cicatrizante

SUMMARY

The purpose of this research work is to determine the therapeutic effects (anti-inflammatory and healing) of the ethanol extract of rhizomes of *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala". Rhizomes of *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala" were used and 50 Swiss mice of approximately 3 months of age and average weight of 27, 5 g + - 2,5g. The animals for the anti-inflammatory effect were divided into 5 groups (Control group base cream with injury and without treatment group with injury and treatments with 5%, 10% and 20% ethanolic extract in base cream with injury and treatment. Standard Diclofenac gel at 1%). For the healing effect they were also divided into 5 group (Control group based cream with injury and without treatment, group with injury and treatments with 5%, 10% and 20% ethanolic extract in base cream and standard group with injury and treatment with the Cicatrín drug which is constituted by Neomycin 0,350 U, Bacitracin 50,000 U, glycine, L-cysteine, DL-threonine) once the animals were adapted to T° 21°C the experiment was carried out. Flavoids, flavones, tannins and quinones were determined. For the anti-inflammatory effect and according to table N° 13 of the analysis of multiple comparisons there is no significant difference where (p>0, 05). There is a 20% extract for the healing effect, were (p<0, 0001) (see table N° 17 of analysis of multiple comparisons), a healing effect was demonstrated. No anti-inflammatory effect was shown.

KEY WORD: Niphidium "Calaguala", anti-inflammatory, healing effect.

Resumo

O presente trabahlo de pesquisa tem como objetivo determinar os efeitos terapéuticos (anti-inflamatorios e cicatrizantes) do extrato etanólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L) Lellinger ("Calaguala"). Foram utilizados rizomas de *Niphidium crassifolium* (L) Lellinger ("Calaguala") e 50 camundongos Swiss de aproximadamente 3 meses de idade e peso medio de 27,5g +-2,5g. Os animais para o efeito anti-inflamatorio foram divididos em 5 grupos (Grupo creme de base controle, con lesao e sem tratamento, grupo com lesao e tratamentos com 5%, 10%, 20% de extrato etanólico em creme base e grupo com lesao e tratamento padrao em gel de diclofenaco 1%). Para o efeito cicatrizante, eles também foram divididos em 5 grupos (Grupo Controle de creme base con lesao e sem tratamento, grupo com lesao e tratamentos com 5%, 10%, 20% de Extrato Etanólico em creme base e grupo Padrao com lesao e tratamento com o medicamento Cicatrín que é constituido por Neomicina 0,350 U, Bacitracina 50000 U, glicina, L-cisteina, DL-treonina), uma vez que os animais foram adaptados a T° 21°C, a experiencia foi realizada. Foram determinados flavonoides, flavonas, taninos e quinonas. Para o efeito anti-inflamatorio e de acordó com a tabela N° 13 da análise de comparacoes múltiplas nao ha diferenca significativa onde ($p > 0,05$). Existe um extrato de 20% para o efeito de cura onde ($p < 0,0001$), (ver tabela N°17 da análise de comparacoes múltiplas), um efeito de cura foi demonstrado. Nenhum efeito anti-inflamatorio foi mostrado.

PALAVRAS CHAVE: *Niphidium*, "Calaguala", efeito anti-inflamatorio, efeito cicatrizante

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Situación Problemática

De nuestra Flora solo el 1% ha sido estudiada científicamente, encontrándose en muchas de ellas propiedades medicinales debido principalmente a metabolitos secundarios que contienen, que a dosis adecuadas no presentan efectos nocivos en el organismo humano, sino que contribuyen con acciones antioxidante, antiinflamatoria, cicatrizante, hepatoprotectora, antidiabética, antibacteriana entre otras [1, 2.]

Existen evidencias científicas que muchas plantas, especialmente las cortezas y rizomas al contener taninos se comprueba su acción cicatrizante, como se comprueba en el estudio de los extractos de las hojas de *Rhizophora mangle* L. [3].

Considerando la problemática de salud en nuestro país, existen diversas patologías referentes a enfermedades de la piel como son heridas, alergias, psoriasis, vitíligo que afectan a la población.

Se conoce que en los rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger se han identificado metabolitos con efecto cicatrizante y/o antiinflamatorio, pero se desea confirmar científicamente dichos eventos.

1.2 Formulación del Problema

¿Tendrá el extracto etanólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger administrado vía tópica efecto antiinflamatorio y cicatrizante?

1.3 Justificación

1.3.1 Justificación teórica

El Perú es uno de los países con mayor diversidad de plantas medicinales y la población las usa para la cura de diferentes enfermedades, se calcula que 25000 especies de la flora peruana el 30% son endémicas. La medicina tradicional ha sido usada ampliamente en nuestro país contribuyendo a la salud de la población, cuyo conocimiento ha sido transmitido de generación en generación.[4]

Los incas sabían de las propiedades de muchas plantas medicinales entre ellas se nombra el mutoy (*Cassia sp.),* la yuralmaycha y la harachigua (*Polipodium vulgare*), la cual es una planta de la familia Polipodium que tiene efecto medicinal [5.]

El presente trabajo de investigación se basa en la búsqueda de metabolitos secundarios presentes en la planta para tenerlos como una alternativa frente a productos comerciales.

Se busca también que los metabolitos hallados tengan efecto antiinflamatorio y cicatrizante frente a productos sintéticos. [6, 7.]

La planta *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger, denominada también Calaguala pertenece a la familia de la Polipodiáceas, existen diversas investigaciones científicas sobre efectos terapéuticos en la piel, de variedades de plantas de Calaguala, como *Campyloneurum amphostenon* y la planta *Anredera vesicaria*, (Yuca hiedra) las cuales poseen metabolitos secundarios como los flavonoides, taninos, quinonas que guardan relación con el efecto cicatrizante y antiinflamatorio [8, 9] Investigaciones realizadas a seis extractos hidroalcohólico de hojas como la *Annona muricata* L. (guanábana) se determinó un mayor efecto cicatrizante determinándose alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides por espectrofotometría UV visible, espectrofotometría infrarroja y ensayos de coloración. [10.]

1.3.2 Justificación Práctica

Contribuir al conocimiento de especies químicas del extracto etanólico de los rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger.

Demostrar el efecto antiinflamatorio y cicatrizante del extracto etanólico de los rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger, comparándolo con estándares con tales efectos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Identificar los metabolitos secundarios y determinar el efecto antiinflamatorio y cicatrizante del extracto etanólico de los rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger. (Calaguala).

1.4.2 Objetivos Específicos

1.- Identificar los principales metabolitos por medio del estudio fitoquímico, estudio cromatográfico y métodos espectroscópicos.

2.- Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger (Calaguala) por el método del Edema Auricular.

3.- Evaluar el efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger (Calaguala) por el método de lesión inducida en Lomo de ratón.

1.5 Hipótesis

El extracto etanólico de los rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala" tiene efecto antiinflamatorio y cicatrizante.

1.6 Identificación de variables

a) **Variable Independiente**

Concentraciones del extracto etanólico de los rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala" con efecto antiinflamatorio y cicatrizante.

b) **Variable Dependiente**

Capacidad antiinflamatoria y cicatrizante del extracto.

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Marco Filosófico

El Perú siendo un país pluricultural y plurietnico presenta las tres regiones costa, sierra y selva donde los habitantes conviven con su flora y fauna característica de cada región es por ello su diversidad de conocimientos ancestrales en cuanto al uso de plantas medicinales para restablecer su salud. Siempre han existido enfermedades las cuales han sido paliadas con plantas medicinales propias de cada lugar, pero con el advenimiento de nuevas tecnologías han surgido infinidad de productos para mejorar la salud del hombre y dentro de ellos resurge la medicina alternativa llamada medicina natural, la cual es a base de plantas, como es el caso actual de una molécula hallada en la planta del cacao denominada epicatequina de un flavonoide presente en la planta, la cual genera autodestrucción especifica de células cancerosas.[11.]

Cuando observamos con espíritu científico, vemos que siempre a nuestro alrededor surgen problemas que afectan nuestro cuerpo como son injurias, quemaduras, laceraciones que muchas veces son difíciles de tratar, sin embargo, en la sabiduría popular tienen siempre al alcance métodos y productos para el alivio de sus males, los cuales no tienen una base científica, por ello esta investigación se basa en métodos epistemiológicos y es una investigación experimental, aplicativa y prospectiva.

En el transcurso de la evolución del ser humano, se puede observar que el hombre dejo de regenerar sus tejidos y hoy solamente tiene la capacidad de repararlos mediante un proceso complejo donde intervienen diversos factores, este tejido cicatricial una vez reparado ya no vuelve a ser el mismo tejido, seria antagónico a la vida tener el medio interno expuesto. [12]

Investigaciones científicas de plantas que poseen efecto cicatrizante y antiinflamatorio son atribuidos a la mezcla de metabolitos secundarios presentes en la planta, como en el *Croton lechleri* que presenta Taspina, proantocianidina y en el estudio doctoral del cacao y shikonina presentan Polifenoles y quinonas[13 y 14]. Estudios realizados en la resina del Copal se determinó metabolitos secundarios como alcaloides, triterpenos, resinas y un alto contenido de quinonas compuesto químico esencial para el proceso de cicatrización [15]

En la investigación realizada a la planta *Oenothera multicaulis* para determinar su efecto cicatrizante se determinó también en hojas y tallos los metabolitos secundarios como flavonoides, tipo Quercetina, Kanferol, Luteolina, Miricetina, Rutina y compuestos fenólicos. [16.]

Asimismo, en la investigación de formulaciones semisólidas de extractos de hojas y corteza de *Rhizophora mangle* L. para el efecto cicatrizante también se cuantificó taninos, con la única diferencia que en la corteza el porcentaje de taninos es mucho mayor. [17.]

Dentro de las investigaciones realizadas a las raíces de *Sechium edule* para evaluar el efecto cicatrizante y antiinflamatorio se determinó compuestos fenólicos tipo fenilpropanoides, ácido cinámico los cuales presentan efecto cicatrizante".[18.]

Trabajos científicos realizados a la especie de calaguala (*Campyloneurum amphostenon*), se nombran glucósidos de la saponina los cuales se basan en la polipodosagenina, la osaldina es el compuesto que le da a la planta ese sabor dulce característico, derivados de la floroglucina, como las ecdisteroides polipodinas A y B además de otras sustancias como los taninos y como el aceite esencial, aceite fijo", en el trabajo de investigación de la planta *Commiphora leptophloeos* los extractos obtenidos por maceración se obtuvo altas concentraciones de Polifenoles y flavonoides [19, 20]



Figura 1. ***Niphidium crassifolium*** **(L.) Lellinger "Calaguala"**

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Aspectos botánicos

2.2.1.1 Clasificación sistemática

De acuerdo al sistema de clasificación de pteridofitas de Christenhusz (2011), la especie vegetal *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala" ocupa las categorías sistemáticas siguientes:

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Monilophyta

CLASE: Filicopsida

SUBCLASE: Polipodiidae

ORDEN: Polypodiales

FAMILIA: Polypodiaceae

GENERO: Niphidium

ESPECIE: *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger

Nombre vulgar: "Calaguala"

2.2.1.2 Características de la familia Polypodiaceae

A esta familia en el Perú se le reconocen cerca de 7 géneros y más de 100 especies (Tryon & Stolze, 1993 Smith et al., 2005, Kessler & Smith 2005.), crecen en bosque húmedos montano y Premontano a una altitud entre los 700 a 2400 msnm, son cinco estas especies que presentan esta condición. [21.] En el tallo de tipo rizomatoso en la familia Polypodiaceae, se observan también muchas modificaciones xeromorfas. El rizoma que se encuentra colapsado, generalmente se re-hidrata siempre rápidamente con las primeras lluvias mediante la absorción de humedad ambiental por las escamas que presenta [22.]

2.2.1.3 Género Niphidium

En el Perú existen aproximadamente cerca de 50 especies de pteridofitas, de ellas más de la mitad tienen uso medicinal, luego existen el medio ambiental las cuales atrapan los metales contaminantes del suelo colaborando con el ecosistema y en tercer lugar existen las especies ceremoniales para rituales religiosos, varias de estas especies tienen dos funciones importantes como son la medicinal y la alimenticia, una de ellas es el género Niphidium.[23].

2.2.1.4 Descripción botánica de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala"

Es un helecho originario del Perú, cuyo "rizoma es delgado escamoso y rastrero y presenta un sabor agrio dulce, es inodoro y de este rizoma salen hojas verdes glabas, con tallos color café ligeramente azulados.

La planta mide aproximadamente de 10 a 50 cm de altura y las frondas son de color verde oscuro largas y triangulares y coriáceas. Poseén un largo peciolo que está dividido de 20 a 40 segmentos o pínulas que parten de la nervadura central [24, 25.]

2.2.1.5 Distribución geográfica

Planta ampliamente distribuida a lo largo de los valles interandinos, en Cajamarca, Ancash, Pasco, Amazonas, La Libertad ubicadas entre los 1900 a 2400 msnm. En el Perú existen diversas especies de calaguala las cuales crecen también en las cuencas de Crisnejas, Pachachaca y Palca [26]



Figura 2. Departamento de Ancash

2.2.1.6 Especies Químicas

De acuerdo al uso popular la parte activa de esta planta se encuentra en los rizomas y la investigación planteada va en ese camino, de identificar los principales metabolitos secundarios, responsables de la acción terapéutica de la planta. Dentro de los metabolitos secundarios tenemos a los flavonoides los cuales son responsables de proteger al organismo de los agentes oxidantes al ser pigmentos propios de la planta y se encuentran en hojas, tallos, raíz y rizomas.

(Fig. 3)

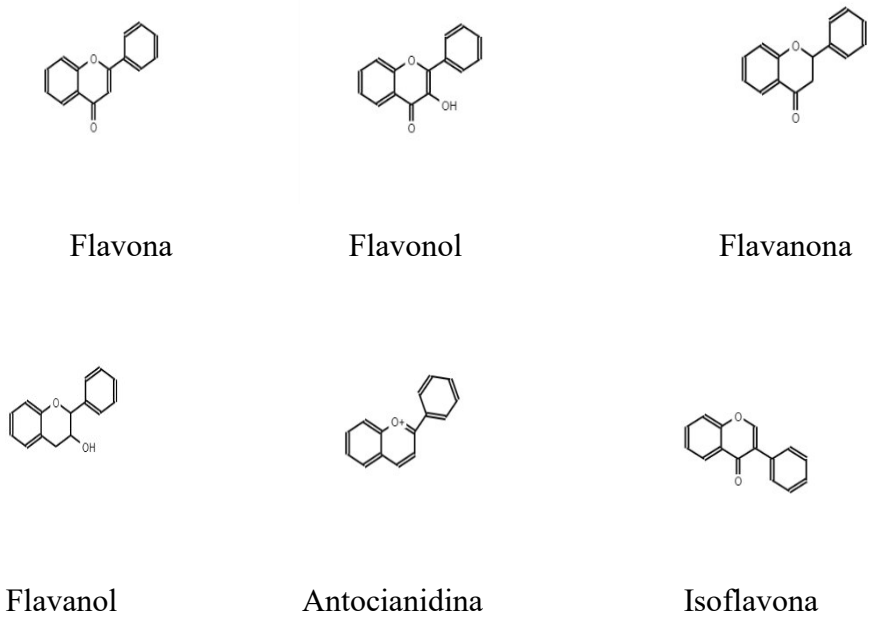

Figura 3. Clasificación de Flavonoides

Fuente: Elaboración propia

2.2.1.7 Usos en la medicina tradicional

El *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala", se usa terapéuticamente, el rizoma, hojas o frondas, según la creencia popular para tratar tumores, artritis, psoriasis, vitíligo, afecciones de la piel, como cicatrizante, inflamaciones, dermatosis en tumores cancerígenos, también se utiliza en atrasos o adelanto menstruales, vaginismo y vaginitis.

2.2.2 Proceso inflamatorio

En la inflamación se presentan varios fenómenos y el cuerpo humano reacciona a diversos estímulos, los cuales pueden ser agentes infecciosos, lesiones, isquemias, lo cual desencadena una respuesta, como son eritema, hiperalgesia y edema los cuales tienen lugar en el tejido conjuntivo que esta vascularizado, aumenta el flujo sanguíneo, se producen cambios celulares y la producción de mediadores químicos de la inflamación, como la histamina, PAF todos ellos estrechamente relacionados.

En la inflamación están presentes tres fases como son la aguda, subaguda y crónica. En la fase aguda el organismo ante una agresión, el primer paso es liberar mediadores como un mecanismo de defensa. [27]

Esta fase se caracteriza por su breve duración, la exudación de líquidos y proteínas plasmáticas, migración de leucocitos mayormente neutrófilos.

La fase subaguda tardía se presenta con infiltración de fagocitos y leucocitos.

En la fase crónica se puede observar un mayor tiempo, así como la aparición de macrófagos y linfocitos, aumentan los vasos sanguíneos, también la fibrosis con un exceso de tejido conectivo y la necrosis

El ácido araquidónico es un derivado del ácido graso esencial, ácido linóleo con muchos enlaces dobles que se encuentran normalmente esterificado en forma de fosfolípidos en las membranas celulares.

