

**Universidad Católica de Santa María**

**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y  
Biotecnológicas**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**



**«EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS  
EXTRACTOS Y GEL DEL RIZOMA DE *Curcuma longa* Linn  
(PALILLO) EN RATAS SOMETIDAS A INFLAMACIÓN  
SUBPLANTAR CON CARRAGENINA»**

**Tesis presentada por el Bachiller:**

Lajo Flores, Robert Jimmy

**Para optar el Título Profesional:**

Químico Farmacéutico

**Asesor:**

Q.F. Torres Vela Fernando Antero

**AREQUIPA – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20160000037803

N° Trámite en Fac. 1676-2016  
Fecha 01-09-2016

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: LAJO FLORES, Robert Jimmy

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"EVALUACION DEL EFECTO ANTIFLOGISTICO LOCAL DEL EXTRACTO Y GELES DE RIZOMA *Curcuma longa* "palillo" SOBRE EDEMA PLANTAR EXPERIMENTAL EN ANIMALES DE LABORATORIO. AREQUIPA 2016"

DICTAMINADORES: 1) Mgter. Angélica Corzo Salas 2) Mgter. María Elena Guillén Núñez

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

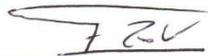
Atentamente

Firmas :   (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 15/11/16

ASESOR: Q. F. Fernando Torres Vela

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: "EVALUACION DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS EXTRACTOS Y GEL DEL RIZOMA DE *Curcuma longa* Linn (PALILLO) EN RATAS SOMETIDAS A INFLAMACION SUBPLANTAR CON CARRAGENINA " y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

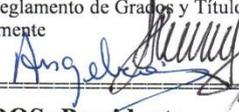
Firma  Fecha 25-09-2017

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Dr. José Villanueva Salas
- 2) Mgter. Angélica Corzo Salas
- 3) Mgter. María Elena Guillén Núñez

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrentes, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma  (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 03/01/18

JURADOS: Presidente  
Vocal  
Secretario

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 08/01/18 Hora: 12.05 Local: C- 402 (SUM)

  
DECANO 03/01/18

## Agradecimientos

A mi madre Lucia Flores Portilla, le agradezco y dedico este logro, no me alcanzará la vida para retribuir su apoyo incondicional, su constante motivación y su infinito amor. Gracias, mamá.

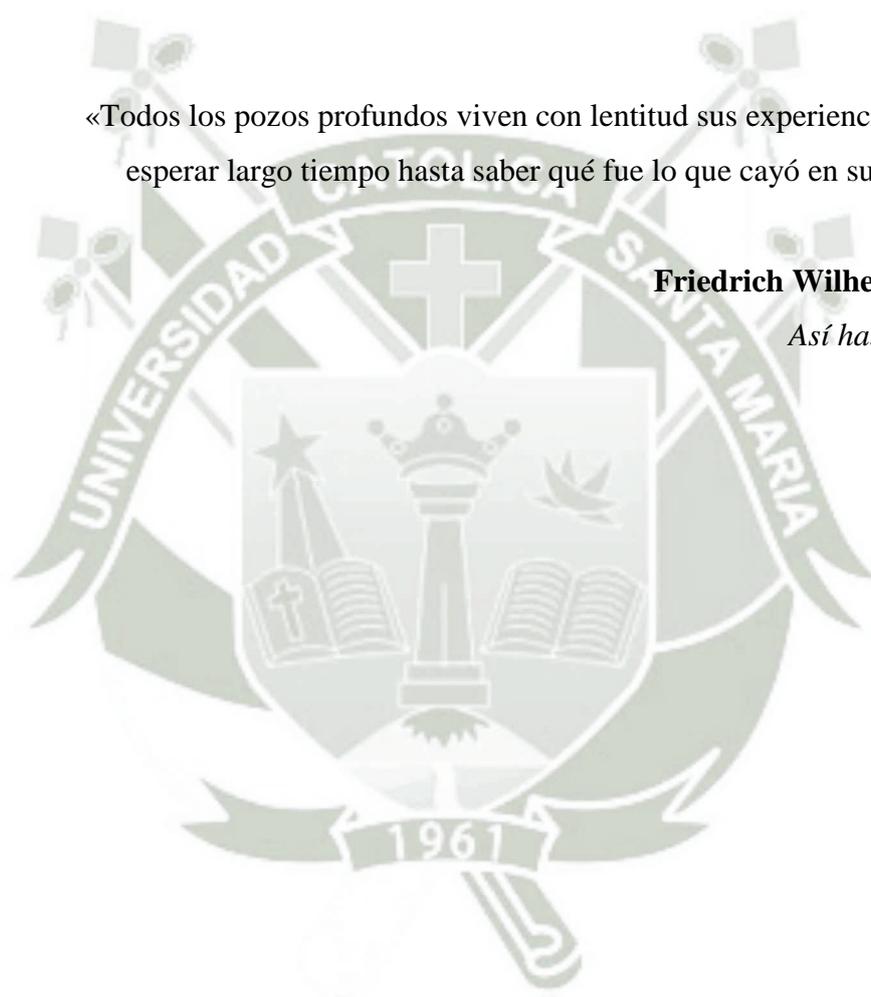
A mi padre Benjamín Lajo Herrera, gracias por brindarme ese cariño desinteresado, por ser esa persona en quien puedo confiar y contar siempre.

A mis hermanos Willman Lajo Flores y Juan Lajo Flores que han estado siempre extendiéndome una mano para apoyarme.

«Todos los pozos profundos viven con lentitud sus experiencias: tienen que esperar largo tiempo hasta saber qué fue lo que cayó en su profundidad»

**Friedrich Wilhelm Nietzsche,**

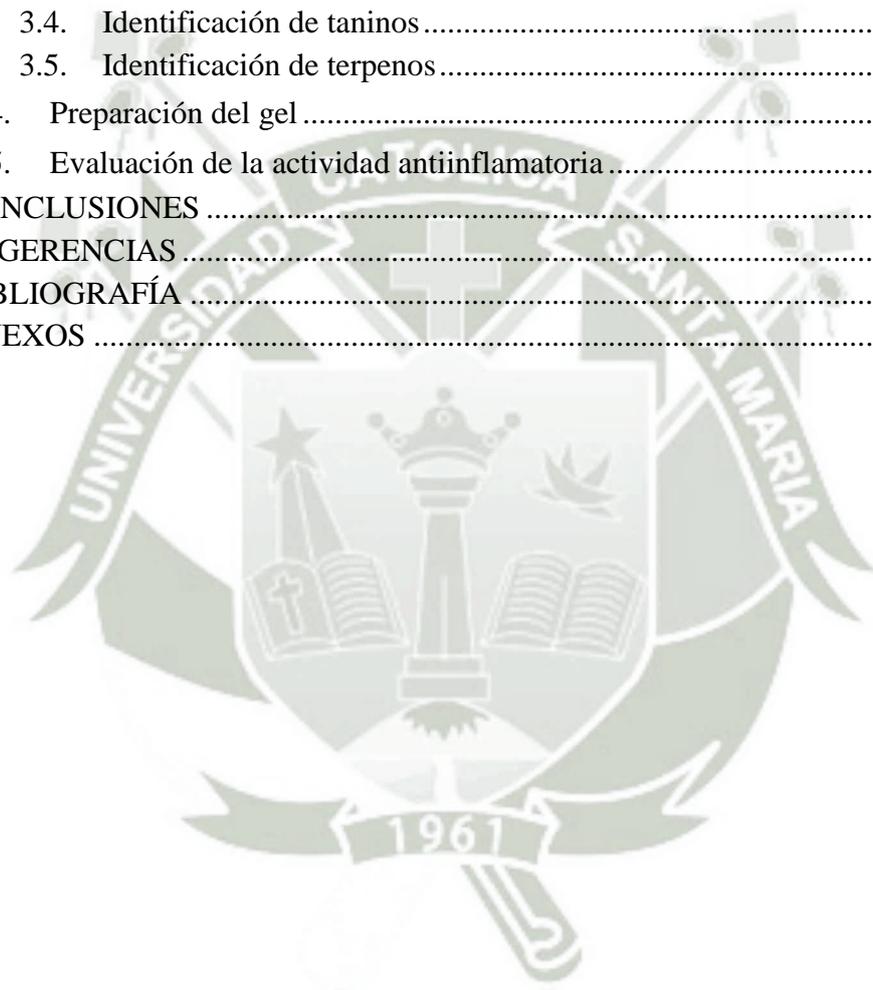
*Así habló Zaratustra*



## ÍNDICE

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
INTRODUCCIÓN.....	v
HIPÓTESIS.....	vii
OBJETIVOS.....	viii
MARCO TEÓRICO.....	1
1. <i>Curcuma longa</i> Linn.....	1
1.1. Clasificación taxonómica.....	1
1.2. Sinonimia.....	1
1.3. Descripción botánica.....	2
1.4. Origen y distribución geográfica.....	2
1.5. Descripción fitoquímica.....	3
1.6. Usos y propiedades farmacológicas.....	4
2. Inflamación.....	4
2.1. Concepto.....	4
2.2. Diagnóstico.....	5
2.3. Causas y asociaciones.....	5
2.4. Mecanismo de acción.....	6
2.5. Mediadores de la inflamación.....	12
2.6. Células inflamatorias.....	16
2.7. Tipos de inflamación.....	19
2.8. Tratamiento.....	20
2.9. Modelos experimentales para el estudio de la inflamación.....	22
3. Extracción e identificación de compuestos bioactivos de plantas.....	23
3.1. Preparación de muestras de plantas antes de la extracción.....	23
3.2. Extracción.....	24
3.3. Identificación.....	25
4. Formas farmacéuticas semisólidas.....	26
4.1. Geles.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
1. Materiales.....	28
1.1. Material biológico.....	28
1.2. Material de laboratorio.....	29
2. Reactivos.....	29
3. Equipos.....	30
4. Métodos.....	31
4.1. Preparación de los extractos de <i>Curcuma longa</i> Linn.....	31
4.2. Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria de los extractos.....	33
4.3. Análisis fitoquímico preliminar.....	34

4.4. Preparación del gel.....	36
4.5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	36
4.6. Análisis estadístico .....	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	41
1. Preparación de los extractos de <i>Curcuma longa</i> Linn.....	41
2. Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria de los extractos .....	43
3. Análisis fitoquímico preliminar .....	45
3.1. Identificación de curcuminoides.....	46
3.2. Identificación de flavonoides.....	47
3.3. Identificación de alcaloides .....	48
3.4. Identificación de taninos .....	49
3.5. Identificación de terpenos.....	49
4. Preparación del gel .....	50
5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	52
CONCLUSIONES .....	57
SUGERENCIAS .....	58
BIBLIOGRAFÍA .....	59
ANEXOS .....	67



## RESUMEN

La inflamación es un mecanismo de defensa del organismo al daño de sus tejidos y células, que trata de eliminar los estímulos perjudiciales e iniciar el proceso de curación, restaurando su estructura y sus funciones normales. Sin embargo, si se produce la alteración del equilibrio homeostático de este proceso biológico, la inflamación puede provocar la aparición y empeoramiento de las enfermedades. En consecuencia, se han desarrollado una gran variedad de medicamentos antiinflamatorios, pero que poseen muchos efectos adversos. Debido a esto, ha surgido la necesidad de buscar nuevos agentes antiinflamatorios que podrían poseer efectos adversos mínimos, tales como las plantas medicinales.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de farmacognosia (H-103), y el estudio en los animales de experimentación se realizó en el bioterio; ambos ubicados en el campus de la Universidad Católica de Santa María; teniendo como objetivo principal evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos y gel del rizoma de *Curcuma longa* Linn (palillo) en ratas sometidas a inflamación subplantar con carragenina.

Los rizomas de *Curcuma longa* L. fueron recolectados de la comunidad de Otilia, distrito de Tambopata, departamento de Madre de Dios, Perú. Su clasificación y especie fueron corroboradas en el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa. Luego, los rizomas fueron lavados, secados y molidos. Seguidamente, se realizó la extracción por el método de Soxhlet, con tres disolventes de diferente polaridad: etanol, *n*-butanol y éter de petróleo. Se determinó el porcentaje de rendimiento de extracción de estos extractos

y se realizó una prueba piloto para evaluar cuál de ellos presenta un mayor efecto antiinflamatorio. Al extracto elegido se le realizó un análisis fitoquímico preliminar por cromatografía de capa fina y se preparó un gel. Finalmente, se evaluó darle forma farmacéutica (gel) al extracto que presentó un mayor efecto antiinflamatorio y se comparó con un gel comercial (diclofenaco sódico en gel al 1 %). El efecto antiinflamatorio se evaluó mediante la inducción del edema plantar por carragenina en ratas macho de la variedad Wistar.