El ácido araquidónico es liberado al citoplasma en respuesta a un estímulo químico o mecánico a través de la acción de la fosfolipasa A. Cuando se libera el ácido araquidónico es oxidado por dos vías. La ciclooxigenasa (COX) o la 5-lipoxigenasa. La primera lleva a la producción de prostaglandinas y la segunda a la de los leucotrienos. [27]

En la inflamación actúan varios tipos de leucocitos y actualmente se sabe que intervienen células endoteliales y moléculas de adherencia celular, como las selectinas E, P y L, la molécula 1 de adherencia intracelular de células vasculares (ICAM-1), la molécula 1 de células vasculares de adherencia (VCAM-1) y en la adherencia de leucocitos intervienen las integrinas leucocitarias, células del endotelio en los sitios de inflamación y plaquetas [28]

La inflamación es muchas veces la expresión del intento del huésped por eliminar y localizar células metabólicamente alteradas, partículas extrañas, microorganismos o antígenos [29, 30.]

2.2.2.1 Método de Edema Auricular

Para medir la inflamación se usó el método del edema auricular en ratones De Young y Payá, CYTED [31.]

El método se basa en inflamar la oreja del ratón para lo cual usamos como inductor el xilol, este compuesto químico es el responsable de la inflamación, el método del edema auricular mide la inflamación producida, lo que se puede observar por el mayor peso en la zona lesionada. [31]

2.2.2.2 Cicatrización

La reparación de la piel causada por una injuria llamada cicatrización, consta de una variedad de secuencias muy complejas en la cual se regeneran los epitelios celulares, los cuales cambian la dermis original por un nuevo tejido, el cual es muy fibroso que consta de colágeno como la 4-hidroxiprolina la cual se considera una proteína exclusiva y única del organismo, por consiguiente posee formas distintas al tejido normal.

Estas fibras formadas son muy desorganizadas y a la vez menores en cuanto al tamaño, en consecuencia, esta nueva piel formada nunca presentará las características de una piel normal como son la fuerza tensora.

Las series del proceso de cicatrización son:

A. En la fase inflamatoria inicialmente se presenta la acumulación de todo el material y la sepsis de la parte traumatizada para su reparación.
    1. En la parte afectada se puede observar que los vasos sanguíneos se contraen por especio de 5 a 10 minutos y esto es debido a que se genera por las plaquetas una prostaglandina denominada tromboxano, y el fin es lograr la hemostasia y luego una vasodilatación activa.
    2. Las primeras células que aparecen en la lesión traumatizada, son los denominados granulocitos neutrófilos, existen en ese momento células en movimiento, vasodilatación, produciéndose fenómenos de diapédesis, marginación y adherencia, estos son los llamados mediadores enzimáticos. La quimiotaxis es la atracción química de los leucocitos, al inicio existe la lisis y el fenómeno fagocitario de los gérmenes que contaminan la lesión. Este traslado de células en la lesión traumatizada acaba cuando aparecen los denominados fibroblastos en las 24 horas de iniciado el proceso de reparación, alcanzando su máximo nivel a las 72 horas.[32]

B. La fase de reparación empieza con la formación del colágeno lo que se observa en los bordes de la herida las cuales han aumentado su resistencia a separarse. A las 72 horas se puede ver un descenso en la fase inflamatoria cuya fase se manifiesta en un 100% a las 120 horas de iniciado el proceso.
C. En la producción del colágeno es necesario contar con los aminoácidos, para que exista unión en estas fibras de colágeno, es lo que denominamos Epitelización del proceso traumático o herida, (la proteína fibrosa colágeno, el principal componente de la piel y de los huesos, procede del procolágeno, un precursor soluble) la sustancia fundamental [32] La proliferación de los queratinocitos del epitelio se inicia en las heridas cerradas rápidamente y transcurrido dos días se ha rellenado completamente la deficiencia existente en los dos bordes, en ese momento no existe colágeno formado en la herida

2.2.2.2. Método de Lesión inducida en lomo de ratón (Cicatrización)

Para el efecto cicatrizante de acuerdo con Vaisberg y Col.[33] se utilizó el método de lesión inducida en lomo de ratón, mediante administración tópica evaluando la fuerza de tensión dada en gramos, esta fuerza es la que medimos para poder abrir la herida cicatrizada.

Se optó por este método ya que está plenamente estandarizado. Se utilizó la crema Cicatrín como estándar la cual contiene Neomicina, Bacitracina, glicina, L-cisteina, DL-treonina, el antibiótico presente en la crema sirvió para evitar una posible infección y contaminación de fibroblastos y de condrocitos. [34.]

Es importante porque al haber una herida expuesta puede el organismo estar en contacto con la bacteria Enterobacter Gergoviae la cual ingresa a la sangre causa una septicemia y puede llevar hasta la muerte

Se consideró que al haber una herida expuesta el colágeno presente en la piel aumenta como un medio protector, también se produce la angiogénesis, se forma tejido granular epitelización y contracción de la herida. "La molécula del colágeno tiene en su composición aminoácidos característicos e inusuales, estos aminoácidos son residuos de glicina y son la tercera parte, la prolina es la cuarta parte de estos aminoácidos, además la mayor parte de residuos de lisina y prolina se modifican por covalencia.

El colágeno es rico en glicina en 33% y las fibras de colágeno pueden soportar 10,000 veces su propio peso. En la biosíntesis del colágeno la lisina se hidroxila y esta reacción es similar a la prolina cuando se hidroxila [35, 36.] Debido a sus características el Cicatrín es un excelente cicatrizante que actúa en la biosíntesis del colágeno mediante los aminoácidos que contiene.

2.3 Antecedentes de la investigación:

Herrera, S. Efecto protector del champú conteniendo extracto etanólico de corteza y brotes tiernos de *Colletia spinosissima* J. Gmelin (TACSANA) sobre la irritación inducida en piel de ratas. Si se comprobó efecto protector al contener el extracto, actividad antiinflamatoria y actividad cicatrizante, se encontró saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides y carbohidratos [37]

Vargas, C. Estudio de la actividad cicatrizante y antiinflamatoria del extracto alcohólico de las hojas de *Senna reticulata* (Will.) H. Irwin & Barneby (Retama). Si se determinó actividad cicatrizante del extracto a una concentración de 20% y se halló flavonas, 5,7 –Dihidroxiisoflavona, 6, 7 –Dihidroxiisoflavona, 3, 4, 7 –Trihidroxiisoflavona, alcaloides y taninos. Se administró como estándar la crema Cicatrín No se determinó actividad antiinflamatoria.[38]

Calero, L. Efecto cicatrizante del látex de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson en ratones (*Mus musculus*) cepa Balb/C. Se demostró efecto cicatrizante y antiinflamatorio presentando el látex flavonoides, fenilalanina, betaina, apigenina entre otros compuestos químicos [39]

Arroyo, J.; Pareja, B.; Raez, J. Efecto cicatrizante del *Piper angustifolium* R. &P. sobre lesiones de piel inducidas en animales de experimentación. 1999. Se determinó flavononas, flavonas e isoflavonas. Si se determinó efecto cicatrizante. Trabajo de investigación en el cual se utilizó como estándar la crema Cicatrín [40]

Mora, C. Efecto cicatrizante del ungüento de *Dodonaea viscosa* Jacq. "Chamisa" en ratones Balb/C53, se determinó en el extracto de hojas un mayor efecto cicatrizante al 10%, se determinó flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides y taninos [41]

Lozano, N.; Bonilla, P, Arroyo, J.; Arias, G.; Córdova, A.; Baldoceda, F. Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Desmodium molliculum* (H.B.K) D.C. (Manayupa). Se determinó efecto antiinflamatorio y cicatrizante por la gran cantidad de flavonoides encontrados similar al efecto de la dexametasona. En la actividad cicatrizante se utilizó como estándar la crema Cicatrín [42]

Pérez León, J. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ricinus communis* L. "higuerilla". El extracto si presenta efecto antiinflamatorio probablemente por la presencia de flavonoides, tipo F1:3metoxiflavona y F2:7 metoxiflavona, también compuestos fenólicos, alcaloides, taninos y saponinas [43]

Condori, L. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Ranunculus praemorsus* H.B.K. ex DC, en lesiones inducidas en ratas, se prepararon extractos al 1%, 5%, 10% y 20%, hallando flavonoides, alcaloides, triterpenos, esteroides. Si se determinó efecto cicatrizante y el mayor efecto cicatrizante fue a la mayor concentración 20%.[44]

CAPITULO III: METODOLOGÍA

3.1 Materiales, Reactivos y Equipos

3.1.1 Material biológico

- Rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger (Calaguala), fueron recolectados del Departamento de Ancash (Huaraz) a 3,052 msnm en el mes de Julio de 2013.

- Se utilizaron 50 ratones de raza Swiss de 3 meses de edad procedentes del Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú y con un peso promedio 27,5 + - 2,5 siendo adaptados 7 días antes a temperatura ambiente experimental de 21°C, humedad baja, con alimentación y agua ad libitum.

3.1.2 Materiales

- Sacabocados
- Bisturí N°15
  Vaso Beaker
- Pipetas 10 mL y 5 mL
- Probeta graduada
- Tubos de ensayo
- Jeringas estériles de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- Guantes quirúrgicos, gasas e hisopos. (Estériles)

3.1.3 Reactivos

Adquiridos en la casa Merck

- Acetato de etilo Q.P.
- Cloroformo Q.P.
- Metanol Q.P.
- Butanol Q.P.
- Etanol 96° Q.P.
- Pentobarbital 6,5%
- Silica gel 60
- Hidróxido de amonio Q.P.
- Tricloruro de hierro Q.P.
- Sodio metálico
- Acetato de sodio Q.P.
- Tricloruro de aluminio Q.P.
- Cera de abejas
- Alantoína

3.1.4 Equipos

Estufa Memmert
Balanza analítica digital marca Beinet
Molino de cuchillas
Espectrofotómetro: Espectro UV.VIS Doublé Beam PC
Dinamómetro

3.1.5 Instituciones donde se realizó la investigación

El análisis preliminar, ensayo de solubilidad, marcha fitoquímica y métodos cromatográficos se desarrollaron en el Laboratorio de Química Orgánica, del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. El efecto antiinflamatorio y cicatrizante se realizó en la Facultad de Medicina, en el laboratorio de Farmacología en la UNMSM. Se realizaron las lecturas de las muestras en el Laboratorio Farmacéutico ACFARMA y en el Laboratorio de Análisis de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la UNMSM.

3.1.6 Tipo y diseño de la investigación

El estudio es de tipo experimental-aplicativo y prospectivo

3.1.7 Diseño del trabajo experimental

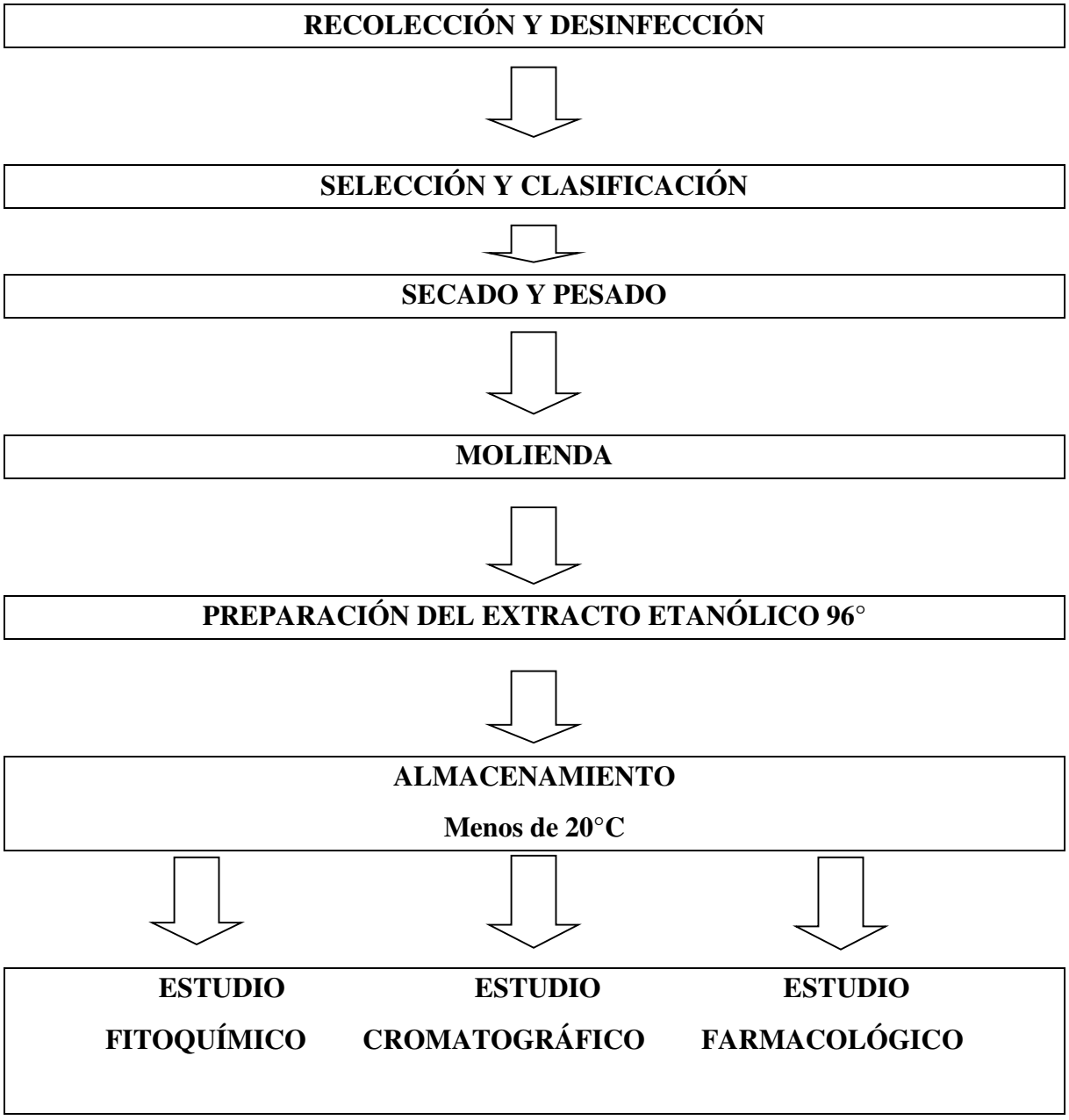

Figura 4. Flujograma del trabajo experimental

Fuente: Elaboración propia.

3.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones de raza Swiss de aproximadamente 3 meses de edad, de 27,5 +- 2,5 g, procedentes del Ministerio de Salud Lima, Perú; los cuales recibieron agua a libertad con una dieta de harina de trigo, soya y AA. Los animales se sometieron por espacio de una semana a una aclimatación de fotoperiodo y antes de realizar el experimento, fueron privados de alimento por espacio de 12 horas.

3.3 Recolección y clasificación taxonómica de la especie vegetal

Los rizomas recién obtenidos de la especie *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger "Calaguala" se recolectaron de la provincia de Huaraz, Departamento de Áncash a 3,052 m.s.n.m. en el mes de agosto del 2013. Taxonómicamente se clasificó, en el Sistema de clasificación de pteridofitas de Christenhusz 2011.

3.4 Tratamiento de la muestra

Los rizomas seleccionados fueron sometidos a una limpieza, previa desinfección y se deshidrataron al estado natural bajo sombra; a temperatura ambiente 20°C por 72 horas, protegidos de la humedad. Los rizomas se llevaron a una estufa a 40°C por espacio de 24 horas. Luego los rizomas fueron sometidos a molienda usando un molino de cuchillas y se almacenó en frascos ámbar de boca ancha a 20°C, para su posterior empleo.

3.5 Obtención del extracto etanólico

El extracto etanólico se obtuvo a partir del polvo de rizomas molidos, del cual se pesó 100 gramos y se agregó un litro de Alcohol Etílico de 96 ° y se maceró en frascos de boca ancha de color ámbar para protegerlo de la luz, agitándolo en forma uniforme e intermitente por espacio de 10 días libre del calor y luz, luego se realizó una segunda maceración durante 10 días utilizando el mismo solvente, posteriormente se reunieron los filtrados y se evaporaron a una temperatura de 40°C en una estufa de aire circulante.

3.6 Estudio fitoquímico y Análisis preliminar

Se realizó el ensayo de solubilidad utilizando diferentes solventes orgánicos y luego de obtener los mejores resultados se procedió a realizar el análisis fitoquímico y realizar los ensayos fracciones de identificación del estudio fitoquímico preliminar.

3.7 Estudio cromatográfico

El estudio cromatográfico se efectúo por cromatografía de capa fina para separar los componentes químicos responsables de la posible acción terapéutica. Para la cromatografía en capa fina se realizó el sembrado del extracto etanólico, el cual se disolvió en alcohol etílico, en primer lugar se utilizó placas de aluminio pequeñas de Silicagel G-60 de 10 x 4 cm para observar las separaciones de diversos solventes,(Ver Tabla N°6) posteriormente se utilizó placas de aluminio de Silicagel G-60 de 20 x 20 y como fase móvil se utilizó como sistema de solventes: $C_4H_8O_2$ y CH_3OH (1,5:0,5) v/v, presentándose 3 manchas a luz UV/V a 365nm, para luego realizar la cromatografía en escala preparativa y se revelaron con los reactivos $FeCl_3$ 1% para compuestos fenólicos y vapores NH_3 para flavonoides. En la cromatografía CEP se detectó 3 fracciones obteniéndose los mismos resultados con los reactivos de identificación, estas fracciones se eluyeron con etanol se filtró y se llevó a sequedad. Las 3 fracciones (F4 F5 F6) se analizaron por espectroscopia UV/V, pero solo la fracción F6 fue la más promisoria dando lectura de las 2 Bandas definidas característica de los flavonoides, recién por ello se realizó el efecto batocrómico con los reactivos de desplazamiento para determinar el tipo de flavonoide, hallando una posible estructura química 4,7-Dihidroxiflavona.[45] (Ver Fig. 11)

3.8 Estudio del efecto antiinflamatorio en ratones

3.8.1 Método edema auricular. De Young y Paya. CYTED. Se induce la inflamación aplicando xilol, el cual es el responsable de la acción irritante en el pabellón de la oreja del ratón, la técnica está dada por la respuesta inflamatoria la cual se comprueba porque aumenta el peso que se produce en el área tratada.

3.8.2 Distribución de la muestra

Se usaron 25 ratones (raza Swiss) de aproximadamente 27,5 + – 2,5 g de peso. Se distribuyeron en forma aleatoria en número de 5 animales por lote (5 lotes x 5 ratones c/u). Los lotes recibieron los extractos como se detalla, menos el grupo control.

3.8.3 Procedimiento

a) Para el ensayo se tuvo en cuenta la edad y peso de los animales de experimentación.

b) Así se pesaron los animales y se formaron 5 lotes de pesos muy semejantes
c) Se estableció que las orejas derechas recibirían el agente irritante en la cara interna y externa con un hisopo estéril con pequeña cantidad de xilol (10uL) frotando cinco veces cada lado de la oreja, menos el grupo control.

d) Las orejas izquierdas sin tratamiento recibirían solo el vehículo menos el grupo control.
e) Transcurridos 20 minutos solamente las orejas derechas recibirían tratamiento, el estándar, las cremas con los extractos al 5%, 10% y 20% de acuerdo al lote, menos el grupo control. De Young y Paya. CYTED

Se obtuvo el porcentaje de inhibición de inflamación a través de la formula siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Donde C es el valor medio del porcentaje de inflamación de los animales del grupo control

T es el valor medio de los animales del grupo problema o patrón

Tabla 1 Conformación de grupos por lote para el estudio del efecto antiinflamatorio.

LOTE A: Animales con inflamación y sin tratamiento.
LOTE B: Animales con inflamación y tratamiento con extracto 5%
LOTE C: Animales con inflamación y tratamiento con extracto 10%
LOTE D: Animales con inflamación y tratamiento con extracto 20%
LOTE E: Animales con inflamación y tratamiento con Diclofenaco en gel al 1%

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2 Preparación de crema base.

Compuestos	**Composición %**
Cera de abejas	16,7
Aceite mineral	50,0
Bórax	0,83
Perfume	0,50
Conservador	0,50
Agua	c.s.p. 100,0 g

Fuente: Elaboración propia

3.8.4 Técnica de medición

Transcurridas tres horas y media de la administración de la sustancia a ensayar se sacrificaron a los animales por dislocación cervical y posteriormente se cortó una porción de ambas orejas utilizando un sacabocados de 7 mm de diámetro, estas porciones fueron envueltas en papel aluminio y pesadas inmediatamente y por separado tanto de las orejas derechas inflamadas con tratamiento y de las orejas izquierdas inflamadas sin tratamiento, tomando nota de los respectivos pesos, cuya diferencia se procedió a calcular el porcentaje de inflamación de inhibición para cada grupo.

3.8.5 Tratamiento estadístico de los datos:

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico descriptivo e inferencial, utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA) y por el test de comparaciones múltiples HSD de Tukey de la diferencia mínima significativa, para evidenciar el grado de dispersión de los datos se tuvo en cuenta una significación estadística de $p > 0,05$

3.9 Estudio del efecto cicatrizante en ratones

3.9.1 Método: Lesión inducida en Lomo de ratón

Administración vía tópica.

3.9.2 Distribución de la muestra:

Se usaron 25 ratones blancos (raza Swiss), de 2 meses de edad y 27,5 + - 2,5 g de Peso, distribuidos en forma aleatoria en lotes de 5 ratones cada uno.

Tabla 3 Conformación de grupos por lote para el estudio del efecto cicatrizante.

LOTE A: Animales con herida y sin tratamiento.
LOTE B: Animales con herida y tratamiento con extracto al 5%
LOTE C: Animales con herida y tratamiento con extracto al 10%
LOTE D: Animales con herida y tratamiento con extracto al 20%
LOTE E: Animales con herida y tratamiento con Estándar: Fármaco Cicatrín (Neomicina 0,350 U + Bacitracina 50,000 U, glicina, L-cisteína, DL-treonina)

Fuente: Elaboración propia

3.9.3 Descripción del experimento

1.- Los animales fueron agrupados en 5 lotes comprendidos por 5 unidades cada lote, fueron depilados en la cintura escapular del ratón 24 horas antes.

2.- Luego se aplicó anestesia Pentobarbital sódico 30 mg/Kg de peso corporal del ratón.

3.- Posteriormente se realizó la incisión y corte con extremo cuidado, con bisturí de 1 cm de longitud hasta la dermis del animal, los bordes de la herida fueron limpiados con gasa estéril Alfymedic tipo esponja de 7,5cm x 7,5 cm.

4.- Al grupo de ratones Control se dejó que la herida cicatrice sola, a los demás grupos de ratones con herida tuvieron tratamiento con los respectivos extractos y el grupo estándar tuvo tratamiento con Cicatrín. El tratamiento se inició en seguida y cada 12 horas por tres días excepto el grupo control.

5.- La administración fue vía tópica con cobertura total solo de la herida.

6.- La eliminación de los ratones fue a las 72 horas por dislocación cervical.

7.- En seguida se midió el grado de fuerza de tensión con un dinamómetro, para determinar la fuerza de tensión que permitió abrir la herida. El parámetro físico de cicatrización, resistencia a la tensión medida por la carga necesaria (por área de sección transversal) que provocó la rotura de la herida (g de peso en el dinamómetro).

8.- Se obtuvo la eficacia de cicatrización a través de la fórmula:

$$\text{Eficacia de cicatrización (\%)} = \frac{\text{(Gramos que abren la piel cicatrizada)}}{\text{(Gramos para abrir piel sana)}} \times 100$$

3.10 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis estadístico descriptivo e inferencial, utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA) y por el test de comparaciones múltiples HSD de Tukey de la diferencia mínima significativa, para evidenciar el grado de dispersión de los datos, así como se tuvo en cuenta una significancia estadística a una $p < 0,05$

3.11 Consideraciones éticas

El tratamiento de los animales utilizados fue de acuerdo con regulaciones éticas y relacionados con la Guía en el uso y cuidados de animales para experimentación como requisito de bienestar y salud tal como lo determina la National Advisory Commite for Laboratory Animal Reserch (National Advisory Commite, 2004). Asimismo, se consideraron las normas Vancouver a fin de respetar los derechos de autor de las referencias utilizadas en la presente investigación.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1 Estudio taxonómico, prueba de solubilidad, análisis fitoquímico

El estudio taxonómico determinó que la planta evaluada corresponde a la especie *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger, según certificación botánica emitida en el Sistema de clasificación de pteridofitas de Christenhusz 2011 (Anexo p 63).

En la prueba de solubilidad (Tabla N°4) se utilizaron solventes de diferentes polaridades, siendo soluble el extracto en metanol, etanol y acetato de etilo.

Tabla 4 Prueba de solubilidad en el extracto etanólico.

SOLVENTE	EXTRACTO ETANÓLICO DE RIZOMA DE *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger
CLOROFORMO	+
n-HEXANO	-
BUTANOL	+
ACETATO DE ETILO	+++
METANOL	+++
ETANOL	++
AGUA	+

Se determinó como mejores solventes el metanol, etanol y acetato de etilo.

Insoluble (-) Poco soluble (+) Soluble (++) Muy soluble (+++)

Fuente: Elaboración propia.

En el análisis fitoquímico (Tabla N°5) el extracto etanólico de la especie *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger presenta presencia de flavonoides según la reacción de Shinoda, también contiene taninos según la reacción con el $FeCl_3$ y presenta quinonas con el reactivo de Borntrager. (Tabla N°5)

Tabla 5 Estudio fitoquímico del extracto etanólico.

ESTUDIO FITOQUIMICO	REACTIVO	METABOLITOS SECUNDARIOS	EXTRACTO ETANÓLICO
	Fe3Cl	Taninos	+++
	Shinoda	Flavonoides	++
	Ninhidrina	Aminoácidos libres	-
	Borntrager	Quinonas	+
	Reactivo Molish	Glicosidos	-
	2,4Dinitrofenilhidracin	Carbonilos	-
	Indice de Espuma	Saponinas	-
	Dragendorff	Alcaloides	-
	Mayer	Alcaloides	-

Se determinó la presencia significativa de taninos, flavonoides y quinonas.
Negativo (-) Reacción positiva moderada (+) Reacción positiva intensa (++)
Reacción positiva muy intensa (+++) **Fuente: Elaboración propia**.

4.2 Estudio cromatográfico

Realizando el cromatograma en capa fina con silica gel G-60 (Tabla N°6), utilizando como fase móvil la mezcla de acetato de etilo y metanol (1,5:0,5), observándose 3 manchas a la luz UV/V a 365 nm, para luego realizar la cromatografía en escala preparativa, se revelaron con los reactivos $FeCl_3$ 1% para compuestos fenólicos y vapores NH_3 para flavonoides. En la cromatografía CEP se detectó 3 fracciones obteniéndose los mismos resultados con los reactivos de identificación, estas fracciones se eluyeron con etanol, se filtró y se llevó a sequedad. Las fracciones (F4 F5 F6) se analizaron por espectrofotometría UV/V, pero solo la fracción F6 fue promisoria formándose las dos bandas características para los flavonoides (Fig. N°11) por ello se procedió a realizar el efecto batocrómico con reactivos de desplazamiento para obtener el tipo de flavonoide obteniéndose una posible estructura química 4, 7-Dihidroxiflavona (Tabla N°24). Según Mabry[45] y como los encontrados según Mayhuasca[46] y Félix[47].

Tabla 6 Estudio cromatográfico del extracto etanólico

Rf	UV 366nm	Vapores NH3	FeCl3	Reactivo de Dragendorff
F 4	**Rf 0,59**	**Amarillo**		**-**
F 5	**Rf 0,71**	**Amarillo**	**tenue** **Amarillo** **bajo**	**-**
F 6	**Rf 0,81**	**Amarillo**	**Amarillo** **rosado**	**-**
Presencia Flavonoides				Ausencia Alcaloides

Fuente: Elaboración propia

4.3 **Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger**

En oreja de ratón.

En la Tabla 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y Figura 5, 6, 7 y 12 se muestra el efecto antiinflamatorio después de administrar el extracto etanólico de los rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger a dosis de 5%, 10% y 20% de acuerdo al lote, menos el grupo control obteniéndose resultados no significativos en las tres concentraciones, se observa una D.S. 1,44. (Ver Tabla N°8 y Figura N° 5, 6 y 7) también se comparan los extractos a diferentes concentraciones con el estándar, observándose también resultados no significativos.

4.4 Efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger en lesión inducida en lomo de ratón.

En la tabla N° 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y Figura N° 8, 9, 10 y 13, se muestra el efecto cicatrizante, en dosis al 5%, 10% y 20% obteniéndose buenos resultados a mayores concentraciones.

Tabla 7 Procedimiento de inflamación en oreja de ratón.

Grupos	Inicio oreja derecha	Después de 20minutos Oreja derecha con tratamiento	oreja Izquierda
Crema base CONTROL	-	-	-
Crema base + EXTRACTO 5%	**xilol**	**Crema 5%**	**solo vehículo**
Crema base + EXTRACTO 10%	**xilol**	**Crema 10%**	**solo vehículo**
Crema base + EXTRACTO 20%	**xilol**	**Crema 20%**	**solo vehículo**
DICLOFENACO 1% (Estándar)	**xilol**	**Gel al 1%**	**solo vehículo**

Se inicia el tratamiento inflamando la oreja derecha del ratón con xilol, usando un hisopo estéril y frotando por 5 veces cada cara, después de 20 minutos se agrega la crema base con los extractos y el estándar de acuerdo al lote menos el grupo control. Las orejas izquierdas solo reciben el vehículo, menos el grupo control.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8 Valoración del efecto antiinflamatorio en ratón.

Tratamiento	Individuo	Peso mg	Diferencia x	Diferencia x2
Extracto 5%	1	5	1,6	2,56
Extracto 5%	2	3	-0,4	0,16
Extracto 5%	3	1	-2,4	5,76
Extracto 5%	4	6	2,6	6,76
Extracto 5%	5	5	1,6	2,56
Extracto 10%	1	4	0,6	0,36
Extracto 10%	2	1	-2,4	5,76
Extracto 10%	3	4	0,6	0,36
Extracto 10%	4	5	1,6	2,56
Extracto 10%	5	3	-0,4	0,16
Extracto 20%	1	1	-2,4	5,76
Extracto 20%	2	2	-1,4	1,96
Extracto 20%	3	4	0,6	0,36
Extracto 20%	4	4	0,6	0,36
Extracto 20%	5	1	-2,4	5,76
Diclofenaco	1	4	0,6	0,36
Diclofenaco	2	4	0,6	0,36
Diclofenaco	3	1	-2,4	5,76
Diclofenaco	4	5	1,6	2,56
Diclofenaco	5	5	1,6	2,56
Control	1	3	-0,4	0,16
Control	2	4	0,6	0,36
Control	3	4	0,6	0,36
Control	4	2	-1,4	1,96
Control	5	4	0,6	0,36
		Promedio 3,4	**50**	**D.S. 1,44**

Se muestra relativa actividad para el extracto etanólico frente al grupo control pero ninguno significativo. Los extractos en crema base a diferentes concentraciones y el grupo control crema base.

Fuente: Elaboración propia

Tabla 9 Pesos obtenidos de las secciones circulares extraídas de las orejas sin tratar (mg) y de las orejas tratadas (mg).

Tratamiento	Individuo	Oreja derecha tratada (mg)	Oreja izquierda sin tratar (mg)
CB + Extracto etanólico al 5%	1	1	6
	2	2	5
	3	4	5
	4	1	7
	5	1	6
CB + Extracto etanólico al 10%	1	1	5
	2	3	4
	3	1	5
	4	1	6
	5	2	5
CB + Extracto etanólico al 20%	1	4	5
	2	5	7
	3	1	5
	4	2	6
	5	3	4
Diclofenaco gel al 1%	1	2	6
	2	2	6
	3	4	5
	4	1	6
	5	1	6
CB Control	1	4	7
	2	2	6
	3	2	6
	4	5	7
	5	1	5

CB= Crema base.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10 Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el extracto al 5% con el estándar.

Tratamiento	Individuo	Delta Peso mg	Inh. Inflamación
CB + E.E. 5%	1	5	-47,05
CB + E.E. 5%	2	3	11,76
CB + E.E. 5%	3	1	70,58
CB + E.E. 5%	4	6	-76,47
CB + E.E. 5%	5	5	-47,05
Diclofenaco 1 %	1	4	-17,64
Diclofenaco 1%	2	4	-17,64
Diclofenaco 1%	3	1	70,58
Diclofenaco 1%	4	5	-47,05
Diclofenaco 1%	5	5	-47,05

Fuente: Elaboración propia

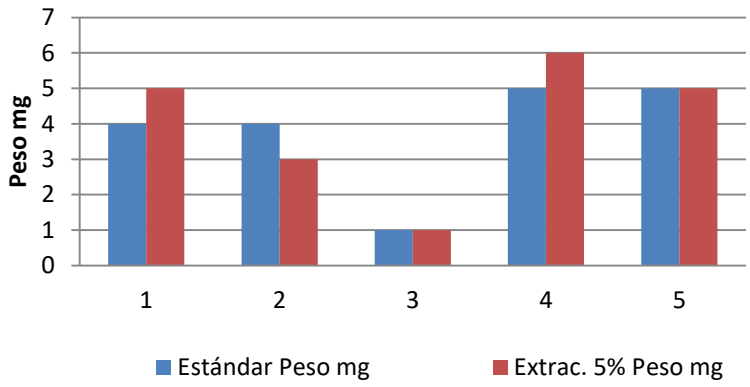

Figura 5. Comparación después del Tto estándar vs Extracto 5%

Diferencia no significativa.

Fuente: Elaboración propia

No presenta efecto antiinflamatorio significativo

Dado 1Control vs Ex 5%, 2 Control vs Ex 5%; 3Control vs Ex 5%; 4 Control vs Ex 5%; 5 Control vs Ex 5%.

Tabla 11 Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el extracto al 10% con el estándar.