Se obtuvo los tres extractos blandos del rizoma de *Curcuma longa* L., con porcentajes de rendimiento de  $21.77 \pm 0.38$  %,  $15.60 \pm 0.46$  % y  $1.32 \pm 0.12$  %, para el extracto etanólico, *n*-butanólico y de éter de petróleo, respectivamente. La prueba piloto mostró que la suspensión al 10 % del extracto etanólico blando de *Curcuma longa* L. y la suspensión al 10 % de extracto butanólico blando de *Curcuma longa* L. presentaron un efecto antiinflamatorio estadísticamente similar y mayor a la suspensión al 10 % del extracto blando de éter de petróleo. Sin embargo, el extracto etanólico fue elegido para las siguientes pruebas, debido a que presentó un mayor rendimiento y menor costo. El análisis fitoquímico preliminar estableció que el extracto blando etanólico de *Curcuma longa* L. presentó metabolitos secundarios: flavonoides, alcaloides, terpenos y curcuminoides (posiblemente curcumina). Se logró preparar un gel a partir del extracto blando etanólico, el cual exhibió un color amarillo-naranja, textura suave y un olor característico. El gel comercial (diclofenaco sódico 1 %), la suspensión al 10% de extracto blando etanólico y el gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. presentaron un efecto antiinflamatorio estadísticamente similar, a partir de la segunda hora de su aplicación.

Se concluye que la suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. y el gel a base del 10 % de este extracto, presentan un efecto antiinflamatorio similar al del gel comercial. Por lo que este gel podría ser utilizado como una alternativa natural en el tratamiento de la inflamación.

Palabras claves: Rizoma, cúrcuma, antiinflamatorio.

## ABSTRACT

Inflammation is a defense mechanism of the body to damage against its tissues and cells, which seeks to eliminate harmful stimuli and initiate the healing process, restoring its structure and normal functions. However, if the homeostatic balance of this biological process is altered, the inflammation can cause the appearance and worsening of the diseases. Thus, a wide variety of anti-inflammatory drugs has been developed, but they have many adverse effects. Because of this, there has emerged the need to look for new anti-inflammatory agents that have minimal adverse effects, such as medicinal plants.

The present work of investigation was realized in the laboratories of the Catholic University of Santa Maria; having as its main objective to evaluate the anti-inflammatory effect of extracts and gel of the rhizome of *Curcuma longa* L. (turmeric) in rats subjected to subplantar inflammation with carrageenan.

The rhizomes of *Curcuma longa* L. were collected from the community of Otilia, Tambopata district, department of Madre de Dios, Peru. Their classification and species were corroborated in the Herbarium Arequipense (HUSA) of the National University of San Agustín in Arequipa. Then, the rhizomes were then washed, dried and ground. Subsequently, the extraction was carried out by the Soxhlet method, with three solvents of different polarity: ethanol (polar), *n*-butanol (medium-polar) and petroleum ether (non-polar). The percentage extraction yield of these extracts was determined and a pilot test was performed to evaluate which of them presented a greater anti-inflammatory effect. The selected extract was subjected to a preliminary phytochemical analysis by thin layer chromatography and a gel was

prepared. Finally, the extract was evaluated whether to give a pharmaceutical form (gel) affected its anti-inflammatory effect and was compared with a commercial gel (diclofenac sodium 1% gel). The anti-inflammatory effect was evaluated by the plantar edema induced by carrageenan in male albino Wistar rats.

The three extracts of the rhizome of *C. longa* L. were obtained, with yield percentages of  $21.77 \pm 0.38\%$ ,  $15.60 \pm 0.46\%$  and  $1.32 \pm 0.12\%$ , for ethanolic, *n*-butanol and petroleum ether extracts, respectively. The pilot test showed that ethanolic and *n*-butanolic extracts had a statistically similar and higher anti-inflammatory effect to the petroleum ether extract. However, the ethanolic extract was chosen for the following tests, due to its higher yield and lower cost. Preliminary phytochemical analysis established that ethanolic extract of *Curcuma longa* L. presented secondary metabolites such as flavonoids, alkaloids, terpenes and curcuminoids (possibly curcumin). It was possible to prepare a gel of the ethanolic extract, which exhibited an orange-yellow color, a soft texture and a characteristic odor. The commercial gel, the 10% ethanolic extract and 10% gel of the rhizome of *C. longa* L. presented a statistically similar antiinflammatory effect, from the second hour of its application.

It is concluded that 10% ethanolic extract and 10% gel of the rhizome of *Curcuma longa* L. present an anti-inflammatory effect similar to the commercial gel and that the excipients used in the gel formulation do not alter its anti-inflammatory properties.

Keywords: Rhizome, turmeric, anti-inflammatory.

## INTRODUCCIÓN

La inflamación es una respuesta biológica compleja de los tejidos vasculares contra estímulos nocivos: patógenos, químicos o lesiones físicas. La inflamación se caracteriza por el aumento del movimiento del plasma y de las células del sistema inmune innato (neutrófilos y macrófagos) de la sangre a los tejidos lesionados. Los signos patrón de la inflamación se expresan por el aumento del flujo sanguíneo, metabolismo celular elevado, vasodilatación, liberación de mediadores solubles, extravasación de fluidos y afluencia celular.<sup>1</sup> Sin embargo, cuando hay pérdida del control homeostático de este proceso de defensa, la inflamación juega un papel perjudicial que contribuye a la aparición y el empeoramiento de las enfermedades.<sup>2</sup>

Debido a esto, se han desarrollado una gran variedad de fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos para tratar enfermedades inflamatorias. No obstante, el uso prolongado de estos medicamentos puede causar muchos efectos adversos sobre la mucosa gástrica, los riñones, los bronquios y el sistema cardiovascular.<sup>3</sup> Por esta razón, es importante buscar otros agentes terapéuticos más seguros y eficaces contra la inflamación. En este sentido, el uso de plantas medicinales con propiedades antiinflamatorias que presenten bajos efectos adversos, serían una buena estrategia terapéutica en el tratamiento de esta afección.<sup>4</sup>

La *Curcuma longa* L. (cúrcuma o palillo) es una planta perenne que pertenece a la familia *Zingiberaceae*. Esta planta ha sido utilizada ampliamente como medicina,

condimento y cosmético alrededor del mundo. La *Curcuma longa* L. es nativa del sudeste asiático, pero también se ha expandido en el Perú creciendo de forma semisilvestre en la selva alta y baja. La parte más utilizada de esta planta es su rizoma. Entre los principales compuestos bioactivos de este rizoma tenemos a los curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina, etc.) y sesquiterpenos (ar-turmerona,  $\beta$ -bisabolena,  $\alpha$ -curcumeno, zingibereno, curlona, etc.). Asimismo, el efecto antiinflamatorio de la *Curcuma longa* L. se atribuye principalmente a la curcumina y a la arturmerona (aceite esencial). Esto indica que la *Curcuma longa* L. podría ser utilizada como un agente terapéutico en contra de la inflamación.<sup>5</sup>

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo investigar el efecto antiinflamatorio de los extractos del rizoma de *Curcuma longa* L. y darle forma farmacéutica (gel) al extracto que exhiba mayor efecto antiinflamatorio, con la finalidad de encontrar una nueva alternativa terapéutica para el tratamiento de la inflamación.

## HIPÓTESIS

Dado que existen antecedentes en la medicina tradicional y en el campo científico que señalan las propiedades antiinflamatorias del rizoma de *Curcuma Longa* L. (palillo); es probable que la elaboración de un gel, a partir de un extracto de este material vegetal, presente un efecto antiinflamatorio sobre el edema plantar de ratas inducido por la carragenina.

## OBJETIVOS

1. Obtener y establecer el rendimiento de los extractos del rizoma de *Curcuma longa* L. con tres disolventes de diferente polaridad.
2. Determinar qué extracto blando del rizoma de *Curcuma longa* L. presenta un mayor efecto antiinflamatorio, utilizando una prueba piloto.
3. Identificar los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto blando del rizoma de *Curcuma longa* L. con mayor efecto antiinflamatorio, mediante cromatografía de capa fina.
4. Preparar un gel utilizando el extracto blando del rizoma de *Curcuma longa* L. con mayor efecto antiinflamatorio.
5. Comparar el efecto de la suspensión al 10 % de extracto blando y el gel al 10 % del extracto blando del rizoma de *Curcuma longa* L. con un gel comercial (diclofenaco sódico 1 %).

## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1. *Curcuma longa* Linn

##### 1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de la planta estudiada en el presente trabajo, según el Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS):<sup>6</sup>

- Reino: *Plantae*
- Subreino: *Viridiplantae*
- Infrarreino: *Streptophyta*
- Superdivisión: *Embryophyta*
- División: *Tracheophyta*
- Subdivisión: *Spermatophytina*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Superorden: *Liliana*
- Orden: *Zingiberales*
- Familia: *Zingiberaceae*
- Género: *Curcuma* Linn
- Especie: *Curcuma longa* Linn

##### 1.2. Sinonimia

###### 1.2.1. Sinonimia científica

*Amomum curcuma* Jacq., *Curcuma brog* Valetton, *Curcuma domestica* Valetton, *Curcuma ochrorhiza* Valetton, *Curcuma soloensis* Valetton, *Curcuma tinctoria* Guibourt, *Kua domestica* Medik. (illeg.), *Stissera curcuma* Raeusch.<sup>7</sup>

###### 1.2.2. Sinonimia vulgar

Cúrcuma, Palillo, Azafrán de la India, Terra Merita, Turmérico, Carmotillo, Jengibrillo.<sup>7</sup>

### 1.3. Descripción botánica

La *Curcuma longa* L. es una planta perenne, erecta, glabrosa, con una altura entre 0.6 a 1.0 m y forman aglomeraciones densas. Las hojas son grandes, alargadas, de color verde claro, presentan un tamaño de 30-40 cm de largo y 8-12 cm de ancho. El rizoma es robusto y ramificado con tubérculos cilíndricos y aromáticos, este puede ser de color naranja, rojo-naranja o amarillo-dorado. Las flores presentan un cáliz blanco puberulento, una corola blanca a blanca-amarillenta y se agrupan en espigas basales por medio de brácteas violetas. El fruto es una cápsula elipsoide con semillas ariladas.<sup>7,8</sup> La **Fig. 1** muestra las características morfológicas de la *Curcuma longa* L.



**Figura 1.** *Curcuma longa* L.<sup>9</sup>

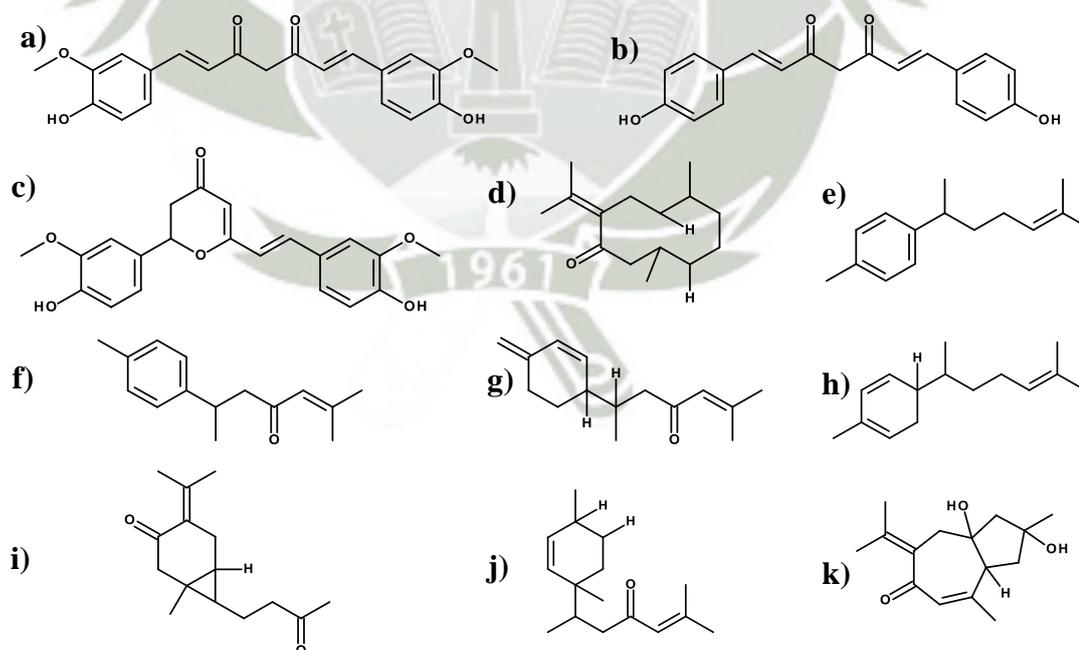
### 1.4. Origen y distribución geográfica

La *Curcuma longa* L. es nativa del sudeste asiático y ha sido cultivada hace varios siglos. Actualmente, se cultiva de forma extensa en Asia Tropical y en algunas zonas de África.<sup>7</sup> Además, se ha visto su expansión a Latinoamérica, en el Perú crece de forma semisilvestre en la selva alta y baja.<sup>10</sup> Esta planta se desarrolla

en un clima tropical cálido y húmedo con altas precipitaciones anuales de 1500-2000 L/m<sup>2</sup> y a temperaturas de 18-30 °C.<sup>7</sup>

### 1.5. Descripción fitoquímica

Se han caracterizado varias clases de metabolitos secundarios presentes en la *Curcuma longa* L. Se encontró que los rizomas contienen curcuminoides, tales como curcumina, demetoxicurcumina, bis-demetoxicurcumina, ciclocurcumina, 5'-metoxicurcumina y dihidrocurcumina. Además, muchos sesquiterpenos han sido aislados de los rizomas, entre los cuales tenemos: germacrona, arturmerona,  $\beta$ -bisabolona,  $\alpha$ -curcumeno, zingibereno, curlona,  $\beta$ -sesquifelandreno, bisacurona,  $\beta$ -atlantona, curcumenona, deshidrocurdinona, procurcumadiol, bisacumulol, curcumenol, isoprocurcumenol, epiprocurcumenol, zedoaronediol, turmeronoles A y B. Asimismo, se han reportado esteroides en los rizomas: estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol. También, se ha encontrado antraquinonas como la 2-hidroximetil-antraquinona. El aceite esencial de los rizomas de esta planta contiene compuestos como  $\alpha$ -felandreno, sabineno, cineol, borneol y sesquiterpenos con esqueleto de turmeronas.<sup>11,12</sup> En la **Fig. 2** se muestran las estructuras químicas de algunos de estos metabolitos secundarios.