Tratamiento	Individuo	Delta del Peso mg	Inh. Inflamación
CB + E.E. 10%	1	4	-17,64
CB + E.E. 10%	2	1	70,58
CB + E.E. 10%	3	4	-17,64
CB + E.E. 10%	4	5	-47,05
CB + E.E. 10%	5	3	11,76
Diclofenaco 1%	1	4	-17,64
Diclofenaco 1 %	2	4	-17,64
Diclofenaco 1%	3	1	70,58
Diclofenaco 1%	4	5	-47,05
Diclofenaco 1%	5	5	-47,05

Fuente: Elaboración propia

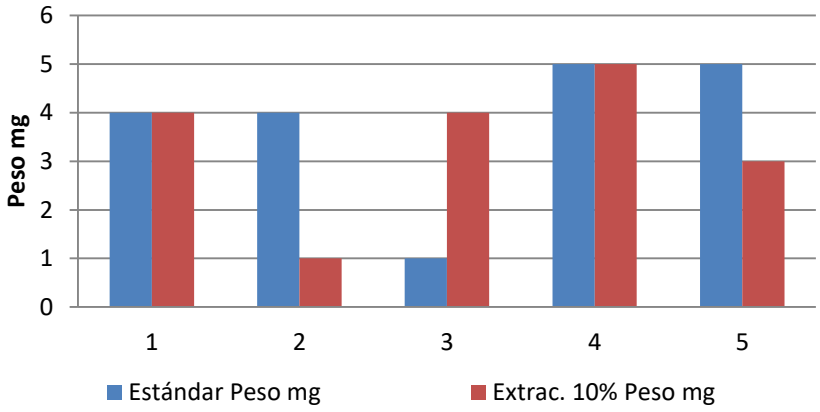

Figura 6. Comparación después del Tto. Estándar vs Extracto 10%

.

Diferencia no significativa.

Fuente: Elaboración propia.

No presenta efecto antiinflamatorio significativo

Dado 1Control vs Ex 10%; 2 Control vs Ex 10%; 3 Control vs Ex 10% 4 Control vs Ex 10%; 5 Control vs Ex 10%.

Tabla 12 Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el extracto al 20% con el estándar.

Tratamiento	Individuo	Delta del Peso mg	Inh. Inflamación
CB + E.E. 20%	1	1	70,85
CB + E.E. 20%	2	2	41,17
CB + E.E. 20%	3	4	-17,64
CB + E.E. 20%	4	4	-17,64
CB + E.E. 20%	5	4	70,85
Diclofenaco 1%	1	4	-17,64
Diclofenaco 1%	2	4	-17,64
Diclofenaco 1%	3	1	70,58
Diclofenaco 1%	4	5	-47,05
Diclofenaco 1 %	5	5	-47,05

Fuente: Elaboración propia

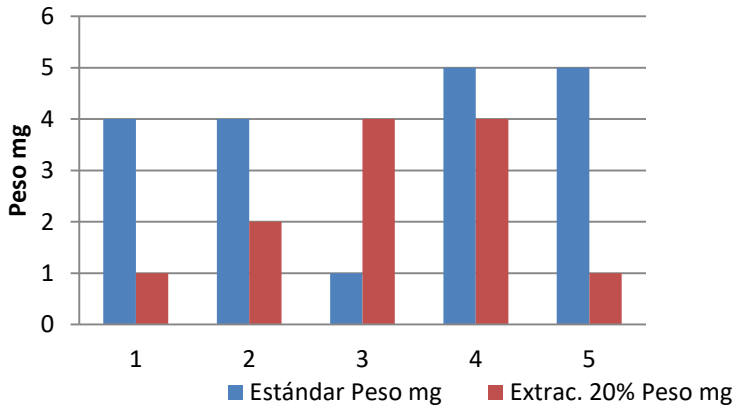

Figura 7. Comparación después del Tto estándar vs Extracto 20%

Diferencia no significativa**.**

Fuente: Elaboración propia

No presenta efecto antiinflamatorio significativo

Dado 1 Control vs Ex 20%; 2Control vs Ex 20%; 3 Control vs Ex 20%; 4 Control vs Ex 20%; 5Control vs Ex 20%.

Tabla 13 Análisis de múltiples comparaciones para el efecto antiinflamatorio.

	(I)cod	(J)cod	Diferencias De Medias	Error Estándar	Signif	Intervalo de Confianza al 95%	Intervalo de Confianza al 95%
						Limite Superior	Limite Inferior
HSD de Tukey	Control	Diclofenac al 1%	-,400	,984	,994	-3,34	2,54
		Extracto al 5%	-,600	,984	,972	-3,54	2,34
		Extracto al 10%	,000	,984	1,000	-2,94	2,94
		Extracto al 20%	1,000	,984	,845	-1,94	3,94
	Diclofenaco al 1%	Extracto al 5%	-,200	,984	1,000	-3,14	2,74
		Extracto al 10%	,400	,984	,994	-2,54	3,34
		Extracto al 20%	1,400	,984	,621	-1,54	4,34
	Extracto al 5%	Extracto al 10%	,600	,984	,972	-2,34	3,54
		Extracto al 20%	1,600	,984	,499	-1,34	4,54
	Extracto al 10%	Extracto al 20%	1,000	,984	,845	-1,94	3,94
T de Dunnett (bilateral)a	Diclofenaco al 1%	Control	,400	,984	,982	-2,21	3,01
	Extracto al 5%	Control	,600	,984	,929	-2,01	3,21
	Extracto al 10%	Control	,000	,984	1,000	-2,61	2,61
	Extracto al 20%	Control	-1,000	,984	,704	-3,61	1,61

Fuente: Elaboración propia

A.-Las pruebas de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos. En efecto en las comparaciones múltiples no existe ninguna diferencia significativa, tal cual resultó en el análisis de varianza

Tabla 14 Análisis de varianza para el efecto antiinflamatorio.

Antiinflamatorio ANOVA de un factor					
Peso	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	
Inter-grupos	7,600	4	1,900	,785	,548
Intra-grupos	48,400	20	2,420		
Total	56,000	24			

Fuente: Elaboración propia

Análisis de Varianza de la actividad antiinflamatoria en ratones al aplicar la crema a base del extracto etanólico de raíz de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger, vía tópica.

El análisis demuestra que no hay diferencias significativas entre las medias ($p > 0.05$)

Tabla 15 Análisis descriptivo del efecto antiinflamatorio en ratones.

Peso	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%		Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	
					Límite Inferior		Límite Superior			
Control	5	3,40	0,89	,700	2,29		4,51		2	4
Diclofenaco1%	5	3,80	1,64	,735	1,76		5,84		1	5
Extracto 5%	5	4,00	2,00	,894	1,52		6,48		1	6
Extracto 10%	5	3,40	1,52	,678	1,52		5,28		1	5
Extracto 20%	5	2,40	1,52	,678	,52		4,28		1	4

Fuente: Elaboración propia

Análisis descriptivo de datos obtenidos en el ensayo de la actividad antiinflamatoria en ratones, de la crema a base del extracto etanólico de raíz de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger vía tópica.

Tabla 16 Prueba de homogeneidad de varianzas para el efecto antiinflamatorio.

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Peso			
Estadístico de levene	gl1	gl2	Sig.
,824	4	20	,525

Fuente: Elaboración propia

Tabla 17 Análisis de múltiples comparaciones para el ensayo del efecto cicatrizante.

Cicatrizante. Comparaciones múltiples							
Variable dependiente : Peso (g)							
	(I)grupo	**(J)grupo**	**Diferencia de medias (I-J)**	**Error típico**	**Sig.**	**Intervalo confianza de al 95%**	
						Límite inferior	**Límite superior**
HSD de Tukey	**Control**	**Neomicina-Bacitracina 0.35%**	-13,80	3,74	,011	-24,98	-2,62
		Extracto 5%	-24,60	3,74	,0001	-35,78	-13,42
		Extracto 10%	-40,40	3,74	,0001	-51,78	-29,22
		Extracto 20%	-41,60	3,74	,0001	-52,78	-30,42
	Estándar Cicatrín 0.35%	**Extracto 5%**	-10,80	3,74	,061	-21,98	,38
		Extracto 10%	-26,60	3,74	,0001	-37,78	-15,42
		Extracto 20%	-27,80	3,74	,0001	-38,98	-16,62
	Extracto 5%	**Extracto 10%**	-15,80	3,74	,003	-26,98	-4,62
		Extracto 20%	-17	3,74	,002	-28,18	-5,82
	Extracto 10%	**Extracto 20%**	-1,20	3,74	,997	-12,38	9,98
T de Dunnett (bilateral)b	**Estándar Cicatrín 0.35%**	**Control**	13,80	3,74	,005	3,90	23,70
	Extracto 5%	**Control**	24,60	3,74	,0001	14,70	34,50
	Extracto 10%	**Control**	40,40	3,74	,0001	30,50	50,30
	Extracto 20%	**Control**	41,60	3,74	,0001	31,70	51,50

b. Las pruebas T de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás Grupos.

Las únicas diferencias no significativas: Estándar Cicatrín vs Extracto 5% y Extracto 10% vs Extracto 20%.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 18 Efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el estándar con el extracto al 5%.

Tratamiento	Código	Peso g	VM	DE	Eficacia cicatrización %
Cicatrín St.	1	43	-13,3	178	18,29
Cicatrín St.	1	46	-10,3	107	19,57
Cicatrín St.	1	49	-7,34	53,9	20,85
Cicatrín St.	1	42	-14,3	205	17,87
Cicatrín St.	1	45	-11,3	128	19,14
Extracto5%	2	51	-5,34	28,5	21,70
Extracto5%	2	54	-2,34	5,50	22,97
Extracto5%	2	57	0,65	0,42	24,25
Extracto5%	2	61	4,65	21,6	25,95
Extracto5%	2	56	-0,34	0,11	23,82

Fuente: Elaboración propia.

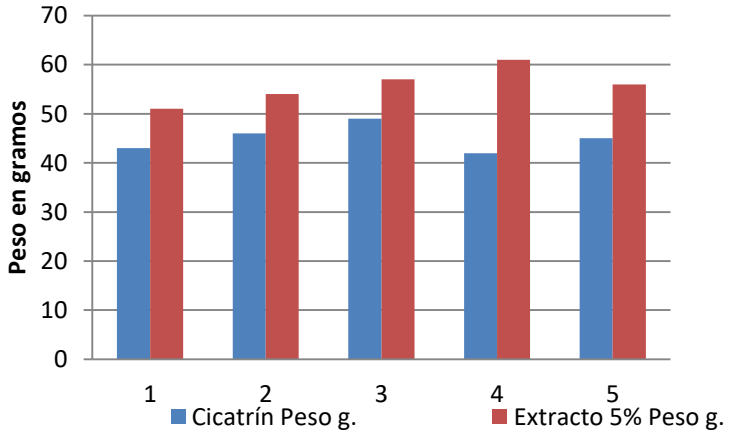

Figura 8. Comparación después del Tto. Estándar vs Extracto 5%

Donde p< 0,0001 (Ver Tabla N° 17, 21)

Fuente: Elaboración propia

Presenta efecto cicatrizante

Dado 1 Control vs Ex 5%; 2 Control vs Ex 5%; 3 Control vs Ex 5%, 4 Control vs Ex 5%, 5 Control vs Ex 5%

Tabla 19 Efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el estándar con el extracto al 10%.

Tratamiento	Código	Peso g	VM	DE	Eficacia Cicatrización %
Cicatrín St.	1	43	-13,3	178,11	18,79
Cicatrín St.	1	46	-10,34	107,04	19,57
Cicatrín St.	1	49	-7,34	53,96	20,85
Cicatrín St.	1	42	-14,34	205,81	17,87
Cicatrín St.	1	45	-11,34	128,73	19,14
Extracto 10%	3	69	12,65	160,11	29,36
Extracto 10%	3	71	14,65	214,73	30,21
Extracto 10%	3	70	13,65	186,42	29,78
Extracto 10%	3	79	22,65	513,19	33,61
Extracto 10%	3	69	12,65	160,11	29,36

Fuente: Elaboración propia

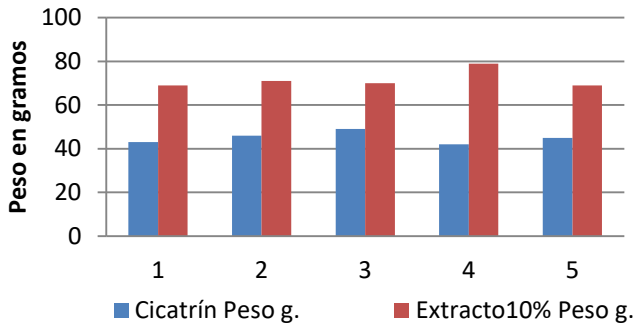

Figura 9. Comparación después del Tto. Estándar vs Extracto 10%

Donde p< 0,0001 (Ver tabla N° 17, 21)

Fuente: Elaboración propia

Presenta efecto cicatrizante

Dado 1 Control vs Ex 10%; 2 Control vs Ex 10%; 3 Control vs Ex 10%; 4 Control vs Ex 10%; 5 Control vs Ex 10%

Tabla 20 Efecto cicatrizante del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger comparando el estándar con el extracto al 20%.

Tratamiento	Código	Peso g	VM	DE	Eficacia Cicatrización %
Cicatrín St.	1	43	-13,34	178,11	18,29
Cicatrín St.	1	46	-10,34	107,04	19,57
Cicatrín St.	1	49	-7,346	53,96	20,85
Cicatrín St.	1	42	-14,34	205,81	17,87
Cicatrín St.	1	45	-11,34	128,73	19,14
Extracto 20%	4	57	0,653	0,4275	24,25
Extracto 20%	4	75	18,65	347,96	31,91
Extracto 20%	4	77	20,65	426,58	32,76
Extracto 20%	4	72	15,65	245,04	30,63
Extracto 20%	4	83	26,65	710,42	35,31

Fuente: Elaboración propia

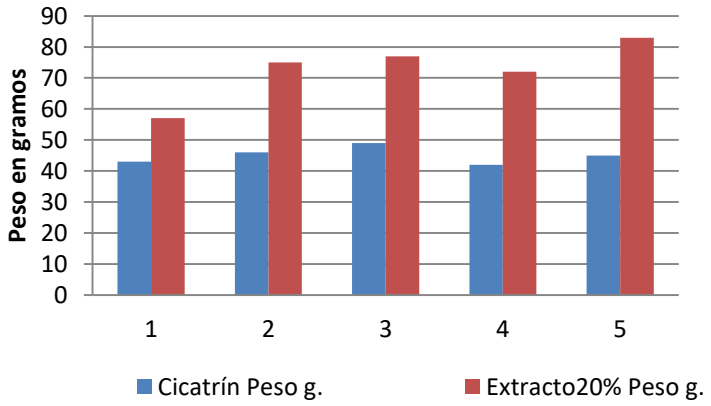

Figura 10. Comparación después del Tto. Estándar vs Extracto 20%

Donde p<0,0001 (Ver tabla N° 17, 21)

Fuente: Elaboración propia

Presenta mayor efecto cicatrizante

Dado 1 Control vs Ex 20%; 2 Control vs Ex 20%; 3 Control vs Ex 20%; 4 Control vs Ex 20%; 5 Control vs Ex 20%

Tabla 21 Anova. Análisis de varianza de la fuerza necesaria para abrir las lesiones en el efecto cicatrizante en ratones.

ANOVA de un factor

Peso					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	6295,440	4	1573,860	45,122	,000
Intra-grupos	697,600	20	34,880		
Total	6993,040	24			

Fuente: Elaboración propia

El análisis de varianza muestra que existe por lo menos una diferencia significativa entre las medias de la actividad cicatrizante.

Tabla 22 Análisis descriptivo del ensayo del efecto cicatrizante.

Cicatrizante. Descriptivos Peso (g.)								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control	5	31,20	6,42	2,87	23,23	39,17	22	38
Neomicina –Bacitracina 0.35%	5	45,00	2,74	1,22	41,60	48,40	42	49
Extracto 5%	5	55,80	3,70	1,66	51,20	60,40	51	61
Extracto 10%	5	71,60	4,22	1,89	66,36	76,84	69	79
Extracto 20%	5	72,80	9,71	4,34	60,75	84,85	57	83

Fuente: Elaboración propia

Análisis descriptivo de datos obtenidos en el ensayo de la actividad cicatrizante en ratones de la crema a base del extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L). Lellinger vía tópica.

Tabla 23 Prueba de homogeneidad de varianzas para el efecto cicatrizante

Prueba de homogeneidad de varianzas			
Peso			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,438	4	20	,258

Fuente: Elaboración propia

Las varianzas son homogéneas.

Tabla 24 Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6 y desplazamiento batocrómico.

FRACCIÓN N° 6	ABSORVANCIA	DESPLAZAMIENTO
MeOH	230 - 289	
MeONa	- 289	
MeONa- 5 minutos	- 289	
$AlCl_3$	230 - 285	**59**
$AlCl_3$/HCl	231 - 289	
AcONa – 2 minutos	285 - 370	
AcONa – 5 minutos	285 - 370	**65**
AcONa/H_3BO_3	285 - 350	

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a Mabry [45] y a la cromatografía realizada de la porción (mancha) N° F6 en la que al revelarse con luz UV y luego con NH_3 nos da una fluorescencia amarilla, lo que posiblemente tenga una estructura de Dihidroxiflavona que pueda tener un grupo OH- en posición 4 y 7 por lo que se propone esta estructura química.

MeOH= Alcohol metílico
MeONa= Metóxido de sodio.
AcONa= Acetato de sodio

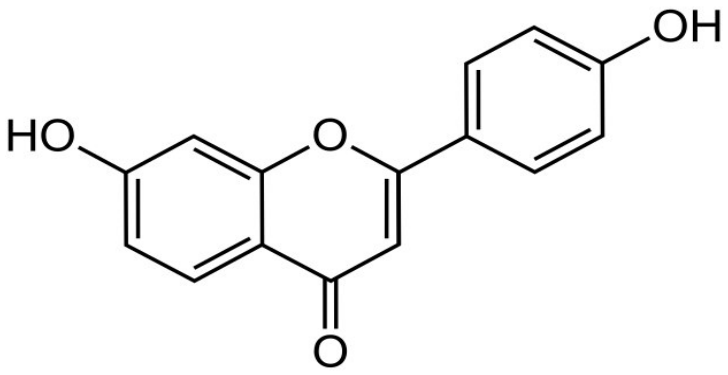

Figura 11. 4,7- Dihidroxiflavona.

CAPITULO V: DISCUSIÓN

El extracto etanólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger ("Calaguala"), en concordancia a los ensayos efectuados y conforme a la hipótesis propuesta, se ha demostrado que para el efecto antiinflamatorio, el cual se efectúo por el Método del Edema Auricular vía tópica en ratones CYTED[31] y (Ver Tabla N° 7) presenta actividad antiinflamatoria no significativa como lo comprueban los datos obtenidos (Ver Tablas N° 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16) y (Ver Figuras N° 5, 6, 7 y 12), donde ($p>0,05$) Estos resultados como se han descrito guardan relación con lo que sostiene Vargas[38], investigación del año 2007, que el extracto etanólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby, también presenta actividad antiinflamatoria no significativa, es importante señalar que la Calaguala es una planta muy conocida en el Perú y de gran uso popular en forma de infusiones o cocimientos, en los dos ensayos se utilizó el xilol como medio irritante porque el edema que se produce esta menos modificado por factores ajenos a los propios característicos de la inflamación y porque el efecto antiinflamatorio de este ensayo guarda buena correlación con el efecto antiinflamatorio en clínica. CYTED[31].

Estudios realizados con extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* al 1%, 2% y 4% presentan actividad antiinflamatoria significativa posiblemente por inhibir al ácido araquidónico el cual se metaboliza por los flavonoides presentes en la planta, investigación realizada por Avalos[48] en el año 2018, lo que no concuerda con el presente trabajo que las concentraciones del extracto fueron de 5%, 10% y 20%, lo que podría suponer que uno de los factores y variables podría ser la concentración de los extractos y los metabolitos hallados, también como en el estudio realizado por Pérez León[43] en el año 2012, con el extracto hidroalcohólico de hojas de *Ricinus communis* "Higuerilla" que presenta efecto antiinflamatorio posiblemente por contener flavonoides los cuales presentan acción antioxidante, cuyo extracto hidroalcohólico fue comparado con el estándar dexametasona e ibuprofeno medicamentos antiinflamatorios no esteroideos relacionados con la inhibición plaquetaria comparando el presente estudio también presenta flavonoides y se utilizó como estándar Diclofenaco al 1%, el cual es un inhibidor relativamente no selectivo de la ciclooxigenasa. Torres[49] en el año 2014 y Alvarez[50] en el año 2010.

Otros resultados guardan relación, con los datos obtenidos en la presente investigación en el cual se ha hallado flavonoides y no está demostrado que los compuestos fenólicos y terpenos tengan gran actividad antiinflamatoria. En la investigación realizada por

Arauco[51] en el año 2016, el extracto etanólico de las hojas de *Muehlbeckia volcánica* (Mullaca), la cual tuvo efecto analgésico y también efecto antiinflamatorio en ratas, esto se debe posiblemente a la presencia de mayor cantidad de fenoles seguido por flavonoides, taninos y terpenos en menor proporción, lo cual no concuerda con el presente trabajo. Presenta actividad antiinflamatoria a dosis 50mg/Kg y eficiencia analgésica a las 8 horas a dosis de 250 mg/ Kg. Siendo la inflamación un proceso fisiológico y defensivo del organismo

ante agresiones del medio, que causan edema y dolor, así como perdida de funcionabilidad, de igual forma la inflamación cursa con una evolución resultado de infecciones persistentes, el objetivo de la inflamación es proteger al organismo de la causa de la agresión celular. Villalba[52] año 2014.

Suarez[53] en el año 2018, en un ensayo verificó la respuesta antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *Pelargonium hortorum* L.H.Bailey (Geranio), encontrando quercitina y rutina con efecto antiinflamatorio, el extracto fue diseñado con 50mg/Kg, 250mg/Kg y 500mg /Kg y en el presente trabajo de investigación se usó también el método del edema auricular y concentraciones de 5%, 10% y 20%, obteniendo una respuesta antiinflamatoria no significativa, comparando el extracto de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger, con el estándar utilizado se puede observar diferencias no significativas (Ver. Figuras 5, 6 y 7), posiblemente la diferencia no significativa este acorde con el tipo de flavonoides encontrados y la concentración de los mismos en la parte de la planta en estudio, considerando que en la inflamación los cambios vasculares ocurren en primer lugar una vasodilatación inducida por los mediadores químicos los cuales actúan sobre el musculo liso vascular abriéndose nuevos lechos capilares y por consiguiente el flujo sanguíneo local aumenta, lo que provoca calor y también eritema. Las reacciones de inflamación aguda pueden darse por agentes físicos, químicos, traumatismos, infecciones bacterianas, necrosis tisular, reacciones de hipersensibilidad y cuerpos extraños. Robbins[27] año 2010.

En el estudio de investigación realizado por Mayhuasca y Bonilla[46] en el año 2007, para comprobar la actividad antiinflamatoria atribuida por los pobladores de Huancayo a la especie *Calceolarea melissifolia* "Bentham", se trabajó con hojas y tallos, en el estudio fitoquímico se halló, catequinas, esteroides y/o triterpenos, alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas. La actividad farmacológica se realizó según el método del edema auricular, inducido por aceite de crotón en ratones, a dosis de 0,1mg/oreja y 0,5mg/oreja los cuales presentan actividad antiinflamatoria, se aislaron e identificaron tres flavonoides 7,4-di-O-alquil-3,5,3-trihidroxiflavonol, 5,7,4-tri-O-alquil-3,5-dihidroxiflavanona y 5,7,4-trihidroxiflavona. Estos resultados guardan relación con el presente trabajo de investigación de *Niphidium crassifolium* (L). Lellinger en el cual también se halló flavonoides, quinonas y taninos, identificando una especie química 4,7-Dihidroxiflavona, pero en lo que no concuerda es en la actividad antiinflamatoria que no es significativa, considerando que se ha investigado solo rizomas, en cambio en la especie "Bentham" se investigó hojas y tallos los cuales siempre han tenido mayor proporción de metabolitos en su composición que solo los rizomas Lock de Ugaz[1] año 2013, también las flavonas y flavonoles varían netamente en función del órgano, como son leño, corteza, hojas, Bruneton[54] año 2001, asimismo en la investigación con la especie *Calceolarea melissifolia* la acción antiinflamatoria significativa podría estar relacionada con la presencia y los tipos de flavonoides hallados.[46]

Otra investigación que también guarda relación con el presente trabajo científico realizado ha sido la investigación desarrollada por Vargas[38] en el año 2007, como se mencionó anteriormente, sobre la actividad cicatrizante y antiinflamatoria del extracto alcohólico de hojas de *Senna reticulata* (Willd.) H. Irwin & Barneby "Retama", se determinaron metabolitos secundarios como alcaloides, taninos y flavonas y se propuso las estructuras químicas, 5,7-Dihidroxiisoflavona, 6,7-Dihidroxiisoflavona y 3, 4,7-Trihidroxiisoflavona coincidiendo con el presente trabajo que la actividad antiinflamatoria no es significativa, pero en lo que no concuerda es en la mayor proporción de metabolitos (Flavonoides) encontrados tipo isoflavona ya que se trabajó con el extracto alcohólico de hojas.

Los rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger ("Calaguala") es utilizada hace mucho tiempo por la población para aliviar afecciones dermatológicas, mediante la aplicación de extractos acuosos por varios días. No se han reportado trabajos científicos validados de esta planta, es por ello que la investigación realizada es un avance en el conocimiento de esta planta nativa. Los mecanismos de acción de los metabolitos secundarios de *Niphidium crassifolium* no son aún muy conocidos, pero de acuerdo a trabajos similares de investigación desarrollados por Herrera[37] en el año 2017 determinó metabolitos secundarios como saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides y carbohidratos en el extracto etanólico de corteza y brotes tiernos de *Colletia spinosissima* J. Gmelin (Tacsana), demostrando efecto antiinflamatorio, esta acción está íntimamente relacionada con los flavonoides presentes en las plantas. Es muy importante el conocimiento de su composición química, principios activos y la acción terapéutica de dicho extracto por medio del estudio fitoquímico, estudio cromatográfico y ensayos farmacológicos, fue uno de los objetivos de la presente investigación demostrar la existencia de metabolitos secundarios los cuales poseen la actividad antiinflamatoria y cicatrizante de esta planta ya que a diferencia de otros estudios esta planta ha sido poco estudiada científicamente tampoco se han estudiado especies químicas que puedan corroborar su efecto antiinflamatorio y/o cicatrizante atribuida a esta especie.

En el análisis de la actividad cicatrizante se ha demostrado el efecto cicatrizante (Ver tabla N° 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 26) esto se justifica posiblemente a que la planta contiene taninos, flavonoides y quinonas (Tabla N° 5 y 6) y Figura N° 8, 9, 10 y 13) Los flavonoides son metabolitos secundarios que evitan los radicales libres. La actividad cicatrizante del extracto etanólico de rizomas de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger ("Calaguala") se comparó con una especialidad farmacéutica estándar Neomicina-Bacitracina al 0,35%, glicina, L-cisteína, DL-treonina Cicatrín, este estándar ha sido validado con las investigaciones realizadas por Arroyo[40] año 1999 dando una mejor respuesta con las cremas preparadas a mayor concentración (Tablas N° 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 26) y (Figura N° 8, 9, 10 y 13). Se observa que la mayor respuesta terapéutica se da con el extracto de calaguala al 20%, siendo significativas también los extractos al 10% y 5 % comparadas con el estándar. El Método utilizado fue Lesión inducida en Lomo de ratón Vaisberg y col.[33] año 1989, se reporta en la investigación realizada por Tillan, Castro y Bueno[56] del año

2004, que el efecto cicatrizante es mayor a menores concentraciones, lo que no concuerda con el presente trabajo de investigación. El estudio de Tillan y col[56] del año 2004, también difiere en la dosis, posiblemente por los metabolitos encontrados y el tipo de flavonoides que presenta la acción terapéutica indicada, pero en el presente trabajo de investigación se ha demostrado que el extracto etanólico de rizoma de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger ("Calaguala") presenta la dosis del efecto cicatrizante en el rango de mayores concentraciones mostrando mejores efectos en heridas de ratones, posiblemente por la mayor proliferación y migración de fibroblastos y diversos factores relacionados. La actividad cicatrizante podría deberse a la presencia de flavonoides, y taninos presentes, como la investigación del extracto hidroalcohólico de hojas de *Annona muricata* L. (guanábana) los cuales interactuarían con las células de la piel herida interviniendo en el proceso de cicatrización, Vilchez[10] del año 2020.

La investigación realizada con *Niphidium crassifolium* (L) Lellinger de acuerdo a los resultados obtenidos también guardan relación con la investigación realizada con el extracto hidroalcohólico de la raíz de *Ranunculus praemorsus* H.B.K ex DC en lesiones inducidas en ratas, se elucidaron compuestos químicos de naturaleza tipo flavonoides, triterpenos, esteroides, y alcaloides, realizando concentraciones del extracto al 1%, 2%, 10% y 20% comprobando un mayor efecto cicatrizante a mayor concentración, resultados similares al presente trabajo de investigación realizado por Condori[44] del año 2018.

Al observar la tabla N° 4 sobre la prueba de solubilidad, observamos que el extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger, fue sometido a solventes de diferente polaridad, obteniendo mayores resultados de solubilidad con los solventes de polaridad media como son acetato de etilo, metanol y etanol, es soluble en menor proporción en cloroformo y butanol. Lock[1] año 2013.

En la tabla N° 5 sobre el estudio fitoquímico realizado en el extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger esta marcha sirvió para comprobar los metabolitos presentes en los rizomas, así como su solubilidad se utilizó reactivos de coloración y precipitación Lock[1] año 2013, se determinó la presencia de flavonoides, taninos y quinonas lo que coincide con investigaciones realizadas en extractos de plantas para la actividad cicatrizante Vargas[38] año, 2007.

Al efectuar el estudio Cromatográfico en capa fina utilizando el sistema de acetato de etilo/ metanol (1,5:0,5) se observa en la tabla N° 6, fracciones obtenidas las cuales a UV 366 nm se observa manchas de color amarillo, las cuales reveladas con vapores de NH_3 + UV, se observa un cambio a color amarillo ligeramente rosado lo que indica la posible presencia de flavonoides, lo cual confirma los trabajos de investigación realizados en extractos de plantas Lock[1] año 2013.

La indudable actividad cicatrizante observada por el método de Lesión inducida en lomo de ratón (Vaisberg y col.), al administrarle por vía tópica el extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.)Lellinger puede deberse al efecto sinérgico de las estructuras químicas

halladas y a los taninos, los cuales al poseer efectos astringentes reaccionarían con las proteínas de la piel activando el proceso de cicatrización, lo que coincide con otros trabajos de investigación realizados Martinez[57] año 2015.

Según Rincón[59] en el estudio desarrollado en el año 2009 sobre la actividad cicatrizante del extracto de D. croatii en tubérculos el cual fue evaluado en ratas Wistar usando el modelo de herida por escisión en el dorso y administradas vía tópica. El área de las heridas presentó una reducción estadísticamente significativa $p< 0,05$ lo que concuerda con la presente investigación.

En los resultados obtenidos según se observa en los (Tablas N° 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 26), y (Ver Figura N° 13), se comprueba la evidente acción cicatrizante que presenta la crema con el extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger, confirmando que el mayor efecto cicatrizante se observa en el extracto etanólico al 20%, (Figura N° 8, 9, 10 y 13) que con el extracto al 10% y al 5% donde va disminuyendo su efectividad cicatrizante respectivamente, como se comprueba en trabajos de investigación desarrollado por Mora[41] en el año 2018, donde el mayor efecto cicatrizante fue al 10%.

Cabe señalar que la cicatrización siendo un mecanismo complicado donde existe relación de los elementos necesarios que producen las proteínas imprescindibles para la reacción inflamatoria y la reparación del tejido, no es un proceso regenerativo más si reparativo, ya que la regeneración funcional y estructural total del tejido se presenta solo durante la cicatrización fetal, en el caso de la cicatrización en el tejido adulto no hay una regeneración tisular completa por lo tanto el tejido no vuelve a ser el mismo. Los metabolitos secundarios influyen directamente en la estabilización y aceleración del proceso de cicatrización, como

es el caso de los metabolitos arabionolactano, flavonoides y naftoquinonas, ácido linoleico-metil-ester, betasitosterol investigación desarrollada por Valencia[60] en el año 2010 y como también se ha demostrado ampliamente en diferentes investigaciones con plantas cuyo efecto cicatrizante ha sido validado por Arroyo[40] año 1999 y Vargas[38] año 2007.

Es evidente que la vía de administración determina el efecto terapéutico y en el presente estudio el objetivo fue determinar precisamente el efecto antiinflamatorio y cicatrizante y la especie química responsable posiblemente de la acción cicatrizante presente en el extracto etanólico de *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger como es la 4, 7 – Dihidroxiflavona (Tabla 24) se propone esta especie obtenida por desplazamiento batocrómico y coincide con este tipo de flavona. La muestra F 6 según el espectrograma obtenido en metanol corresponde al núcleo básico de una flavona y presenta dos picos muy característicos (230 nm y 289 nm) comparando con espectros reportados por Mabry[45] del año 1970. Con el Metóxido de sodio tanto el pico de absorción de la Banda II y Banda I no muestran ningún desplazamiento batocrómico por ello no presenta O-hidroxilos en (3 y 4). El acetato de sodio detecta los grupos hidroxilo más ácido del flavonoide (7 y 4), se produce desplazamiento batocrómico de las Bandas II (285 nm) y Banda I (370 nm), con el $AcONa/H_3BO_3$ detecta grupos O-

dihidroxilo produciendo un desplazamiento batocrómico de las Bandas II (285 nm) y Banda I (350 nm).

Las isoflavonas son solo producidas por plantas y hongos y pueden aislarse de la mayor parte de la planta incluyendo hojas, tallos, raíces, rizomas, flores semillas y germen. Graff[61] año 2005. Según Orozco[58] en la investigación realizada el año 2010, determinó flavonoides y saponinas en rizomas de calahuala *Phlebodium pseudoaureum,* los flavonoides detectados de esta especie fueron rutina, quercetina, hiperósido y ácido cafeíco, lo que coincide con el presente trabajo de investigación en cuanto al metabolito flavonoide que posee la acción terapéutica.

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

1. Se determinó que el extracto etanólico de rizomas de ***Niphidium crassifolium*** **(L.) Lellinger "Calaguala"** presenta los principales metabolitos en estudio como son: taninos, quinonas y flavonoides con una posible estructura química de 4,7-Dihidroxiflavona.

2. El extracto etanólico de ***Niphidium crassifolium*** **(L.) Lellinger "Calaguala",** no presenta efecto antiinflamatorio.

3. La determinación del efecto cicatrizante por el Método de Lesión inducida en Lomo de ratón (Vaisberg y col, 1989) del extracto etanólico de rizomas de ***Niphidium crassifolium*** (**L.) Lellinger "Calaguala**" presenta mayor efecto cicatrizante a mayor concentración.

CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 3ª ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 2013. p. 1 – 7

2. Martínez MM, Cuéllar AC. Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana: Editorial Félix Varela; 2012.

3. Marroquín N. Actividad biológica y caracterización química de los extractos de las hojas y corteza de *Rhizophora mangle* L. como una alternativa fitofarmacéutica en la cicatrización. CTS [Internet] 23 de agosto de 2016 (citado 13 de marzo de 2022):3(1): 55-64. Disponible en: https://revistas.usac.edu.gt/index.php/cytes/article/view/155

4. Ministerio de Agricultura y Riego. MINAGRI, Lima Perú: (Citado 2017) Recuperado 14 de febrero 2016. Disponible en: URL. www.minagri.gob.pe/Portal

5. De Campo y Matilla M. Pervivencia de los remedios vegetales tradicionales americanos en la terapéutica española actual. [Tesis para optar el grado de doctor en Farmacia]. España: Universidad Complutense de Madrid; 2014. Disponible en: http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?código=128559.

6. Ministerio de Salud. MINSA. Lima Perú: (Citado 2013). (Recuperado 25 de marzo 2016). Disponible en: URL. www.minsa.gob.pe/Portal

7. Martínez J, Más Toro D, Rodríguez Román, Pupo G, Rosabal O, Olmo C. Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2017; Vol. 22 N°1.

8. Guevara T. Elaboración y determinación de eficacia in vivo de un gel para el acné a base de calaguala (*Campyloneurum amphostenon*). [Tesis para obtener el título de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Facultad de Ciencias.

Riobamba;
2011.Disponibleen:http://dspace.spoch.edu.ec/handle/123456789/1993.

9. De la Cruz M, Torres E, Morales J, Hermosilla R, Hernández R. Identificación de metabolitos secundarios de *Anredera vesicaria* (Yuca hiedra). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2016; Vol 21(2):215-222

10. Vílchez H, Inocente M, Flores O. Actividad cicatrizante de seis extractos hidroalcohólicos de plantas en heridas incisas de *Rattus norvegicus* albinus. Revista Cubana de Medicina Militar. 2020; Vol 49 N°1.

11. Hernández M. Modulación de la metilación de genes en células de cáncer de mama por (-) – Epicatequina y (+) – Catequina de Teobroma cacao. [Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias en Farmacología]. México: Instituto Politécnico Nacional, ESCUELA Superior de Medicina; 2011. Disponible en : http://repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/12114

12. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 13ava Edición. México: Editorial Mc Graw Hill Interamericana; 2019.

13. Gallardo G, Barboza L. Efecto cicatrizante del gel del látex de Crotón lechleri "Sangre de Grado" Revista Científica Ciencia Médica. 2015 Vol 18 (1), 10-16.

14. Andújar I. Nuevos agentes antiinflamatorios de origen natural. Estudio de la actividad y mecanismo de acción de Polifenoles del cacao y shikonina. [Tesis para optar al grado de doctor mención Farmacología]. España: Universidad Valencia; 2012. Disponible en: http://dialnet.unirioja.es/serviet/tesis?codigo=180665

15. Pilatuña L. Elaboración de una forma farmacéutica con efecto cicatrizante a partir del extracto de la copal planta nativa del centro cultural Uni-shu de la comuna Chiguilpe de Santo Domingo de los Tsáchilas. [Tesis para obtener el título de Bioquímica Farmacéutica en la Facultad de Ciencias Médicas de la UNIANDES]. Ecuador: Universidad Regional Autónoma de los Andes; 2015. Disponible en: http://dspace.uniandes.edu.ec/handle/123456789/4784

16. Mellado O. "Identificación de la estructura química de los metabolitos de *Oenothera multicaulis* por espectrometría y RMNH1". [Tesis para optar el grado de doctor con mención en Ciencias y Tecnologías Medioambientales].

Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2019. Disponible en: http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/10833

17. Travieso M, Betancourt A, Escobar A, Linares A, Rodríguez Y, Pérez T. Validación del método de cuantificación de taninos totales en formulaciones semisólidas de *Rhizophora mangle L.* (mangle rojo). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2011; 16(1), 80-92

18. Sandoval R. Evaluación tópica de la capacidad cicatrizante y antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico y las fracciones acuosas y de acetato de etilo de la raíz *Sechium edule* (chayote). [Tesis para obtener del grado de maestro mención en Medicina Molecular]. México: Universidad Autónoma del estado de Morelas; 2018.Disponible en:

http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/425

19. Cavalcanti E, Silva J, Delcio de Castro F, Dantas de Madeiro A, Silva H, Pereira T. Evaluación de la actividad biológica de los extractos de *Commiphora leptophloeos*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2016; Vol. 21 N°4.

20. León B. El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. Rev. Perú. Biol. Número especial. 2006; 13(2): 9s 22s

21. Stransburger E. Tratado de Botánica. 35 Edición. Barcelona: Editorial Omega; 2004.

22. Navarrete H, León B. Helechos. Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.

23. Cabieses F. Apuntes de Medicina Tradicional. 1ª. ed. Lima – Perú: A & B SA; 1993. 280 págs.

24. Cabieses F. La salud y los dioses. La medicina en el antiguo Perú. Lima: Universidad Científica Del Sur; 2007. 476 pages

25. Lellinger D.B. A Field Manual of the ferns & Fern-allies of the United States & Canada. Washington DC: Smithsonian; 1985. 389 pages

26. Font Quer P. *Plantas medicinales. El dioscórides Renovado*. Madrid: Ediciones Península; 2016. 190 págs

27. Robbins, C. Patología Estructural y Funcional. Madrid: Editorial Mc Graw-Hill Interamericana; 2010.

28. Choi, HG.; Je, IG.; Kim, GJ.; Nam, JW.; Shim, SH.; Kim, SH.; Choi, H. Chemical Constituents of the Root of Angelica tenuissima and their Anti-allergic inflammatory Activity. Pubmed Nat Prod Commun May 2017; 12(5):779-780 pp

29. Coleman J. Nitric oxide in immunity inflammation. Int Immunopharmacol. Inglaterra;2001.Disponibleen: https://doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00086-8

30. Okonogi, S.; Kheawfu, K.; Holzer, W.; Unger, FM.; Viernstein, H.; Mueller, M. (2016). Anti-inflammatory Effects of Compounds from *Polygonum odoratum*. Pubmed. Nat.Prod. Commun 2016 Nov; 11(11):1651-1654.

31. CYTED. Manual de Técnicas de Investigación. Marzo 1994; (pp. 40-90.).

32. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Bioquímica. Barcelona-España: Editorial Reverté S.A.; 2011.

33. Vaisberg JA., Milla M, Planas M, Córdova JLy col. Taspina is the Cicatrizant principle in sangre de grado extracted from *Croton lechleri*. Planta Médica. 1989; 55: 140-143

34. Abdulaal WH. Purification and characterization of cysteina proteasa from miswak Salvadora persica. Pubmedi BMC Biochem Dec, 3; 19 (1). doi 10.1186/s12858-018-0100-1.; 2018

35. De Paz P. Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares. Posible tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la dieta. [Tesis para optar al grado de doctor mención en Bioquímica y Biología Molecular]. España: Universidad de Granada; 2006. Disponible en: http://dialnet.unirioja.es/serviet/tesis?código=47720

36. Lock O, Perez E, Villar M, Flores D, Rojas R. Bioactive compounds from plants used in Peruvian traditional medicine. Nat Prod Commun. 2016; 11(3): 14-36

37. Herrera S. Efecto protector del champú conteniendo extracto etanólico de corteza y brotes tiernos de *Colletia spinosissima* J. Gmelin (TACSANA) sobre la irritación inducida en piel de ratas. [Tesis para optar el grado académico de maestro en Farmacología, mención Farmacología experimental]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017. Disponible en: http://hdl.handle.net/20.500.12672/6470

38. Vargas C. Estudio de la actividad cicatrizante y antiinflamatoria del extracto alcohólico de las hojas de *Senna reticulata* (Willd) H. Irwin &Barneby ("RETAMA"). [Tesis para optar el grado académico de maestro en la Facultad de Farmacia y Bioquímica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007. Disponible en: https://hdl/handle.net/20.500.12672/2585

39. Calero L. Efecto cicatrizante del látex de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson en ratones (*Mus musculus*) cepa Balb/C. [Tesis para optar al grado académico de maestro en Farmacología mención Farmacología Experimental]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2021. Disponible en: https://hdl.handle.net/20.500.12672/16716

40. Arroyo, J. et. al Efecto cicatrizante del *Piper angustifolium* R&P sobre lesiones de piel inducidas en animales de experimentación. 1999; Fol. Derm.Per.10 (1): 45-50.

41. Mora Carlos Alcedo. Et al. Efecto cicatrizante del ungüento de *Dodonaea viscosa* Jacq. "Chamisa" en ratones Balb/C5 *Agora Revista Cientifica*: 4.2 (2018).

42. Lozano, N.; Bonilla, P.; Arroyo, J.; Arias, G, Córdova, A.; Baldoceda, F. Evaluación fitoquímica y actividad biológica de *Desmodium molliculum.* (Manayupa) Ciencia e investigación (Internet) 31 de diciembre de 2001(citado 24 de febrero 2022); 4(2):37-44 Disponible en: https://revistasinvestigación.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3535.

43. Pérez León J. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ricinus communis* L. "Higuerilla". [Tesis para optar al grado académico de maestro en la Facultad de Farmacia y Bioquímica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. Disponible en: https://hdl.handle.net/20.500.12672/3439

44. Condori L. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Ranunculus praemorsus* H.B.K ex DC, en lesiones inducidas en ratas. [Tesis para optar al grado académico de maestro en Farmacología, mención en Farmacología Experimental]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018. Disponible en: https://hdl.handle.net/20.500.12672/9305

45. Mabry T. Markhan K. Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer- Verlag. New York. Heidelberg. Berlin. 1970. p 9 - 145

46. Mayhuasca, O., Bonilla, P., Ballón, M., Ferreira, M., Carrasco, E. Efecto antiinflamatorio en ratones de extractos de *Calsolaria melissifolia* "Bentham". Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, Ciencia e Investigación. 2007; 10(2)

47. Félix M. Estudio fitoquímico y determinación de las flavononas y alcaloides de naturaleza indólica en hojas de *Perezia multiflora (H. et B.) Less "escorsonera*". Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, Ciencia e

Investigación.2000;9(3).Disponibleen: https://revistasinvestigación.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/5328

48. Avalos C. Efecto del gel de extracto etanólico de hojas de *Piper aduncum* en la inflamación inducida de *Rattus rattus* var. *Norvegicus.* [Tesis para optar al grado de maestro]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2018. Disponible en: http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3065

49. Torres MJ, Barrionuevo E, Kowalski M, Blanca M. Hipersensitivity Reactions to Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. USA: Immunology and Allergy Clinics; 2014.

50. Álvarez N. Efectos saludables de flavonoides. Estudio experimental en vitro e in vivo. [Tesis para optar al grado académico de doctor mención en Radiología y Medicina Física]. España: Universidad de Murcia; 2010. Disponible en: http://dhl.handle.net/10803/10757

51. Arauco K. Efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de *Muehlenbeckia volcánica* (Bentham) endlincher (mullaca) sobre el granuloma inducido por carragenina en ratas. [Tesis para optar al grado académico de maestro en Farmacología mención Farmacología Experimental]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016. Disponible en: http://hdl.handle.net/20.500.12672/5978

52. Villalba E. Inflamación I Rev. Act. Med. 2014; V.43:2260-226

53. Suarez R. Efecto antiinflamatorio analgésico en ratoncitos albinos y antioxidante in vitro de los flavonoides presentes en el extracto de hojas de *Pelargonium hortorum* L.H. Bailey (Geranio) en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2016. [Tesis para optar el grado académico de maestra en Docencia e Investigación en Estomatología]. Lima: Universidad Nacional Federico Villareal; 2018. Disponible en : http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/2699

54. Bruneton J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. España: Editorial Lavoisier, Hampshire; 2001.

55. Aldana F. Detección y cuantificación de flavonoides en tres especies de calahuala nativas de Guatemala. Facultad de CCQQ y Farmacia USAC. Guatemala. 2007.

56. Tillan J, y Col. Efecto cicatrizante de la crema de extracto etanólico de cera de caña. La Habana Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. 2004

57. Martínez J. Efecto cicatrizante de la crema con extracto hidroalcohólico de las hojas de *Tachigali chrysophylla* "*Ucschaquine"* sobre lesiones dérmicas inducidas en ratones. [Tesis para optar el grado académico de maestro en Farmacología mención en Farmacología Experimental]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015. Disponible en: https://hdl.handle.net/20.500.12672/8948

58. Orozco R. Caracterización Química y Análisis del contenido Mineral de *Smilax domingensis* y *Phlebodium pseudoaureum*. Guatemala: Proyecto Fodecyd. 2010; N° 50-2006.

59. Rincón J. Evaluación de la actividad cicatrizante y caracterización fitoquímica de *Dracontium croatii*. Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia. 2009.

60. Valencia C. Cicatrización proceso de reparación tisular. Aproximaciones. Colombia: Investigaciones Andinas; 2010 N°20. Vol. 12. 100p.

61. Graaf BA. Et. al. Flavonols, flavones y flavanones and human health: epidemiological evidence. 2005; J. Med Food. 8:281-290

CAPITULO VIII: ANEXOS

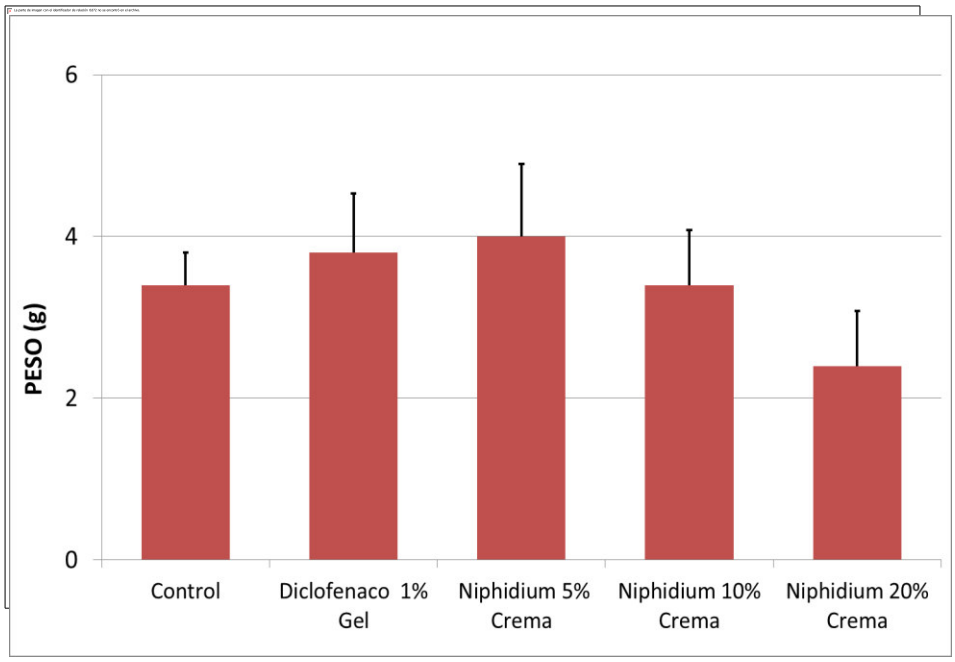

Figura 12. Medios +- Error medio Efecto antiinflamatorio

VALORES MEDIOS – EFECTO ANTIINFLAMATORIO

Fuente: Elaboración **propia**

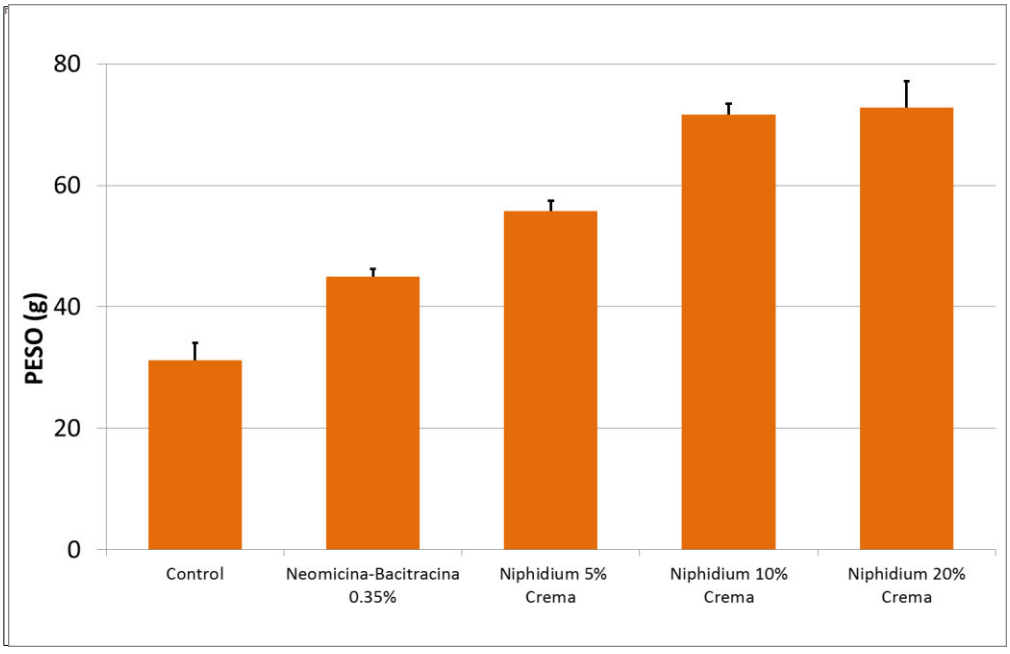

Figura 13. Valores medios – Efecto cicatrizante

Fuente: Elaboración propia



Blgo. José R. Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tel: 6590223 Mov. 980170139
Email: joricampos@yahoo.es

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO. Nº 3796. DE CONFORMIDAD CON LO DISPUESTO EN EL ARTÍCULO 05 DE LA LEY N°28847 LEY DEL TRABAJO DEL BIOLOGO Y DEL ARTÍCULO 06 DE SU REGLAMENTO APROBADO MEDIANTE DECRETO SUPREMO N° 025-2008-SA, ENCONTRÁNDOME HABIL Y AUTORIZADO POR EL COLEGIO DE BIOLOGOS PARA EJERCER LA PROFESIÓN DE BIOLOGO.