**Figura 2.** Estructuras químicas de metabolitos secundarios importantes en la *Curcuma longa* L. **a)** curcumina, **b)** bis-demetoxicurcumina, **c)** ciclocurcumina, **d)** germacrona, **e)**  $\alpha$ -curcumeno **f)** arturmerona, **g)** curlona, **h)** zingibereno, **i)** curcumenona, **j)** bisacurona, **k)** procurcumadiol.<sup>11,12</sup>

## 1.6. Usos y propiedades farmacológicas

En cuanto a sus usos alimenticios, la cúrcuma es un pigmento dietético y especia natural, que se utiliza ampliamente en la preparación de comidas, para mejorar su sabor y color.<sup>13</sup> Por otro lado, el rizoma de esta planta también se utiliza como un tinte para colorear cuero curtido, tela de algodón, hilo y fibras a un amarillo-dorado.<sup>11</sup>

El rizoma de la cúrcuma ha sido utilizado ampliamente en la medicina tradicional para tratar afecciones sanguíneas, hepáticas, estomacales, biliares, reumáticos, artríticas, musculares, anorexia, tos, anemia, ascitis, úlceras, flatulencia, heridas diabéticas y sinusitis.<sup>8,14</sup> Asimismo, existen estudios que han reportado que la *Curcuma longa* L. y sus curcuminoides, especialmente la curcumina, exhibe una diversa gama de propiedades farmacológicas: antioxidante, antiinflamatorio, antibacteriano, antifúngico, antitumoral, anticancerígeno, antialérgico, antitrombótico, citotóxico, antiangiogénico, antiaterosclerótico, antinociceptivo, hipolipidémico, nematocida, antiapoptótico, antiaterogénico, cardioprotector, antidiabético, hepatoprotector, neuroprotector, antirreumático, antiviral, antiparasitario y antiespasmódico.<sup>7,11</sup>

## 2. Inflamación

### 2.1. Concepto

La palabra inflamación deriva del latín *inflammare*, que significa «prender fuego».<sup>15</sup> La inflamación es la respuesta biológica compleja del organismo (respuestas vasculares y celulares) al daño de sus tejidos y células, provocado por estímulos nocivos como patógenos, químicos o lesiones físicas. Además, la inflamación es un proceso de protección del organismo, que busca eliminar los estímulos perjudiciales e iniciar el proceso de curación, restaurando su estructura y sus funciones normales.<sup>16</sup>

## 2.2. Diagnóstico

La inflamación en cualquier parte del cuerpo, provoca una liberación adicional de proteína que circula en el torrente sanguíneo. Para detectar este aumento en la proteína comúnmente se utiliza análisis, como la tasa de sedimentación eritrocítica, la proteína C-reactiva y la viscosidad del plasma; por lo tanto, estos son marcadores de la inflamación. Solo el correcto diagnóstico aliviará la inflamación, mientras que la evasión o el diagnóstico incorrecto pueden provocar condiciones más graves como la gangrena.<sup>17</sup>

## 2.3. Causas y asociaciones

Las principales causas de la inflamación pueden ser agentes patógenos, estímulos físicos y agentes químicos. La inflamación está presente en pacientes con infecciones bacterianas, virales, fúngicas o parasitarias; anafilaxia; enfermedades ambientales relacionadas con la inhalación de humo y la exposición al asbesto; artritis reumatoide; enfermedades autoinmunes y enfermedades intestinales; enfermedades endocrinológicas o autoinmunes; enfermedades crónicas como la diabetes.<sup>17</sup>

Además, en las últimas tres décadas, también se ha puesto de manifiesto que una variedad mucho mayor de enfermedades tiene evidencia celular y molecular reveladora de inflamación. Estos incluyen insuficiencia arterial y venosa crónica, isquemia miocárdica, accidente cerebrovascular agudo, enfermedad de Alzheimer, hipertensión arterial, cáncer y osteoartritis. Una forma severa de inflamación se observa en el síndrome de disfunción multiorgánica. Hay signos de inflamación en pacientes con depresión, incluso sin síntomas manifiestos de inflamación o simplemente exposición a riesgos ambientales. La lista de enfermedades que están asociadas con marcadores moleculares de la inflamación es grande y sigue creciendo.

Asimismo, existen estudios clínicos que relacionan a la inflamación con la obesidad y la falta de ejercicio regular (moderado, pero no excesivo). Por otro lado, la inflamación puede ocurrir debido a quemaduras, compuestos químicos,

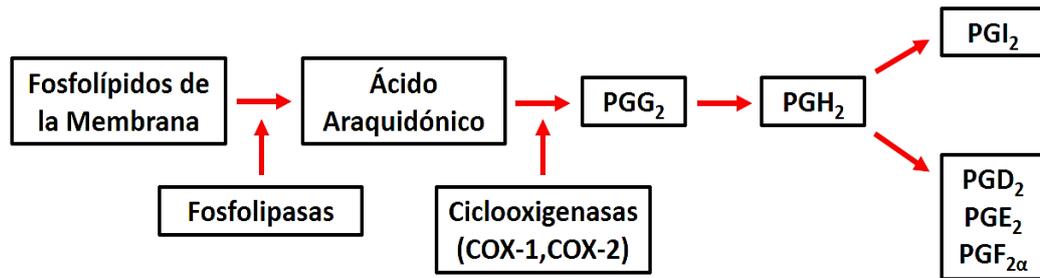
congelación, toxinas, lesiones físicas, hipersensibilidad, radiación ionizante, estrés y alcohol.<sup>18</sup>

## 2.4. Mecanismo de acción

### 2.4.1. Inicio de la respuesta inflamatoria

#### 2.4.1.1. Vasodilatación

La vasodilatación es una característica clásica de la inflamación y se manifiesta clínicamente por el enrojecimiento y el calor en el sitio de la lesión. El propósito de la respuesta vasodilatadora es facilitar la acción local de los mediadores solubles y las células inflamatorias. La vasodilatación inducida por la inflamación, está mediada principalmente por el óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas vasodilatadoras. El NO se produce a partir de L-arginina a través de la acción de óxido nítrico sintetasa (NOS). Se han identificado tres isoformas de NOS. La NOS endotelial (eNOS) y la NOS neuronal (nNOS) se producen constitutivamente, y su expresión se incrementa mediante el flujo de calcio. Los leucocitos activados producen NOS inducible (iNOS) después de la exposición a productos microbianos o citocinas proinflamatorias. El NO provoca la relajación muscular lisa subsecuente a través de la formación de GMP cíclico dependiente. Las prostaglandinas vasodilatadoras primarias son la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2α</sub>. Estos mediadores lipídicos se producen a partir del ácido araquidónico a través de la acción de la ciclooxigenasa, este proceso se muestra en la **Fig. 3**. La vasodilatación inducida por la inflamación inicialmente involucra arteriolas seguidas por la apertura de nuevos lechos microvasculares. En los casos de inflamación sistémica grave como la sepsis, la vasodilatación generalizada puede causar hipotensión sistémica y shock.<sup>19</sup>



**Figura 3.** Producción de prostaglandinas vasodilatadoras a través de las acciones de las fosfolipasas y ciclooxygenasas. COX, ciclooxygenasa; PG, prostaglandina.<sup>20</sup>

#### 2.4.1.2. Formación del edema

Otro signo temprano de la inflamación es la formación del edema. El edema es causado por el flujo transvascular de un fluido rico en proteínas, que va desde el compartimento intravascular hacia el intersticio, como resultado de las acciones de la histamina, la bradicinina, los leucotrienos, los componentes del complemento, la sustancia P y el factor activador de plaquetas. Estos factores alteran marcadamente las funciones de barrera de los vasos sanguíneos pequeños y aumentan la permeabilidad de los capilares y las vénulas, tanto para el agua como para las proteínas. Al mismo tiempo, la presión hidrostática capilar se incrementa en el sitio de la lesión durante la inflamación o como resultado de la vasodilatación local.<sup>21</sup>

#### 2.4.1.3. Migración de leucocitos

Los neutrófilos son los primeros y más abundantes leucocitos que se dirigen al sitio de inflamación. El proceso de migración de neutrófilos desde el espacio intravascular hacia el intersticio inflamado ocurre principalmente en las vénulas poscapilares en la circulación sistémica y en los capilares pulmonares en el pulmón.<sup>22</sup>

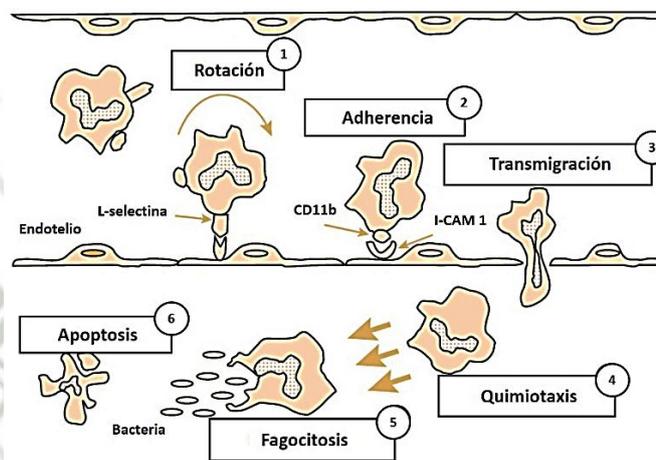
El fenómeno de la migración se divide en las siguientes fases: marginación, rotación, adhesión, diapédesis y quimiotaxis. Estas fases se ilustran en la **Fig. 4**. La marginación es el proceso de movimiento de los neutrófilos desde el torrente sanguíneo central hasta la periferia del vaso. Después de la marginación, se desarrolla una interacción adhesiva débil entre los neutrófilos y las células endoteliales vasculares, causando que los neutrófilos permanezcan

cerca del endotelio vascular. La rotación de los neutrófilos se ve facilitada por el esfuerzo que ejercen los eritrocitos al pasar.<sup>23</sup> Las interacciones adhesivas que permiten la rotación de los leucocitos son facilitadas por selectinas y sus ligandos. A medida que la rotación avanza, se desarrolla una interacción de alta afinidad conocida como adherencia. La adherencia es necesaria para la posterior diapédesis y quimiotaxis de los neutrófilos, y está mediada por la acción de las integrinas y sus ligandos. Las integrinas son una familia de proteínas heterodiméricas compuestas de subunidades alfa y beta. Estas moléculas están compuestas de distintas subunidades alfa (CD11a, CD11b, CD11c) que están unidas a una subunidad beta común (CD18). Las integrinas beta 2 se expresan en la superficie de neutrófilos e interactúan con los ligandos, particularmente la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), que están presentes en la membrana celular endotelial. Estas interacciones causan una fuerte adherencia en los neutrófilos al endotelio, facilitando la diapédesis y la quimiotaxis.<sup>24</sup>

Después de la adherencia, el neutrófilo debe penetrar el endotelio y la membrana basal para entrar en el ambiente inflamatorio extravascular. Además, las moléculas de adhesión, tales como la molécula de adhesión de células endoteliales/plaquetas, facilitan la diapédesis (paso de los elementos formes de la sangre (p. ej., leucocitos) a través de los vasos capilares, para dirigirse al foco de infección o lesión sin que se produzca alteración capilar). La unión de la molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial 1 (PECAM-1) disminuye la adhesión de los neutrófilos a la ICAM-1, lo que resulta en la inhibición de la adherencia y la promoción de la diapédesis. Los procesos de rotación, adherencia y diapédesis están mediados por interacciones complejas entre las moléculas de adhesión en los neutrófilos y las células endoteliales. El objetivo final de estas interacciones es facilitar la migración de neutrófilos desde el compartimento intravascular hacia el intersticio en los sitios de la lesión.<sup>25</sup>