Certifica:

Que, Carlos Javier Vargas Carbajal, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM y alumno del Doctorado en Farmacia con N° de matrícula N°04047031, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida como **"cz'aguala"**, la muestra ha sido determinada como *Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger y en Sistema de clasificación de pteridofitas de Christenhusz 2011

Ocupa las categorías sistemáticas siguientes:

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Monilophyta
CLASE	:	Filicopsida
SUBCLASE	:	Polipodiidae
ORDEN	:	Polypodiales
FAMILIA	:	Polypodiaceae
GENERO	:	Niphidium
ESPECIE	:	*Niphidium crassifolium* (L.) Lellinger

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 25 de agosto del 2013

José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva N° 156, Urbanización Santa Luzmila-Lima

Tabla 25 Delta del peso y porcentaje de inhibición de inflamación.

Tratamiento	Individuo	Delta del Peso mg	Inhibición de Inflamación %
CB + Extracto etanólico al 5%	1	5	-47,05
	2	3	11,76
	3	1	70,58
	4	6	-76,47
	5	5	-47,05
CB + Extracto etanólico al 10%	1	4	-17,64
	2	1	70,58
	3	4	-17,64
	4	5	-47,05
	5	3	11,76
CB + Extracto etanólico al 20%	1	1	70,85
	2	2	41,17
	3	4	-17,64
	4	4	-17,64
	5	1	70,85
Diclofenaco gel al 1%	1	4	-17,64
	2	4	-17,64
	3	1	70,58
	4	5	-47,05
	5	5	-47,05
CB Control	1	3	NC
	2	4	NC
	3	4	NC
	4	2	NC
	5	4	NC

NC= No se calculo

CB= Crema

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 26 Valoración del efecto cicatrizante en ratones.

Tratamiento	Código	Peso (g)	VM	DE	Eficacia Cicatrización %
1 Control	0	38	-18,34	336,58	16,17
2 Control	0	32	-24,34	592,73	13,61
3 Control	0	22	-34,34	1179,6	9,36
4 Control	0	36	-20,34	413,96	15,31
5 Control	0	28	-28,34	803,50	11,91
6 Estándar Cicatrín	1	43	-13,34	178,11	18,29
7 Estándar Cicatrín	1	46	-10,34	107,04	19,57
8 Estándar Cicatrín	1	49	-7,346	53,96	20,85
9 Estándar Cicatrín	1	42	-14,34	205,81	17,87
10Estándar Cicatrín	1	45	-11,34	128,73	19,14
11Crema Extracto5%	2	51	-5,346	28,581	21,70
12Crema Extracto 5%	2	54	-2,346	5,504	22,97
13Crema Extracto 5%	2	57	0,653	0,4275	24,25
14Crema Extracto 5%	2	61	4,653	21,679	25,95
15Crema Extracto 5%	2	56	-0,346	0,1198	23,82
16Crema Extracto10%	3	69	12,65	160,11	29,36
17Crema Extracto 10%	3	71	14,65	214,73	30,21
18Crema Extracto 10%	3	70	13,65	186,42	29,78
19Crema Extracto 10%	3	79	22,65	513,19	33,61
20Crema Extracto 10%	3	69	12,65	160,11	29,36
21Crema Extracto 20%	4	57	0,653	0,4275	24,25
22Crema Extracto 20%	4	75	18,65	347,96	31,91
23Crema Extracto20%	4	77	20,65	426,58	32,76
24Crema Extracto20%	4	72	15,65	245,04	30,63
25Crema Extracto 20%	4	83	26,65	710,42	35,31
Control piel sana		**235**	**VM 292,56**	**DE 17,10**	**Piel sana 100,00**

Fuente: Elaboración propia

Valores medios en gramos (VM) + - Desviación estándar (DE), de actividad cicatrizante obtenidos al inducir lesiones en el lomo del ratón (n=5).

Eficacia de cicatrización (%) = [(gramos que abren la piel cicatrizada) / gramos para abrir piel sana] x 100 Significancia, Análisis de varianza, F = 45,122 (p=0,0001). El extracto etanólico en crema al 20% necesitó mayor fuerza de tensión en gramos para abrir la herida cicatrizada, después de tres días de tratamiento.



Figura 14 Recolección



Figura 15. Lavado de rizomas



Figura 16 Trozado de rizomas



Figura 17. Secado de rizomas



Figura 19. Trozado de rizomas

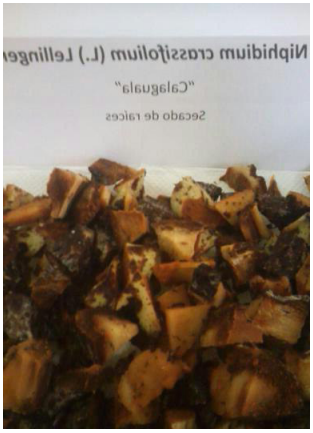

Figura 18. Secado 3 días.

Fuente: Elaboración propia



Figura 20. Estudio fitoquímico



Figura 21. Cromatofolio

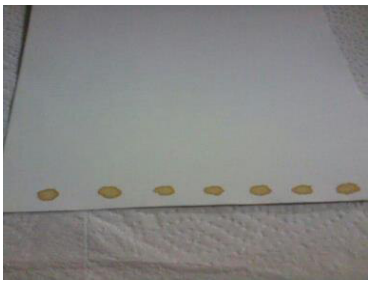

Figura 23. Sembrado del extracto



Figura 22. Corrida de placa

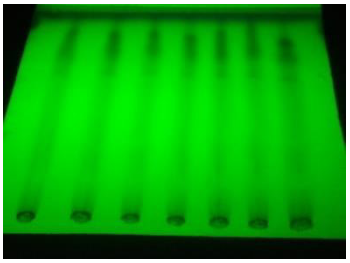

Figura 24. Revelado UV

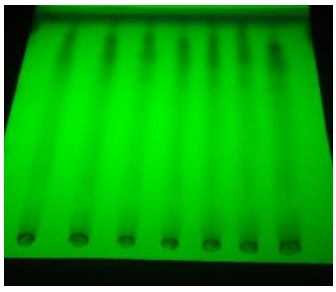

Figura 25.Revelado UV

Fuente: Elaboración propia

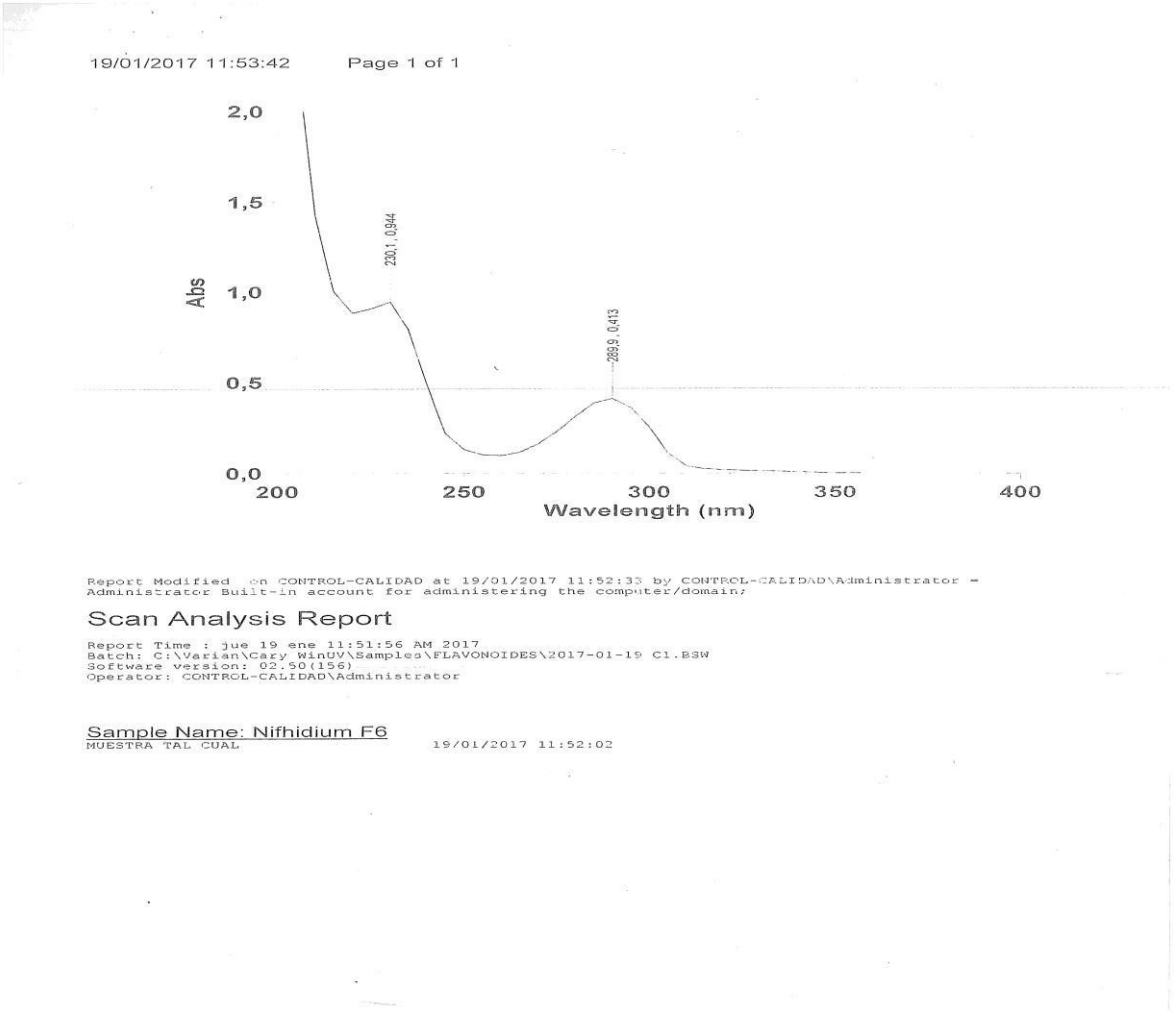

Figura26. Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico tal cual.

Fuente: Elaboración propia

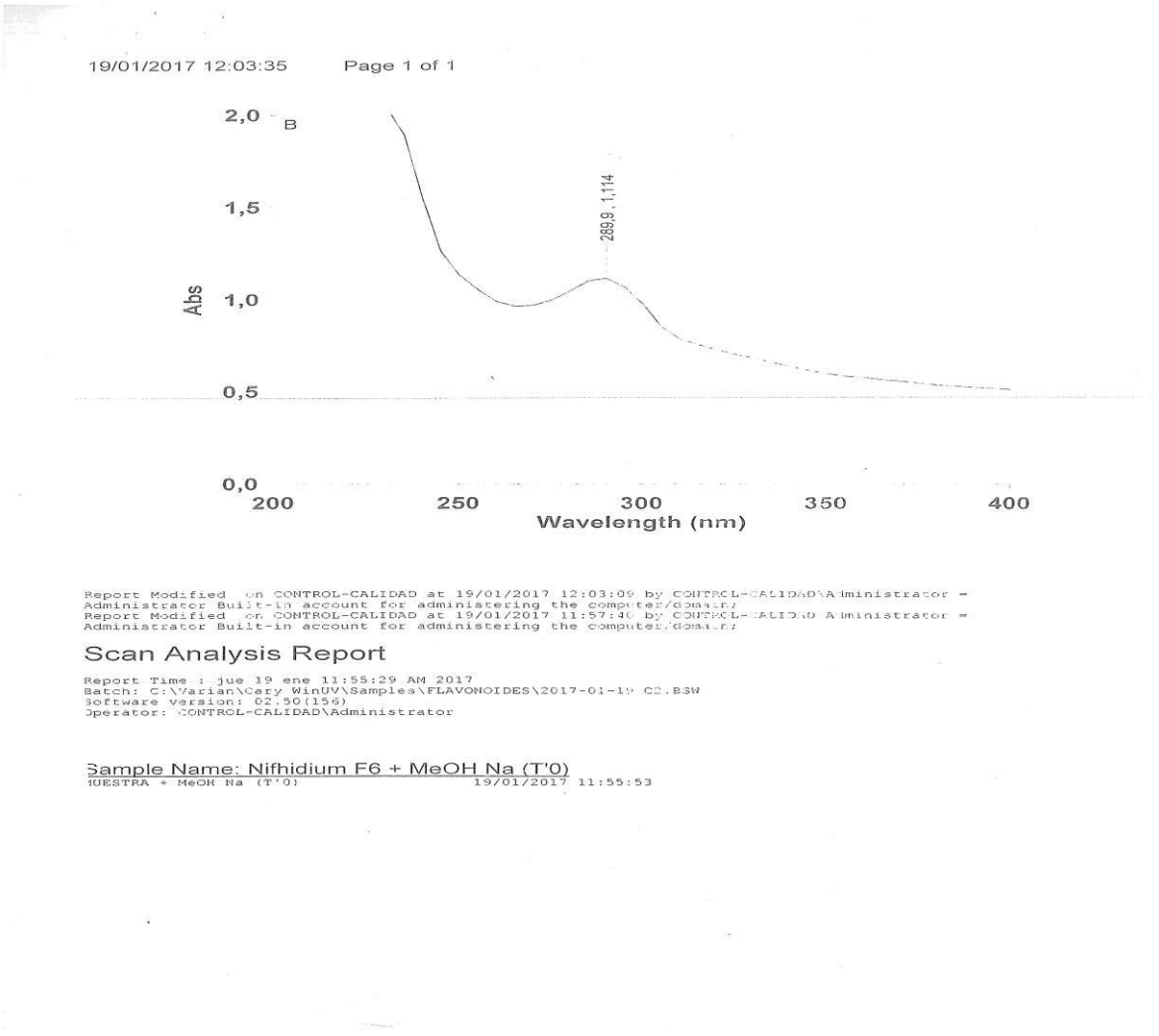

Figura27. Lectura al espectrofotómetro de la muestra n°6. Desplazamiento batocrómico MeONa a los cero minutos.

Fuente: Elaboración propia

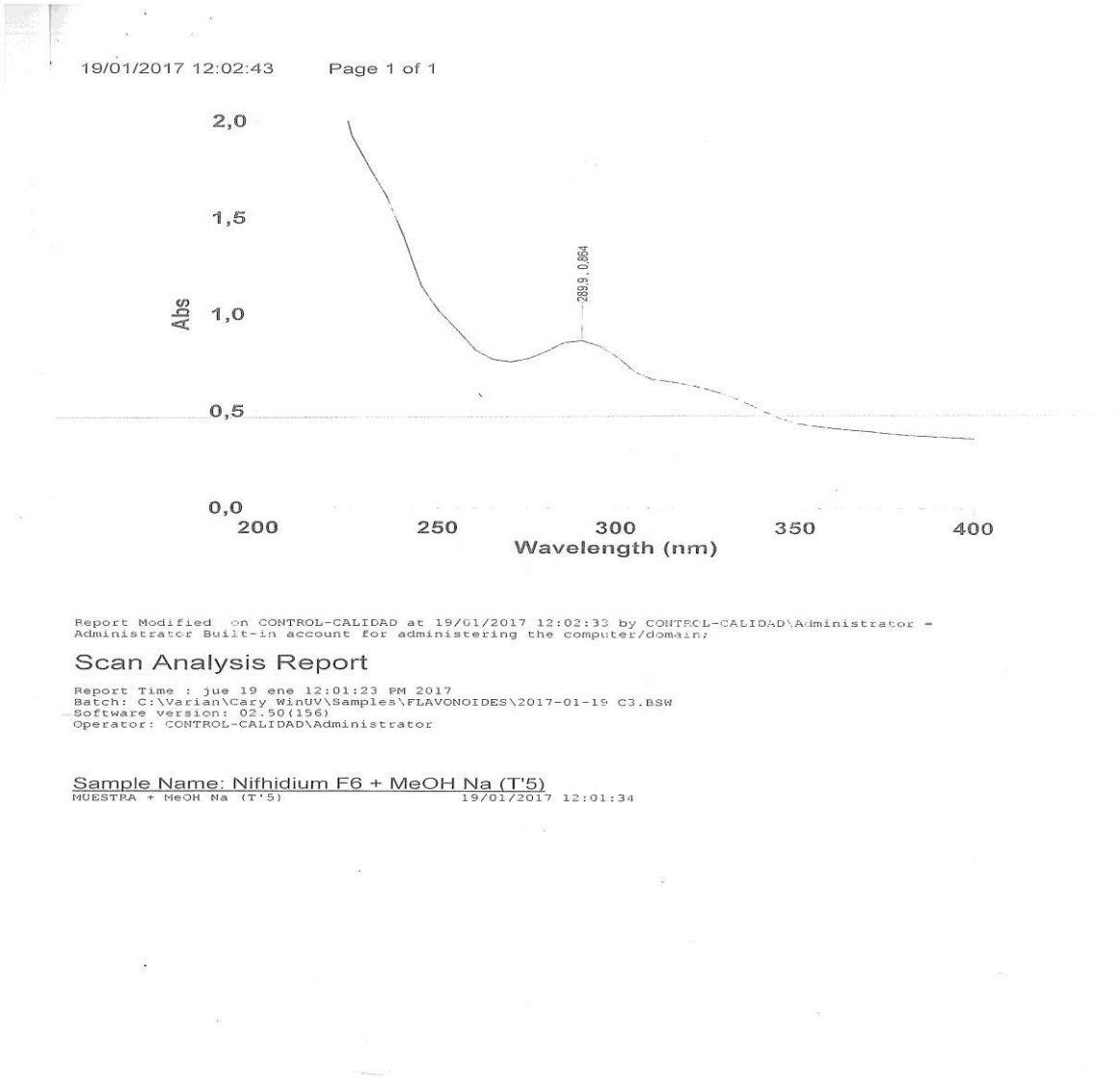

Figura28. Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico MeONa a los 5 minutos.