Los neutrófilos y otros leucocitos también requieren quimioatrayentes para facilitar su migración a los sitios de la lesión. Los quimioatrayentes son moléculas solubles, como subproductos bacterianos, componentes del complemento y citocinas quimioatrayentes (quimiocinas) que sirven para atraer

leucocitos a los tejidos lesionados. Entre los principales quimioatrayentes tenemos a los péptidos N-formilados producidos por bacterias, componentes del complemento y leucotrienos. Las quimiocinas son productos leucocitarios que también sirven para atraer leucocitos a los tejidos. Entre estas quimiocinas tenemos a la interleucina 8 (IL-8), que es un potente quimioatrayente para los neutrófilos. Las quimiocinas sirven de mediadores en la respuesta proinflamatoria de una lesión o infección.<sup>26</sup>



**Figura 4.** Mecanismo de migración de los neutrófilos en el proceso de inflamación.<sup>27</sup>

#### 2.4.1.4. Activación de la cascada de coagulación durante la inflamación

La inflamación y la coagulación están íntimamente relacionadas. La cascada de coagulación se activa durante la lesión tisular y durante la infección. Se divide en dos vías que convergen y en última instancia causan la activación de la trombina con la subsecuente división del fibrinógeno en fibrina. La vía intrínseca es una serie de proteínas plasmáticas que son activadas por el factor Hageman (factor XII), una proteína sintetizada en el hígado que se activa mediante la unión a colágeno, membrana basal o plaquetas activadas. El factor Hageman inicia la activación de una cascada de proteínas, dando como resultado la formación de trombina. La vía intrínseca comúnmente es activada por traumatismos directos en los tejidos.<sup>28</sup>

Por otro lado, la vía extrínseca se inicia por la producción del factor tisular. La vía extrínseca es la vía de coagulación primaria activada durante la

infección y la inflamación sistémica, particularmente durante la sepsis y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. El factor tisular se expresa en las superficies de los tejidos que normalmente no están expuestas al compartimento vascular, tales como los tejidos subcutáneos y la capa adventicia de los vasos sanguíneos. Además, las células endoteliales y los monocitos activados producen factor tisular durante los períodos de inflamación en respuesta al factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $\text{TNF}_\alpha$ ), IL-1, IL-6 y proteína C-reactiva. La presencia de factor tisular provoca la activación del factor VII, el cual forma un complejo con el factor tisular y provoca la formación de trombina.<sup>29</sup>

La activación de la cascada de coagulación no solo es importante en la formación de coágulos de fibrina, sino que también tiene efectos importantes sobre la respuesta proinflamatoria. Se ha demostrado que el factor Xa, la trombina y el complejo del factor tisular VIIa provocan actividad proinflamatoria. Específicamente, la trombina y el complejo del factor tisular VIIa pueden inducir la producción de citocinas proinflamatorias, tales como  $\text{TNF}_\alpha$  por células mononucleares y endoteliales. Por lo tanto, la inflamación provoca la activación de la cascada de coagulación, que puede potenciar aún más la respuesta inflamatoria.<sup>30</sup>

#### **2.4.1.5. Sistema del complemento**

El sistema del complemento es una serie de proteínas que son activadas por los microbios y sirven para promover la inflamación y la destrucción microbiana. Es probable que la cascada del complemento también se active durante la lesión tisular y juegue un papel en la lesión celular asociada con traumatismos y quemaduras mayores. La cascada del complemento se activa de tres maneras; los anticuerpos IgM o IgG que están unidos a la superficie de los microbios u otras estructuras activan la vía clásica; la vía alternativa se activa directamente por moléculas de superficie microbiana que se unen al componente C3 del complemento y sirven como una plataforma para la activación de las proteínas del complemento; la vía lectina es activada por la lectina de unión a manosa, que interactúa con glicoproteínas microbianas y glicolípidos.<sup>31</sup>

## **2.4.2. Amplificación de la respuesta inflamatoria**

### **2.4.2.1. Sistema inmunitario innato**

El sistema inmunitario innato realiza la respuesta inicial a la invasión de tejido. Las fases previamente discutidas de vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular e infiltración celular son parte de la respuesta inmune innata. Los componentes celulares primarios de este sistema son macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales y neutrófilos. Además de estos componentes celulares, las proteínas efectoras circulantes como el complemento, los reactantes de fase aguda y la cascada de la coagulación juegan un papel importante en la inmunidad innata.<sup>32</sup>

La actividad de citocinas y mediadores no citocinas de la inflamación determina en gran medida la magnitud de la respuesta innata. Las citocinas son polipéptidos que son producidos por las células del sistema inmune en respuesta a la infección o lesión tisular. Sirven para regular las reacciones inmunitarias e inflamatorias. La producción de citocinas es generalmente autolimitada, aunque algunas citocinas pueden persistir en la circulación por largos períodos de tiempo. También existe redundancia entre citocinas. Los ejemplos más conocidos son  $TNF_{\alpha}$  e IL-1. Ambas citocinas tienen la capacidad de inducir fiebre, estimular la producción de proteínas de la fase aguda por el hígado y causar la activación de células endoteliales. Las citocinas son por lo tanto grupos multifuncionales de proteínas que frecuentemente tienen funciones superpuestas. Por esta razón, el bloqueo de una sola citocina tendría a menudo efectos limitados sobre la respuesta inflamatoria global.<sup>20</sup>

### **2.4.2.2. Sistema inmunitario adquirido**

La respuesta inmune innata también sirve para activar y amplificar la inmunidad adquirida. Este efecto es mediado principalmente por la IL-12. La respuesta inmune adaptativa es inducida principalmente por la presentación de

antígenos extraños a las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La activación de estas células provoca una mayor producción de citocinas y amplifica los sistemas inmune innato y adquirido. La citocina primaria producida por las células T es el interferón gamma (IFN $\gamma$ ). El IFN $\gamma$  amplifica la respuesta proinflamatoria causando la activación de los macrófagos y estimulando las funciones citolíticas de las células T CD8<sup>+</sup><sup>33</sup>.

## 2.5. Mediadores de la inflamación

Existen varios mediadores de la inflamación (derivados de células o derivados del plasma), los cuales son liberados en el momento de la lesión tisular. Estos mediadores tienen un tiempo de vida relativamente corto o son inhibidos por mecanismos intrínsecos, desactivando efectivamente la respuesta y permitiendo que el proceso se resuelva. Los mediadores derivados de células como la histamina, la serotonina, las prostaglandinas, los leucotrienos y el factor de activador de plaquetas se liberan en el sitio de la inflamación, mientras que los mediadores derivados del plasma se generan en su mayor parte en el hígado y circulan en el plasma.<sup>17</sup>

### 2.5.1. Mediadores derivados de células

#### 2.5.1.1. Histamina

La histamina (2-[4-imidazol] etilamina) es una amina biogénica formada por la descarboxilación del aminoácido histidina por la enzima L-histidina descarboxilasa, que se almacena en gránulos de mastocitos y basófilos. La liberación de histamina se inicia por un aumento del Ca<sup>+2</sup> citosólico. Los agentes que aumentan la formación de adenosina monofosfato cíclico (AMP<sub>c</sub>), por ejemplo, los agonistas de  $\beta$ -adrenérgicos, inhiben la secreción de histamina. La histamina causa la vasodilatación y aumenta la permeabilidad y la formación de la abertura endotelial. Asimismo, la liberación de citocinas, principalmente la interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) por los macrófagos y otros tipos de células, desencadena la liberación de las aminas biógenas. La

histamina es un mediador bien conocido involucrado en la anafilaxia y causa del edema severo, el prurito y el broncoespasmo.<sup>34</sup>

#### **2.5.1.2. Serotonina**

La serotonina (5-hidroxitriptamina) causa vasoconstricción en la mayoría de las especies animales. Esta está formada por la descarboxilación del triptófano y se almacena en gránulos secretores. Su degradación se produce principalmente por la monoamino oxidasa, formando ácido 5-hidroxiindoleacético, que se excreta en la orina y sirve como un indicador de la producción de la serotonina en el cuerpo. La serotonina se deriva de los mastocitos y se encuentra en el suero después de la coagulación de sangre, en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso central (SNC). La serotonina funciona como neurotransmisor y como hormona local en el sistema vascular periférico. En la sangre, está presente en las plaquetas en altas concentraciones y en el SNC, está presente en región localizada del mesencéfalo. La serotonina provoca un aumento de la motilidad gastrointestinal, la contracción del músculo liso, la agregación plaquetaria, la excitación/inhibición del sistema nervioso central y la estimulación de las terminaciones nociceptivas periféricas.<sup>35</sup>

#### **2.5.1.3. Adenosina**

La adenosina (2-(6-aminopurin-9-il)-5(hidroximetil) oxolano-3,4-diol) es un nucleósido de purina que se produce por la desfosforilación de 5'-AMP por la enzima 5'-nucleotidasa. Este mediador se encuentra en forma libre en el citosol de todas las células. La mayoría de las células son capaces de producir adenosina en casos de déficit energético. La adenosina puede ser liberada por el tejido pulmonar en casos de hipoxia, como se da después de la broncoconstricción inducida por alérgenos. La adenosina provoca vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, estimulación de las neuronas aferentes nociceptivas, liberación de mediadores de mastocitos e inhibición de la migración de eosinófilos.<sup>36</sup>

#### **2.5.1.4. Prostanoides**

Los prostanoideos se generan a partir del ácido araquidónico por la ciclooxigenasa (COX), la cual es de dos tipos: COX-1 y COX-2. Los prostanoideos incluyen a las prostaglandinas (PG) y al tromboxano (TX). El ácido araquidónico juega un papel central en la inflamación relacionada con lesiones y muchos estados patológicos. La COX-1 está presente en la mayoría de las células como una enzima constitutiva que produce prostanoideos que actúan como reguladores homeostáticos, mientras que la COX-2 es inducible por estímulos inflamatorios, como la endotoxina y las citocinas proinflamatorias. Ambas enzimas catalizan la incorporación de dos moléculas de oxígeno por cada molécula de araquidonato, formando los endoperóxidos altamente inestables: prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) y prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Estas se transforman rápidamente a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), que son productos finales bioactivos de esta reacción.<sup>37</sup>

La PGE<sub>2</sub> provoca la contracción de los músculos lisos bronquiales, gastrointestinales, intestinales y la inhibición de la secreción de ácido gástrico. La PGD<sub>2</sub> provoca vasodilatación, relajación del músculo gastrointestinal y uterino, inhibición de la agregación plaquetaria y liberación de las hormonas pituitarias. PGF<sub>2α</sub> provoca contracción miometrial, luteólisis y broncoconstricción. La PGI<sub>2</sub> causa vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, liberación de renina y la natriuresis a través de los efectos sobre la reabsorción tubular de Na<sup>+</sup>. El TXA<sub>2</sub> causa vasoconstricción, agregación plaquetaria y broncoconstricción. En las zonas de inflamación aguda, la PGF<sub>2</sub> y la PGI<sub>2</sub> son generadas por los tejidos locales y los vasos sanguíneos, mientras que los mastocitos liberan principalmente PGD<sub>2</sub>. En la inflamación crónica, los macrófagos también liberan PGE<sub>2</sub> y TXA<sub>2</sub>.<sup>17</sup>

#### 2.5.1.5. Leucotrienos

Los leucotrienos (LT) se sintetizan a partir del ácido araquidónico por vías catalizadas por la lipoxigenasa. Los leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>,

constituyen la mezcla biológica previamente conocida como sustancia de reacción lenta de la anafilaxia. Los leucotrienos son generados por la mayoría de los tipos de células que participan en las reacciones inflamatorias incluyendo mastocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos. Como mediadores químicos de la inflamación, tienen actividad biológica similar a la histamina.<sup>34</sup>

#### **2.5.1.6. Factor activador de plaquetas**

El factor activador de plaquetas (FAP) es un lípido biológicamente activo que puede producir efectos en concentraciones extremadamente bajas. Se cree que es un mediador importante en los procesos alérgicos e inflamatorios. El FAP se biosintetiza a partir de acil-FAP. La acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) sobre el acil-FAP produce liso-FAP, el cual es acilado para dar el FAP. Grandes cantidades del FAP pueden ser sintetizadas por varios tipos de células inflamatorias en el pulmón, incluyendo células residentes, tales como mastocitos y macrófagos alveolares. El FAP produce vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis de neutrófilos y monocitos, urticaria y recluta eosinófilos en la mucosa bronquial en la fase tardía del asma. Además, puede activar a la PLA<sub>2</sub> e iniciar la síntesis de eicosanoides.<sup>38</sup>

#### **2.5.1.7. Endotelinas**

Las endotelinas (ET) son potentes péptidos constrictores que se describieron originalmente como vasoconstrictores liberados de las células endoteliales. Existen tres endotelinas conocidas: ET<sub>1</sub>, ET<sub>2</sub> y ET<sub>3</sub>. Las ET pueden aumentar la liberación de mediadores inflamatorios de una gran variedad de células. La ET<sub>1</sub> aumenta la liberación de mediadores lipídicos de la mucosa nasal; y aumenta la formación de superóxido y la liberación del TNF<sub>α</sub> en los macrófagos alveolares. Además, la ET<sub>1</sub> estimula la secreción de colágeno de los fibroblastos pulmonares; por lo tanto, participa en la abundante formación de colágeno en las vías respiratorias asmáticas.<sup>17</sup>

## 2.5.2. Mediadores derivados del plasma

### 2.5.2.1. Bradicinina

Las bradicininas son péptidos activos formados por la escisión proteolítica de las proteínas circulantes denominadas cininógenos, a través de distintas proteasas. Hay dos receptores de bradicinina: B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>. Los receptores B<sub>1</sub> se expresan normalmente a niveles muy bajos, pero son fuertemente inducidos en tejidos inflamados o dañados por citocinas, tales como la IL-1. La bradicinina causa vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Además, es un potente agente productor de dolor y su acción es potenciada por las prostaglandinas. La bradicinina también tiene acciones espasmogénicas en el músculo liso del intestino, útero y bronquios. Fisiológicamente, la liberación de bradicinina por la calicreína tisular puede regular el flujo sanguíneo a ciertas glándulas exocrinas e influir en las secreciones.<sup>39</sup>

### 2.5.2.2. Citocinas

La citocina es un término funcional de uso múltiple que se aplica a los mediadores de proteínas o polipéptidos sintetizados y liberados por las células del sistema inmune durante la inflamación. La familia de las citocinas comprende: interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimulantes de colonias, factores de crecimiento y factores de necrosis tumoral. Las quimiocinas se definen como citocinas quimioattractivas que controlan la migración de leucocitos, por medio de un lenguaje de señalización complejo. El TNF $\alpha$  y la IL-1 son citocinas inflamatorias primarias que participan en reacciones inflamatorias agudas y crónicas, así como en la reparación y resolución. El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), IL-4, IL-10 e IL-13 son citocinas antiinflamatorias que inhiben la producción de las quimiocinas.<sup>34</sup>

## 2.6. Células inflamatorias

### 2.6.1. Mastocitos

Los mastocitos son una importante fuente de mediadores proinflamatorios y citocinas que pueden promover la inflamación y cambios vasculares. Las principales sustancias que liberan los mastocitos son la histamina, la heparina, los leucotrienos, el factor activador de plaquetas, el factor de crecimiento nervioso y algunas interleucinas. Por lo tanto, se considera que estas células participan en la reparación de los tejidos.<sup>40</sup>

### **2.6.2. Leucocitos polimorfonucleares**

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) son las tropas de choque de la inflamación y son los primeros leucocitos en entrar al área inflamada. Los PMN son los neutrófilos, los eosinófilos y los basófilos. Estos leucocitos contienen muchas sustancias en sus gránulos como la proteasa, la mieloperoxidasa, la lisozima y la fosfatasa alcalina. Los neutrófilos pueden engullir, matar y digerir microorganismos generando productos tóxicos de oxígeno y digestión enzimática. Cuando los neutrófilos han liberado sus productos químicos tóxicos, sufren apoptosis y deben ser eliminados por los macrófagos. Los eosinófilos actúan en la patogénesis del asma donde sus proteínas granulares causan daño al epitelio bronquial. El número de eosinófilos aumenta en condiciones como alergia, infecciones parasitarias, enfermedades de la piel y ciertos linfomas. Los basófilos se encuentran en ciertas infecciones parasitarias y reacciones de hipersensibilidad.<sup>40</sup>

### **2.6.3. Monocitos y Macrófagos**

Los monocitos son los precursores circulantes de los macrófagos tisulares. Los monocitos llegan a las lesiones inflamatorias varias horas después de los PMN. Asimismo, los macrófagos activados liberan muchas sustancias como la colagenasa, la elastasa, el factor activador del plasminógeno, los productos del complemento, el factor de coagulación, la IL-1, el TNF y los radicales libres derivados del oxígeno; que actúan sobre las células endoteliales vasculares. Además, atraen a otros leucocitos y dan lugar a manifestaciones sistémicas de la

respuesta inflamatoria como la fiebre. Los macrófagos engullen restos de tejido y células muertas, matando a la mayoría de los microorganismos.<sup>40</sup>

#### **2.6.4. Linfocitos**

Los linfocitos son parte integral del desarrollo de la respuesta inmune innata y adquirida. Una función importante de los linfocitos es generar respuestas inmunes adquiridas y desarrollar un compartimento de memoria para futuras respuestas. Los linfocitos innatos sirven como células centinelas en tejidos epiteliales asociados, promoviendo la liberación inmediata de citocinas que ayudan a formar la respuesta adquirida. Los linfocitos ayudan en la defensa contra los patógenos y suscitan el proceso alérgico. Muchos linfocitos pueden participar en la inflamación alérgica incluyendo: células T, células B y células asesinas naturales (NK).<sup>40</sup>

#### **2.6.5. Células endoteliales vasculares**

Las células endoteliales vasculares juegan un papel importante en la inflamación; estas células secretan óxido nítrico, causando relajación del músculo liso, vasodilatación y aumento del suministro de plasma y células sanguíneas en el área inflamada. Las células endoteliales regulan la exudación plasmática y el suministro de mediadores derivados del plasma y expresan una variedad de receptores, incluyendo los de la histamina, la acetilcolina e IL-1.<sup>40</sup>

#### **2.6.6. Plaquetas**

Las plaquetas están principalmente implicadas en la coagulación y en los fenómenos trombóticos, pero también juegan un papel importante en la inflamación. Estas pueden generar radicales libres y proteínas catiónicas proinflamatorias además del tromboxano A<sub>2</sub> y el factor activador de plaquetas. Tienen receptores de baja afinidad para la IgE y se cree que contribuyen a la primera fase del asma.<sup>17</sup>

#### **2.6.7. Neuronas**

Algunas neuronas sensoriales liberan neuropéptidos inflamatorios y presentan receptores específicos en sus terminales periféricos. Las quininas, la 5-hidroxitriptamina y otros mediadores químicos generados durante la inflamación actúan sobre estos receptores, estimulando la liberación de neuropéptidos, tales como la neuroquinina A, la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina.<sup>17</sup>

## **2.7. Tipos de inflamación**

En términos generales, la inflamación es de dos tipos: aguda y crónica. La inflamación aguda persiste durante un corto tiempo (horas o días), y el proceso es iniciado por células como macrófagos, células dendríticas, histiocitos, células de Kupffer y mastocitos. Por otro lado, en la inflamación crónica, el proceso inflamatorio persiste durante un período más largo de tiempo y generalmente está acompañada por granulación tisular y fibrosis.<sup>17</sup>

### **2.7.1. Inflamación aguda**

La inflamación aguda es la respuesta inicial del sistema inmunitario contra patógenos y lesiones en los tejidos que se caracterizan por isquemia, alteración metabólica y daño de la membrana celular. Es un proceso de autolimitación rápido, mediado por eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) y aminas vasoactivas, seguido de eventos vasculares y celulares que aumentan el movimiento del plasma y leucocitos en el sitio afectado. La fase proliferativa de la inflamación conduce a la formación de tejido granular, que dura 6-8 semanas. La fase final de la inflamación aguda, está dada por la cicatrización. Durante esta etapa, la actividad celular disminuye y la organización de la matriz extracelular aumenta. Varias afecciones inflamatorias son el resultado de una inflamación aguda; por ejemplo, síndrome de dificultad respiratoria aguda, rechazo agudo transitorio, asma, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, choque séptico y vasculitis.<sup>17</sup>

### **2.7.2. Inflamación crónica**

La inflamación crónica es una inflamación de duración prolongada (varios meses a años). La inflamación crónica puede surgir debido a infecciones persistentes por microbios como el *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum* y ciertos virus y hongos. Estos microorganismos provocan una respuesta inmune mediada por linfocitos T, llamada hipersensibilidad retardada. La autoinmunidad también juega un papel importante en varias enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal y la psoriasis. La inflamación crónica también se relaciona con algunas enfermedades como la enfermedad de Alzheimer, la aterosclerosis, el síndrome metabólico, la diabetes tipo 2 y algunas formas de cáncer. La exposición prolongada a la sílice conduce a la silicosis, una afección inflamatoria crónica.<sup>41</sup>

## **2.8. Tratamiento**

### **2.8.1. Fármacos antiinflamatorios**

Los fármacos antiinflamatorios incluyen a los antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (también llamados AINE). Generalmente, se usan para aliviar síntomas clínicos, tales como la inflamación, la hinchazón, la rigidez y el dolor.<sup>41</sup>

#### **2.8.1.1. Antiinflamatorios esteroideos**

Los fármacos antiinflamatorios esteroideos como los glucocorticoides son hormonas producidas naturalmente por la glándula suprarrenal con una variedad de importantes actividades fisiológicas dentro del cuerpo. En los seres humanos, el glucocorticoide natural es la hidrocortisona (cortisol), que se sintetiza a partir de su precursor cortisona. Estos son prescritos principalmente para el tratamiento de enfermedades, tales como insuficiencia suprarrenal, artritis, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, rechazo de trasplante y enfermedad de injerto contra huésped. Se han desarrollado varios glucocorticoides sintéticos (betametasona, dexametasona, prednisona, prednisolona, etc.) mucho más potentes que el cortisol y sin los efectos secundarios de los mineralocorticoides (aldosterona). El mecanismo de acción de estos fármacos está dado por su interacción con receptores intracelulares específicos de glucocorticoides. Su efecto predominante es desactivar múltiples

genes inflamatorios (que codifican citocinas, quimiocinas, enzimas inflamatorias, receptores y proteínas) que se han activado durante el proceso inflamatorio. En concentraciones más altas tienen efectos adicionales sobre la síntesis de proteínas antiinflamatorias y efectos posgenómicos. Por desgracia, el uso a largo plazo de glucocorticoides está asociado con efectos secundarios muy graves, incluyendo obesidad, hiperlipidemia, hiperglucemia, inmunosupresión, psicosis, hipertensión, etc.<sup>42</sup>

### **2.8.1.2. Antiinflamatorios no esteroideos**

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) comparten acciones terapéuticas que incluyen actividades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas a pesar de las diferencias en sus estructuras químicas. Existen dos clases de AINE, los AINE clásicos (aspirina, ibuprofeno, naproxeno, ketorolaco, etc.) y los inhibidores de ciclooxigenasa 2 (COX-2) (celecoxib, rofecoxib, meloxicam, etc.). Todos los AINE clásicos actúan como inhibidores no selectivos de la enzima ciclooxigenasa, ya que son capaces de inhibir tanto a la COX-1 como a la COX-2, con un efecto predominante sobre COX-1, mientras que los inhibidores de COX-2 se unen selectivamente a la COX-2. Tanto la COX-1 como la COX-2 son capaces de catalizar el ácido araquidónico, dando como resultado la síntesis de prostaglandinas (PG) incluyendo PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, prostaciclina, PGF<sub>2α</sub> y tromboxano. Las PG regulan diversos procesos fisiopatológicos, tales como la reacción inflamatoria y la citoprotección gastrointestinal. Los AINE alivian el dolor y la inflamación al contrarrestar la actividad de las COX, inhibiendo así las prostaglandinas y reduciendo o eliminando así la inflamación y el dolor. Sin embargo, los AINE presentan varios efectos adversos, particularmente en el tracto gastrointestinal, pero también en el hígado, el riñón, el bazo, la sangre y la médula ósea. Debido a que las prostaglandinas están implicadas en la citoprotección gástrica, la agregación plaquetaria, la autorregulación vascular renal y la inducción del trabajo de parto. Los fármacos selectivos de la COX-2 presentan menos toxicidad gastrointestinal, pero no despreciable.<sup>41</sup>

### 2.8.2. Plantas medicinales antiinflamatorias

Como se mencionó en la sección anterior, los fármacos antiinflamatorios presentan una variedad de efectos adversos; es por ello, que la identificación de sustancias que pueden promover la resolución de la inflamación de forma homeostática, moduladora, eficiente y bien tolerada por el cuerpo es de gran importancia.