Fuente: Elaboración propia

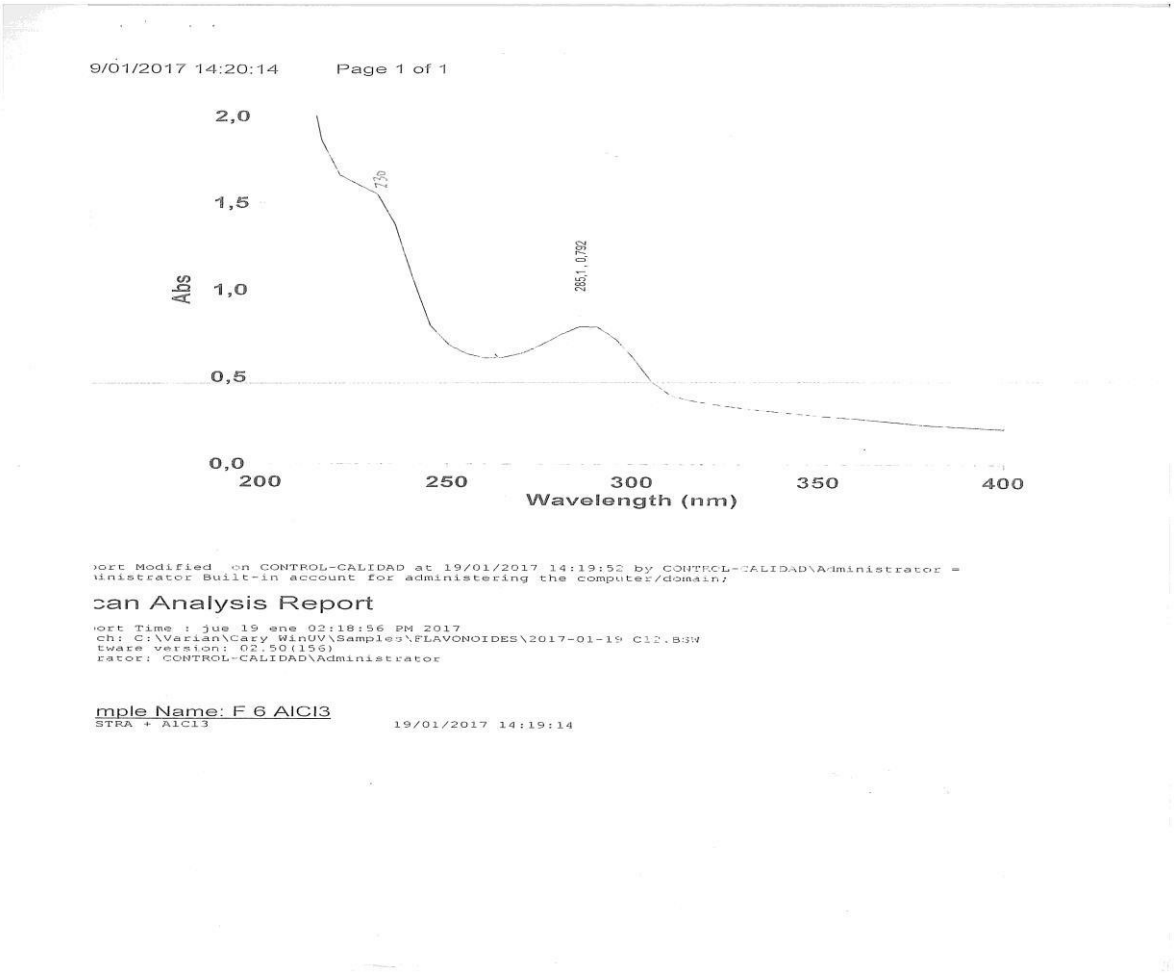

Figura29. Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico AlCl3

Fuente: Elaboración propia

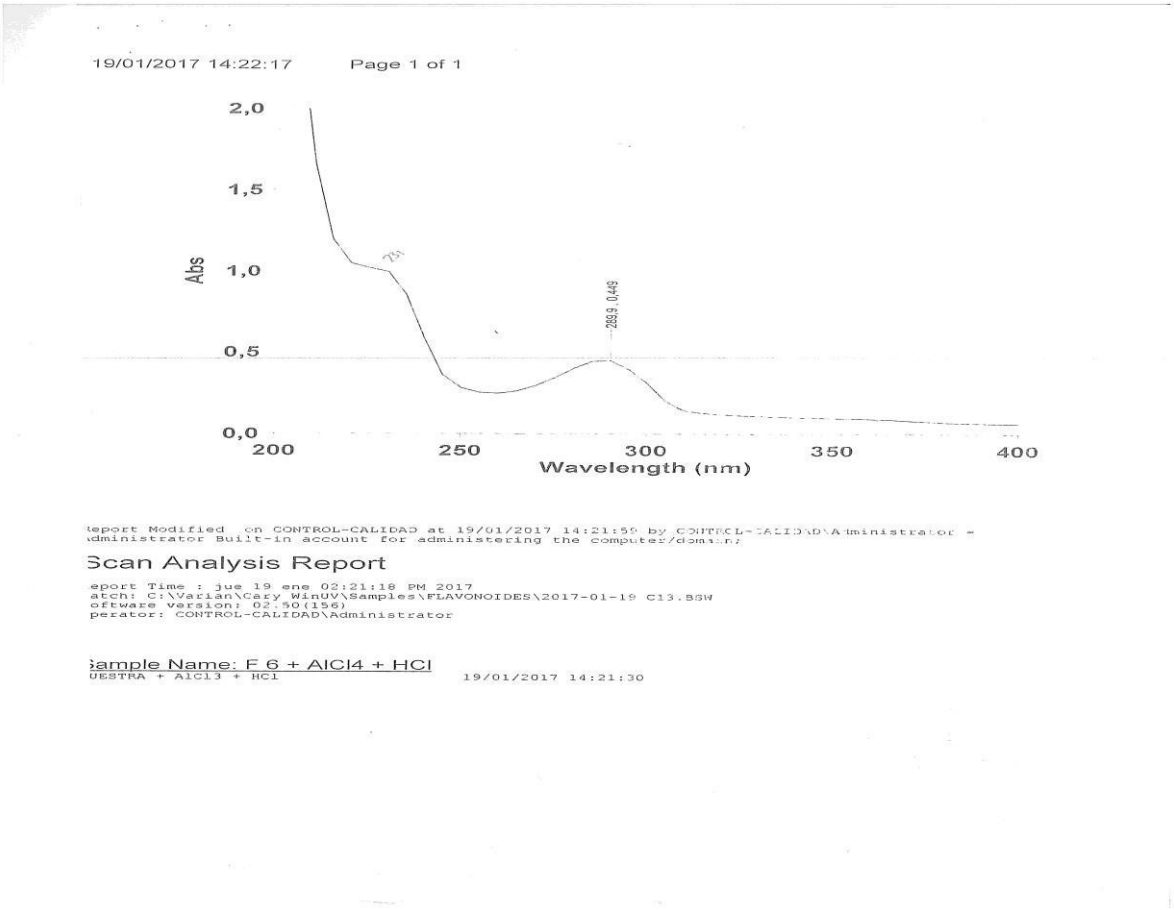

Figura30.Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico AlCl3 + HCl

Fuente: Elaboración propia

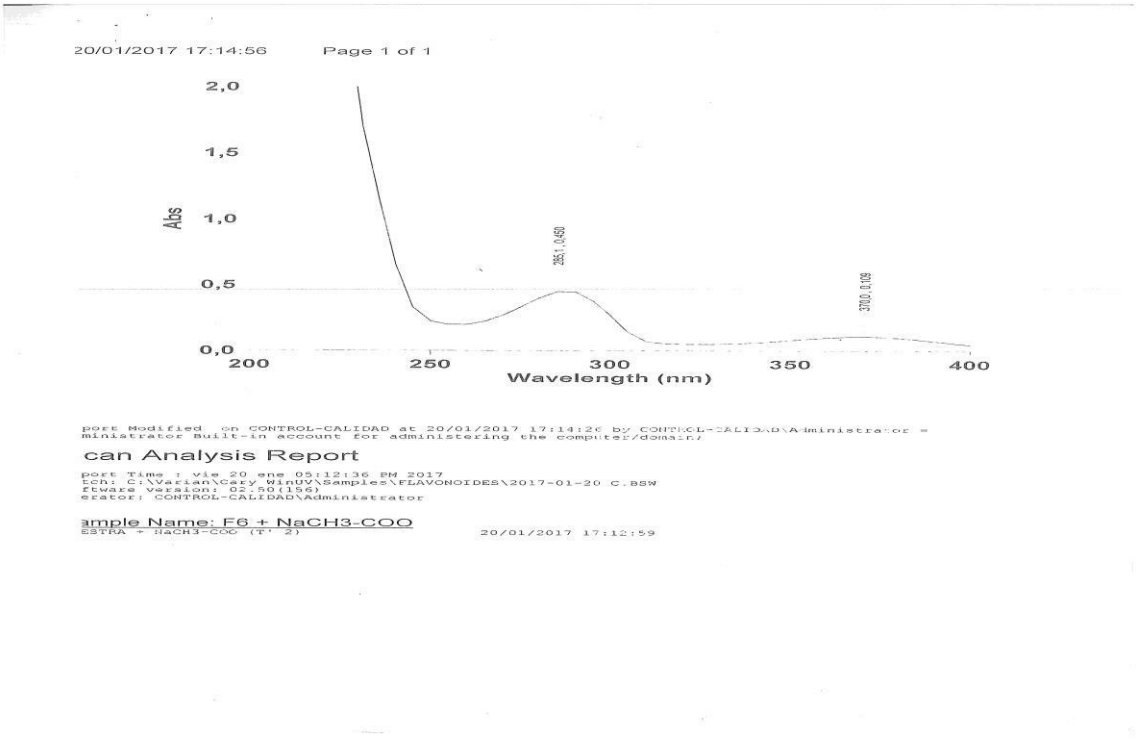

Figura31.Lectura al espectrofotómetro muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico con NaCH3COO a los 2 minutos

Fuente: Elaboración propia

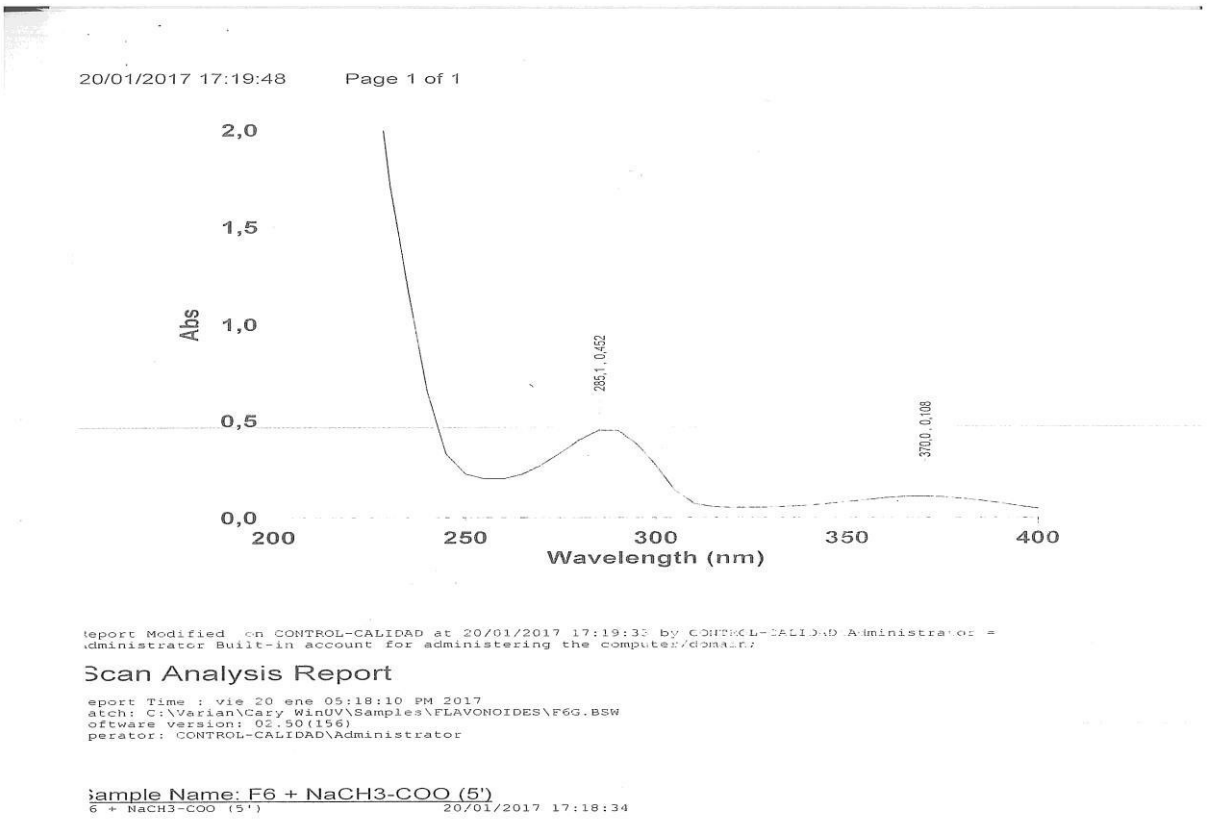

Figura32.Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico NaCH3COO a los 5 minutos.

Fuente: Elaboración propia

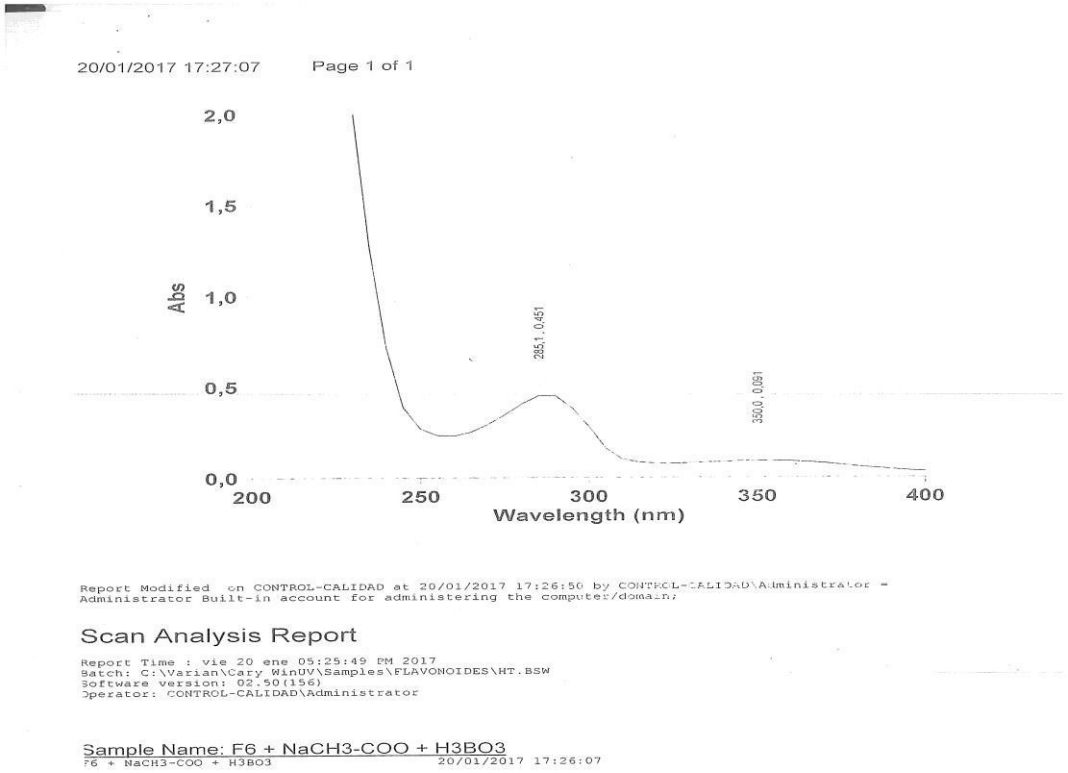

Figura33.Lectura al espectrofotómetro de la muestra N°6. Desplazamiento Batocrómico NaCH3COO + H3BO3

Fuente: Elaboración propia