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de la inflamación está en aumento. Las plantas pueden ser una fuente importante de productos naturales biológicamente activos: flavonoides, terpenos, quinonas, catequinas, alcaloides, etc., los cuales pueden modular la expresión de las señales proinflamatorias y actuar sobre ciertas condiciones inmunológicas. Por lo tanto, el desarrollo de medicamentos estandarizados a base de hierbas con eficacia comprobada y seguridad de uso es de gran importancia, no solo para aumentar el acceso a los medicamentos, sino también para ofrecer nuevas opciones terapéuticas.<sup>43</sup>

Algunos ejemplos de plantas que presentan actividad antiinflamatoria son las siguientes: *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis*, *Borago officinalis*, *Oenothera biennis*, *Harpagophytum procumbens*, *Boswellia serrata*, *Rosa canina*, *Urtica dioica*, *Uncaria tomentosa*, *Musa sapientum peel*, *Salvia officinalis*, *Ribes nigrum*, *Glycine max*, *Elaeagnus angustifolia*, *Vaccinium myrtillus*, *Olea europaea* y *Curcuma longa*.<sup>44</sup>

### 2.9. Modelos experimentales para el estudio de la inflamación

Los estudios realizados utilizando modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, son componentes críticos del esfuerzo para identificar el efecto de nuevos principios activos. Los modelos experimentales permiten la cuantificación exacta de los niveles de exposición, para eliminar muchas variables externas que pueden alterar la respuesta del principio activo.<sup>17</sup>

Entre los modelos experimentales *in vitro* para evaluar la inflamación tenemos: quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares, metabolismo del ácido araquidónico, liberación inducida de citocinas de glóbulos blancos humanos, citometría de flujo de citocinas intracelulares, detección de antagonistas de IL-1, etc. Asimismo, los modelos experimentales *in vivo* para evaluar la inflamación son el eritema inducido por radiación UV, la pleuritis inducida por carragenina, la inhibición de la adhesión de leucocitos a las vénulas mesentéricas, el edema de oído inducido por oxazolona, el edema de oreja inducido por aceite de Croton y el edema plantar inducido por carragenina.<sup>17</sup>

### **2.9.1. Edema plantar inducido por carragenina**

Esta es una de las técnicas más comunes empleadas para evaluar el efecto antiinflamatorio de un determinado principio activo, la cual se basa la capacidad de tales agentes para inhibir el edema producido en la pata de las ratas después de la inyección de la carragenina. La carragenina es un polisacárido sulfatado de alto peso molecular, formado por unidades de galactosa y de anhidrogalactosa, el cual deriva de varias especies de algas rojas (*Rhodophyceae*), incluyendo *Gigartina*, *Chondrus* y *Eucheuma*. La carragenina produce una respuesta edematogénica, desencadena vías inmunitarias innatas de la inflamación y promueve la producción de mediadores inflamatorios: bradicinina, tromboxanos, prostaglandinas, histamina, etc.<sup>45</sup> En esta técnica, se mide el volumen de la pata de las ratas, antes y después de la inducción del edema. A las ratas se le administra por vía subcutánea 0.10 mL de solución al 1 % de carragenina en el lado plantar de la pata, produciéndose un aumento del volumen de la pata después de 3 o 6h.<sup>46</sup>

## **3. Extracción e identificación de compuestos bioactivos de plantas**

### **3.1. Preparación de muestras de plantas antes de la extracción**

La etapa inicial en el estudio de plantas medicinales es la preparación de muestras de plantas para conservar sus biomoléculas antes de la extracción. Las

muestras de las plantas medicinales en estudio pueden ser usadas tanto frescas como secas, teniendo en cuenta que en la mayoría de casos se prefiere la muestra seca. Seguidamente, se efectúa la pulverización de la muestra, ya que la reducción del tamaño de partícula aumenta el área superficial de las muestras, dando lugar a un mejor contacto superficial con los disolventes de extracción.<sup>47</sup>

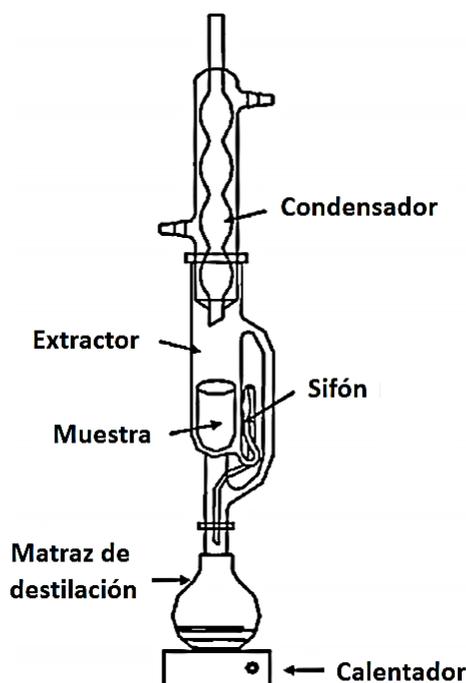
### 3.2. Extracción

La extracción es un paso crucial en el análisis de las plantas medicinales, ya que es necesario extraer los componentes químicos deseados de los materiales vegetales para una separación y caracterización adicionales. Deben tomarse las medidas adecuadas para asegurar que los componentes bioactivos potenciales no se pierdan, distorsionen o destruyan durante la preparación del extracto. La selección del sistema de disolventes depende de la naturaleza del compuesto bioactivo. Existen diferentes sistemas disolventes para extraer el compuesto bioactivo de los productos naturales.

La extracción de compuestos hidrófilos utiliza disolventes polares, tales como metanol, etanol o acetato de etilo. Para la extracción de compuestos más lipófilos, se utilizan diclorometano, hexano, etc. Para la extracción de las muestras de plantas se usan diversos métodos, tales como maceración, percolación, infusión, decocción, sonicación, extracción por reflujo, extracción por Soxhlet, etc.<sup>47</sup>

#### 3.2.1. Extracción por Soxhlet

Es una de las técnicas más antiguas en la extracción de compuestos bioactivos. Es el proceso de transferencia de los componentes parcialmente solubles de una muestra sólida hacia la fase líquida utilizando un extractor Soxhlet (**Fig. 5**). La muestra sólida se coloca en un dedal de papel de filtro que se introduce en la cámara principal del extractor Soxhlet. El disolvente (calentado a reflujo y enfriado por el condensador) viaja a la cámara principal y los componentes parcialmente solubles se transfieren lentamente al disolvente.<sup>48</sup>



**Figura 5.** Equipo de extracción por Soxhlet convencional.<sup>48</sup>

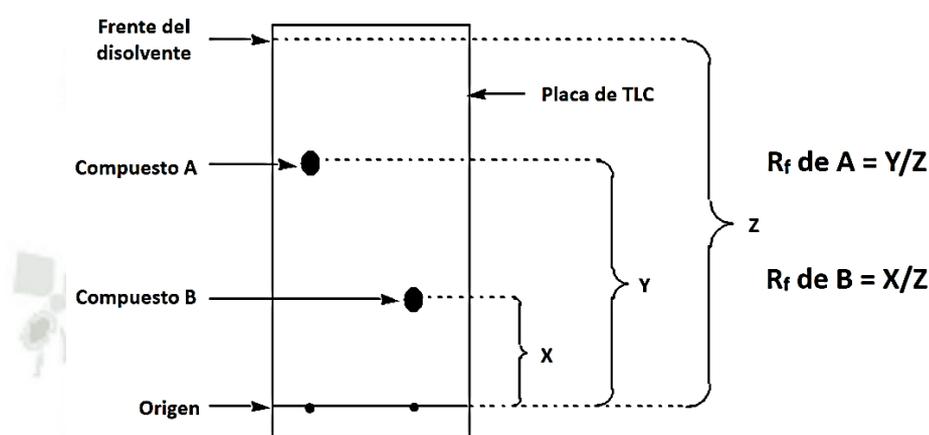
### 3.3. Identificación

Los extractos de plantas usualmente presentan una combinación de varios tipos de compuestos bioactivos con diferentes polaridades, donde su separación es un gran reto en el proceso de identificación y caracterización de compuestos bioactivos. Para el aislamiento de estos compuestos bioactivos se utilizan técnicas de separación: cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía en columna, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Además, también se pueden utilizar técnicas no cromatográficas: inmunoensayo, ensayo de cribado fitoquímico, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), para obtener y facilitar la identificación de los compuestos bioactivos.<sup>49</sup>

#### 3.3.1. Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (TLC) se basa en la afinidad de los compuestos bioactivos (presentes en una mezcla) por la fase estacionaria (habitualmente gel de sílice) o la fase móvil (mezcla de disolventes) que asciende

a través de la fase estacionaria por capilaridad, permitiendo la separación de estos compuestos. La TLC también se usa para identificar determinado compuesto en una mezcla, cuando el  $R_f$  (factor de retención) de un compuesto se compara con el  $R_f$  de un compuesto conocido (**Fig. 6**). Además, se pueden aplicar pruebas adicionales implican la pulverización de reactivos de cribado fitoquímico, que causan cambios de color de acuerdo al tipo de compuestos bioactivos presentes en un extracto; o viendo la placa bajo la luz UV.<sup>49</sup>



**Figura 6.** Cromatografía de capa fina y determinación del  $R_f$ <sup>49</sup>.

#### 4. Formas farmacéuticas semisólidas

Las formas farmacéuticas semisólidas sirven como portadores de principios activos que se administran tópicamente por la piel, la córnea, el tejido rectal, la mucosa nasal, la vagina, el tejido bucal, la membrana uretral y el revestimiento externo del oído. Entre estas formas farmacéuticas tenemos a las cremas, los geles, los ungüentos y las pastas. Las cuales contiene uno o más principios activos disueltos o uniformemente dispersos en una base adecuada, la cual presenta excipientes adecuados, tales como emulsificantes, intensificadores de la viscosidad, antimicrobianos, antioxidantes y estabilizantes.<sup>50</sup>

Las ventajas de estas formas farmacéuticas son la aplicación de forma externa lo que reduce la probabilidad de efectos secundarios, la acción de forma local evita el primer paso intestinal y el metabolismo hepático, fácil aplicación, formulación rápida y tienen la capacidad de suministrar tópicamente una amplia variedad de principios activos.<sup>51</sup>

#### 4.1. Geles

La USP define a los geles como sistemas semisólidos, los cuales consisten en suspensiones compuestas de pequeñas partículas inorgánicas o grandes moléculas orgánicas interpenetradas por un líquido. Los geles están formados por el atrapamiento de grandes cantidades de líquido acuoso o hidroalcohólico en una red de partículas sólidas coloidales. Existen dos clases de geles: hidrófobos u oleogeles (contienen parafina líquida con polietileno o aceites grasos gelificados) e hidrófilos o hidrogeles (contienen agua, glicerol o propilenglicol gelificados por agente como tragacanto, almidón, derivados de celulosa, etc.).<sup>52</sup>

Dependiendo de la naturaleza de las sustancias coloidales y del líquido en la formulación, el gel cambia en apariencia de completamente claro a opaco. La mayoría de los geles tópicos se preparan con polímeros orgánicos, tales como carbómeros que imparten una apariencia estética agradable y brillante al producto y se lavan fácilmente de la piel con agua. Además, un gel típico, posee un polímero natural o sintético que construye una matriz tridimensional a través de un líquido hidrófilo. Los polímeros utilizados incluyen las gomas naturales de tragacanto, carragenano, pectina, agar y ácido algínico; materiales semisintéticos, tales como metilcelulosa, hidroxietilcelulosa y carboximetilcelulosa; y el polímero sintético Carbopol.<sup>50</sup>

Existen diferentes investigaciones donde se ha utilizado a los geles como forma farmacéutica en la evaluación de diversas actividades (antiinflamatoria, antioxidante, antibacterial, antifúngica, etc.) de extractos de plantas, obteniéndose resultados satisfactorios.<sup>53-55</sup>

## CAPÍTULO II

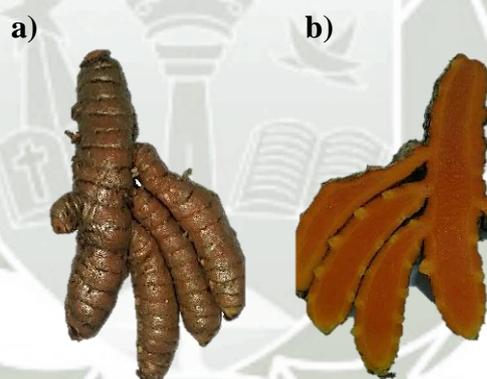
### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. Materiales

##### 1.1. Material biológico

##### 1.1.1. *Curcuma longa* Linn.

Los rizomas de *Curcuma longa* L. (**Fig. 7**) fueron recolectados de la comunidad de Otilia, localizada en el distrito de Tambopata, perteneciente a la provincia de Tambopata del departamento de Madre de Dios, Perú. La recolección se desarrolló en el mes de noviembre del 2016 a una altitud de 205 m s. n. m. Asimismo, se corroboró la clasificación y especie de este material vegetal en el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.



**Figura 7.** Rizomas de *Curcuma longa* L.  
a) Parte externa b) Parte interna.

##### 1.1.2. Animales de experimentación

Los experimentos fueron realizados en 29 ratas macho de la variedad Wistar, con un peso de 200 a 250 gramos y una edad entre 20 a 22 semanas. Estos animales fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad Católica de Santa María. Los animales se mantuvieron en un ambiente cerrado, a temperatura ambiente

(20 °C), con alimentación y agua *ad libitum* dentro del mismo bioterio, lugar donde se desarrolló la experimentación.

Se hicieron esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales, por lo cual esta investigación se llevó a cabo cumpliendo debidamente las normas de ética, según la guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio MINSA/INS 2008.<sup>56</sup>

## 1.2. Material de laboratorio

- Baguetas de vidrio
- Cubas de desarrollo cromatográfico
- Desecador
- Embudos de vidrio
- Equipo de extracción Soxhlet NORMAX
- Jeringa de tuberculina.
- Lamina de Silica gel 60 F<sub>254</sub>
- Fiolas de vidrio de 500 y 1000 mL.
- Papel filtro rápido
- Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL
- Probetas graduadas de 10, 50 y 100 mL
- Pulverizador
- Tubos capilares sin heparina SUPER-HALEM
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 mL

## 2. Reactivos

- Acetato de etilo ACS J. T. BAKER®
- Ácido acético glacial ACS J. T. BAKER®
- Ácido fórmico QP LOBA CHEMIE
- Ácido nítrico ACS MERCK®
- Ácido sulfúrico ACS J. T. BAKER®
- Agua destilada

- Alcohol butílico normal ACS VETEC®
- Anhídrido acético ACS FISHER CHEMICAL®
- Carragenina
- Carbopol 940
- Cloroformo ACS J. T. BAKER®
- Cloruro de aluminio QP RIEDEL-DE-HAËN®
- Cloruro de sodio
- Cloruro férrico ACS MERCK®
- Diclofenaco sódico al 1 % en gel DOLOPRALAN®
- Etanol 96° DIPROQUIM
- Éter de petróleo ACS J.T.BAKER®
- Metanol ACS MERCK
- Metilparabeno
- Nitrato de bismuto QP
- Propilenglicol MERCK®
- Suero fisiológico
- Trietanolamina MERCK®
- Tritón X-100
- Tween 20 MERCK®
- Yodo QP RIEDEL-DE-HAËN®
- Yoduro de potasio ACS MERCK®

### 3. Equipos

- Balanza Analítica OHAUS® PIONEER™
- Campana extractora
- Molino de cuchillas
- Estufa MEMMERT Western Germany
- Lámpara de luz MINERALIGHT® LAMP UV-254/366nm
- Pletismómetro Digital LE 7500
- pH-metro digital 827 Metrohm®

## 4. Métodos

### 4.1. Preparación de los extractos de *Curcuma longa* Linn

#### 4.1.1. Procesamiento del material vegetal

Los rizomas de *Curcuma longa* L. recién obtenidos se lavaron con agua durante las 24 horas siguientes, eliminando así los residuos de tierra. Seguidamente, estos rizomas se colocaron en canastas para drenar el agua, y posteriormente se les dio un tratamiento antimicrobiano con una solución de hipoclorito de sodio a 50 ppm durante 2 min (Al final de este proceso se aclaró con agua potable). A continuación, se procedió al secado en un cuarto bajo la sombra, aireado y a temperatura ambiente (aprox. 20 °C), durante 12 horas. Luego se procedió al traslado a la ciudad de Arequipa; para lo cual, se empaquetó en capas horizontales con papel Kraft dentro de una caja de cartón llenando todos los espacios. Cada rizoma se colocó en posición adecuada evitando el sobreempaque, y por lo tanto el deterioramiento de los mismos.

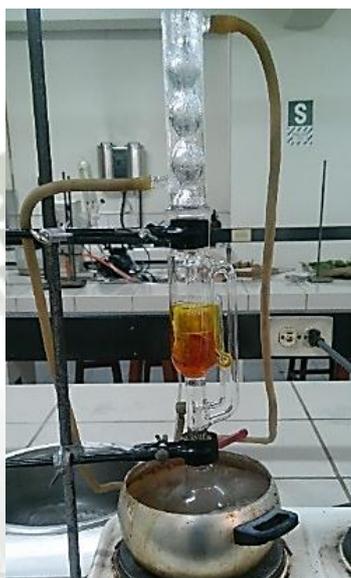
En el laboratorio de farmacognosia (H-103) de la Universidad Católica de Santa María se procedió a completar el secado, para lo cual se cortó los rizomas en finas láminas y se colocaron encima de papel Kraft, extendidas y separadas para obtener una mayor superficie de contacto. Seguidamente, se las llevó a la estufa a 45 °C durante 3 días, como se observa en la **Fig. 8**. Una vez obtenida la muestra seca, se pulverizó en un molino de cuchillas para romper los tejidos celulares y permitir una mayor superficie de contacto material-solvente. El material vegetal pulverizado se guardó en un recipiente cerrado herméticamente y lejos de la luz solar para su correcto almacenamiento y conservación.



**Figura 8.** Secado de los rizomas de *Curcuma longa* L. en la estufa.

#### 4.1.2. Obtención de los extractos

La extracción de los principios activos de los rizomas de la *Curcuma longa* L. se realizó por el método de Soxhlet (**Fig. 9**). Este método se basa en una extracción sólido-líquido, que consiste en la transferencia de los componentes parcialmente solubles de una muestra sólida hacia la fase líquida.<sup>48</sup>



**Figura 9.** Obtención de los extractos de los rizomas de la *Curcuma longa* L. por el método de Soxhlet

El procedimiento para la obtención de los extractos consistió en pesar 10 g del material vegetal seco y pulverizado, y colocarlos en un soporte elaborado de papel filtro, el cual se introdujo en la cámara principal del extractor Soxhlet. A continuación, el disolvente se colocó en el matraz de destilación (160 mL). Se utilizaron tres disolventes de distinta polaridad para la elaboración de los extractos: etanol (punto ebullición: 78.30 °C), *n*-butanol (punto ebullición: 116-118 °C) y éter de petróleo (punto ebullición: 38-56 °C). Luego, se procedió a calentar el matraz con el disolvente provocando su evaporación, los vapores que se formaron viajaron hacia el condensador, donde pasaron nuevamente al estado líquido, cayendo gota a gota sobre la muestra presente en el extractor del Soxhlet, dándose así la extracción sólido-líquido. Cuando este líquido (con los principios

activos extraídos) alcanzó el nivel de desbordamiento, el sifón lo aspiró provocando la descarga de este líquido hacia el matraz de destilación, todo esto constituyó un ciclo. Se realizó 15 ciclos para cada disolvente, con una duración aproximada de 5 a 6 horas. Los extractos se almacenaron en frascos de color ámbar en refrigeración. Con el propósito de obtener un volumen adecuado de los extractos, este procedimiento se realizó 3 veces por cada solvente.

#### 4.1.3. Determinación del rendimiento de extracción

El porcentaje de rendimiento de extracción (RE %), se determinó por medio del método de gravimetría, el cual consistió en colocar cada extracto de los rizomas de *Curcuma longa* L. (etanólico, *n*-butanólico y de éter de petróleo), en un vaso de precipitados previamente estabilizado a peso constante y se llevó a baño María de aproximadamente 90 °C, con la finalidad de evaporar el disolvente. Seguidamente, se colocó los vasos en el desecador para obtener un peso constante. El recipiente con el extracto blando fue pesado y se le restó la masa inicial del vaso vacío, obteniéndose de esta manera la masa del extracto blando. Finalmente, se aplicó la **Ecuación (1)** para hallar el RE % de cada extracto.

$$\text{RE \%} = \frac{\text{Masa extracto blando (g)}}{\text{Masa material estudiado (g)}} \times 100 \% \quad \text{Ecuación (1)}$$

#### 4.2. Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria de los extractos

Se realizó un estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria de los extractos del rizoma de *Curcuma longa* L. obtenidos con los tres disolventes: etanol, *n*-butanol y éter de petróleo. Este estudio preliminar permitió escoger cuál de los extractos presentó una mayor actividad antiinflamatoria, utilizando este tipo de extracto para los estudios posteriores.

Este estudio preliminar consistió en la preparación de suspensiones al 10 % de los tres extractos; para lo cual se pesó 1 g del extracto, se dispersó en 0.5 mL de

Tween 20 (surfactante hidrofílico) y se añadió agua destilada hasta completar un volumen final de 10 mL.

La inducción de la inflamación, por medio de la administración por vía subcutánea de 0.10 mL de solución al 1 % de carragenina en suero fisiológico, en el lado plantar de la pata de las ratas. Luego de tres horas, se aplicaron las suspensiones (al 10 % a base de los extractos blandos) en la zona edematosa de la pata, para lo cual esta zona estuvo sumergida con las suspensiones durante 30 segundos. La actividad antiinflamatoria se evaluó utilizando un pletismómetro digital, el cual midió la diferencia de volumen (mL) de la pata de las ratas antes y después de la inducción del edema (cada hora entre 1 h – 8 h). Se realizó este procedimiento para cada extracto, por triplicado (se utilizó 9 ratas). Finalmente, se realizaron pruebas estadísticas, que demostraron cuál de los extractos presentó una mayor actividad antiinflamatoria.

#### **4.3. Análisis fitoquímico preliminar**

Se realizó el análisis fitoquímico preliminar del extracto elegido en el estudio preliminar. Este análisis se efectuó utilizando el método de cromatografía de capa fina (TLC), el cual es un método cromatográfico comúnmente utilizado en el análisis fitoquímico preliminar de extractos vegetales, ya que posee ventajas como bajo costo, simplicidad, tiempo de desarrollo rápido, alta sensibilidad y buena reproducibilidad.<sup>57</sup>

La TLC es un tipo de cromatografía en la que la fase móvil es líquida y la fase estacionaria es una fina capa de material encima de un soporte plano. Esta capa de material se conoce como sorbente (generalmente sílica gel). La fase móvil es una mezcla de disolventes, que transportan a los solutos a través de la fase estacionaria. La velocidad a la cual el soluto se mueve a través de la fase estacionaria depende de la afinidad hacia la fase móvil o la fase estacionaria. Las sustancias fuertemente atraídas por el sorbente se mueven más lentamente y las que son menos atraídas se mueven más rápidamente, debido a que son más solubles en la fase móvil.<sup>57</sup>

En el desarrollo cromatográfico cada compuesto presenta un factor de retención ( $R_f$ ). El  $R_f$  se utiliza para la evaluación cualitativa de una separación por TLC. Este es el cociente entre la distancia que recorre el compuesto y la distancia recorrida por la fase móvil, como se observa en la **Ecuación (2)**.<sup>58</sup>

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por un compuesto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

En el presente trabajo de investigación, se realizó un análisis fitoquímico preliminar para establecer la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios (flavonoides, taninos, alcaloides, terpenos y curcuminoides) en el extracto del rizoma de *Curcuma longa* L. escogido en la fase preliminar; utilizando las fases móviles y reveladores, que se muestran en la **Tabla N° 1**.

**Tabla N° 1.** Identificación de metabolitos secundarios en el extracto blando de *Curcuma longa* L., por TLC.

METABOLITOS SECUNDARIOS	FASE MÓVIL	REVELADOR
Flavonoides	<i>n</i> -hexano:Acetona (8:2)	Cloruro de aluminio 1% en etanol
Taninos	Acetato de etilo:Tolueno:Ácido fórmico (2.2:1.1:1.1)	Cloruro férrico 5% en etanol
Alcaloides	Cloroformo:Metanol (9:1)	Reactivo de Dragendorff
Terpenos	Tolueno:Acetato de etilo (97:3)	Reactivo de Liebermann
Curcuminoides	Cloroformo:Etanol:Ácido acético (95:5:1)	Vapores de yodo

Fuente: Wagner y Bladt (1996). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.<sup>59</sup>  
Freire-gonzález R, Vistel-vigo M. Caracterización fitoquímica de la *Curcuma longa* L.<sup>60</sup>

El reactivo de Dragendorff se preparó en un matraz disolviendo 0.8 g de nitrato de bismuto con 20 mL ácido nítrico al 30 %. En otro matraz se colocó 2.7 g de yoduro potasio con 5 mL de agua. Se mezcló las soluciones y se dejó en reposo

durante 24 horas. Finalmente se decantó la solución (para separar los residuos de cristales) y se aforó con agua a 10 mL.<sup>61</sup> Por otro lado, el reactivo de Lieberman, fue preparado mezclando 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo en baño de hielo, después se añadió una gota de ácido sulfúrico concentrado. Estos reactivos se prepararon inmediatamente antes de uso.<sup>61</sup>

#### **4.4. Preparación del gel**

Una vez elegido el extracto con una mayor actividad antiinflamatoria, se procedió a darle una forma farmacéutica por medio de la preparación de un gel. La cual consistió en medir la cantidad exacta de carbopol (1 %), propilenglicol (7 %) y metilparabeno (0.1 %) que fueron dispersados en agua destilada. Esta dispersión de carbopol se mantuvo en reposo durante 24 horas, lo que permitió su estabilización completa. A continuación, el carbopol dispersado se mezcló mediante agitación continua, y en caliente hasta formar el aspecto de un gel. La dispersión obtenida se neutralizó con una cantidad adecuada de trietanolamina, hasta obtener un pH de 5.0 a 5.5. Se dejó reposar esta dispersión en un recipiente de plástico durante una semana a temperatura ambiente. Entonces, una concentración correspondiente al 10 % del extracto blando de *Curcuma longa* L. fue diluida con propilenglicol (3 %) y agua destilada en caliente y se añadió a la dispersión de carbopol. El gel obtenido fue almacenado en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente.<sup>62</sup>

#### **4.5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria**

##### **4.5.1. Inducción del edema plantar por carragenina**

Una solución de carragenina en suero fisiológico inyectada en el lado plantar de la pata de las ratas, induce una inflamación aguda de la pata, la cual llega a su máximo nivel aproximadamente 3 h después de la inyección. Este modelo se ha utilizado durante mucho tiempo para evaluar las propiedades antiinflamatorias de diferentes extractos de plantas que exhiben propiedades antiinflamatorias.<sup>63</sup> La inflamación inducida por la carragenina, originalmente

descrita por Winter C *et al.* en 1962, es aguda, no inmune, adecuadamente investigada y altamente reproducible.<sup>64</sup>

El procedimiento utilizado para inducir el edema plantar por carragenina, consistió en una limpieza de la zona plantar de la pata de la rata. Seguidamente, se utilizó de una jeringa de tuberculina (capacidad de 1 mL), con la cual se administró por vía subcutánea 0.10 mL de una solución al 1 % de carragenina en suero fisiológico, en el lado plantar de la pata de las ratas.<sup>65,66</sup>

#### 4.5.2. Medición del edema plantar

La medición del edema plantar se realizó utilizando un pletismómetro digital (**Fig. 10**), el cual es un instrumento que permitió medir pequeños cambios en el volumen (mL). Como se señaló en la sección anterior, la carragenina induce a la formación de un edema, por lo que hay un aumento de volumen y al estudiar un agente que puede presentar actividad antiinflamatoria, este debería reducir el edema, dándose una disminución de volumen. Estos cambios en el volumen son registrados por el pletismómetro, el cual consta de dos depósitos (vasija volumétrica y sensora) interconectados y que son llenados con una solución conductora. Además, la vasija sensora presenta dos electrodos de platino.<sup>67</sup>



**Figura 10.** Pletismómetro Digital LE 7500

La pata del animal de experimentación se sumerge en la solución conductora de la vasija volumétrica, provocándose un cambio en su volumen, lo que induce a una alteración de la conductancia entre los dos electrodos de platino. El pletismómetro presenta un detector que reconoce este cambio de conductividad

y genera una señal de salida a la pantalla digital que indica el desplazamiento de volumen con una resolución de 0.01 mL. Por lo tanto, de acuerdo al principio de Arquímedes, el volumen de un cuerpo sumergido (pata del animal) es igual al volumen de fluido desplazado, teniéndose en cuenta que a mayor inflamación (evidenciada por la formación del edema), mayor será el volumen desplazado.<sup>67</sup>

El procedimiento que se realizó con el pletismómetro se dio por medio de la preparación de 1000 mL una solución de cloruro de sodio al 0.1 % en agua destilada. Con el fin de evitar la formación del menisco en las paredes de los dos depósitos, a esta solución se le agregó 15 gotas de tritón X-100 (tensioactivo no iónico). Esta solución se colocó en el envase reservorio, ubicado en la parte superior del soporte. Seguidamente, se encendió el pletismómetro verificándose que la pantalla del mismo indique 0.00. Se abrió la llave que conecta el envase reservorio con los dos depósitos, lo que permitió la entrada de la solución conductora hasta la marca de la vasija volumétrica. Luego, se presionó el botón “zero” para indicar un volumen de inicio de 0 mL. A continuación; se verificó el equipo introduciendo un patrón de un volumen de 3 mL en la vasija volumétrica y se presionó el botón “calibration”; verificándose que el instrumento marque 3.00; entonces, se retiró el patrón y se comprobó que el instrumento indique 0.00. Efectuado este proceso, el pletismómetro estuvo listo para medir los cambios de volumen en las patas con edema de las ratas (**Fig. 11**).<sup>68</sup>



**Figura 11.** Medición del edema plantar en las ratas usando el pletismómetro.

La actividad antiinflamatoria de las sustancias que inhiben el edema plantar de las ratas se calculó con la siguiente fórmula, reportada previamente por Sharma J *et al.* (2004) y Samud A *et al.* (1999):<sup>69,70</sup>

$$\% \text{ de Inflamación} = \frac{(A - B)}{B} \times 100 \quad \text{Ecuación (3)}$$

Donde A es la medición del volumen del edema plantar de las ratas después de un determinado tiempo de la inducción de este edema por carragenina y B es la medición inicial del volumen de la pata de las ratas (sin inducción de edema).<sup>69,70</sup>

#### 4.5.3. Diseño experimental

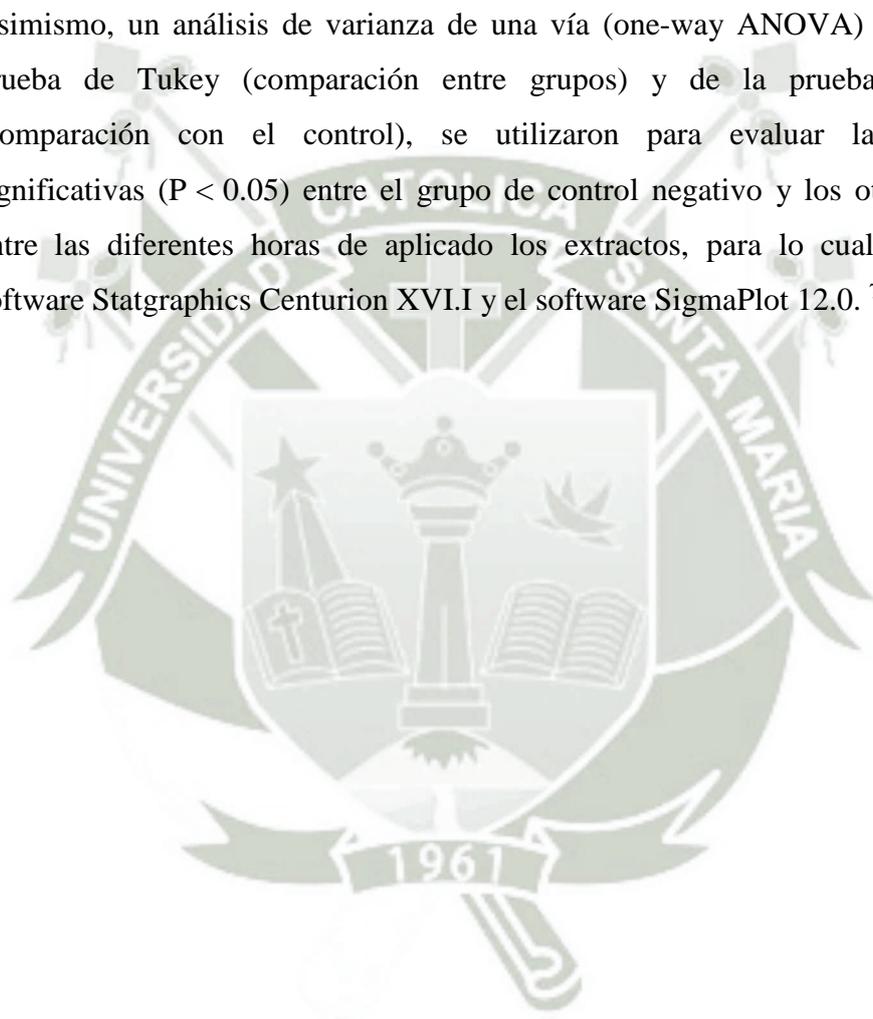
Las 20 ratas fueron distribuidas al azar en 4 grupos. A todos los grupos se le hizo una medición inicial del volumen de la pata de las ratas (sin inducción de edema) usando el pletismómetro y seguidamente se realizó la inducción del edema plantar por carragenina como se describe en las secciones anteriores (4.5.1 y 4.5.2). Los 4 grupos consistieron en un grupo control negativo, que se le aplicó solo los excipientes del gel preparado; un grupo control positivo, que se le aplicó diclofenaco sódico al 1 % en gel; un grupo experimental 1, que se le aplicó la suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de cúrcuma longa L. elegido en el estudio preliminar (cuya preparación se explica en la sección 4.2); y un grupo experimental 2, que se le colocó el gel al 10 % del extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. (cuya preparación se explica en la sección 4.4). Seguidamente, se midió el volumen del edema plantar, cada hora durante un intervalo de tiempo de 1-8 h. Cada hora se aplicó por vía tópica los respectivos compuestos a cada grupo. Los datos obtenidos fueron aplicados en la **Ecuación (3)**, y luego se realizó el análisis estadístico de los mismos.

#### 4.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron expresados como el promedio  $\pm$  error estándar de la media ( $\bar{x} \pm SEM$ ), para lo cual se utilizó el software Microsoft Excel 2016. El error estándar de la media (SEM) es una medida de precisión para una media poblacional estimada, su cálculo está dado por la siguiente ecuación:<sup>71</sup>

$$SEM = \frac{\text{Desviación estándar } (\sigma)}{\sqrt{\text{Tamaño de la muestra } (n)}} \quad \text{Ecuación (4)}$$

Asimismo, un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) seguido de la prueba de Tukey (comparación entre grupos) y de la prueba de Dunnett (comparación con el control), se utilizaron para evaluar las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el grupo de control negativo y los otros grupos, y entre las diferentes horas de aplicado los extractos, para lo cual se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI.I y el software SigmaPlot 12.0.<sup>70</sup>



## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1. Preparación de los extractos de *Curcuma longa* Linn

De acuerdo al Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, el material vegetal utilizado en el presente trabajo de investigación fue de la especie *Curcuma longa* L., tal como se muestra en la constancia otorgada por dicha entidad (**Anexo 1**).

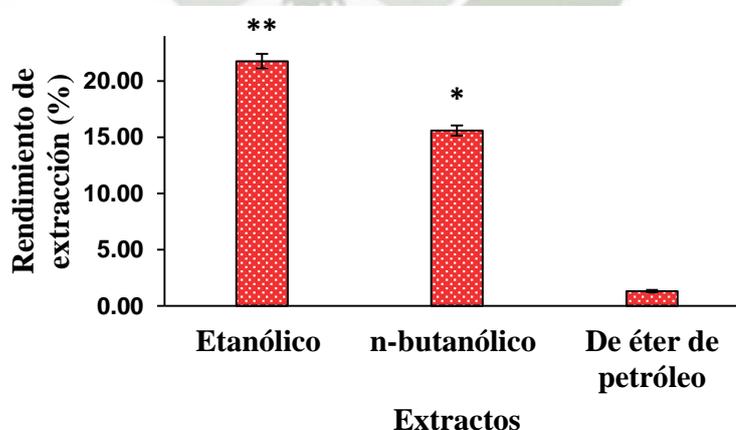
Como se indica en la parte metodológica (sección 4.1.2), se realizó la extracción de los principios activos de los rizomas de la *Curcuma longa* L. por el método de Soxhlet. Lo que permitió la obtención de los tres extractos: etanólico, *n*-butanólico y de éter de petróleo. Existen diferentes investigaciones donde se ha realizado extractos de los rizomas de la *Curcuma longa* L. utilizando un extractor de Soxhlet.<sup>72,73</sup> Asimismo, se ha reportado una investigación que evaluó varios métodos de extracción de compuestos bioactivos de la *Curcuma longa* L., donde se señaló que la maceración y la extracción por Soxhlet fueron las técnicas más adecuadas para la extracción de compuestos bioactivos de este material vegetal, en comparación a otras técnicas como la homogenización y la decocción.<sup>74</sup>

Se determinó también el porcentaje de rendimiento de extracción (RE %), mediante la obtención de los extractos blandos mediante la evaporación de los solventes. Estos extractos blandos, como se aprecia en la **Fig. 12**, se pudo observar que el extracto etanólico y el extracto *n*-butanólico presentaron una coloración anaranjada-oscura, mientras que el extracto de éter de petróleo mostró una coloración amarillenta-clara. Asimismo, existe un trabajo de investigación en el que se realizó un extracto metanólico de los rizomas de *Curcuma longa* L., donde se indicó que este extracto presentó una coloración anaranjada-oscura, en el cual se obtuvo una mayor concentración de curcuminoides.<sup>72</sup> Por otro lado, en el extracto de éter de petróleo (disolvente apolar), de acuerdo al color, probablemente no tuvo la presencia de curcuminoides, ya que estos son insolubles en éter de petróleo.<sup>75</sup>



**Figura 12.** Extractos blandos de los rizomas de *Curcuma longa* L. a) Etanólico b) *n*-butanólico c) De éter de petróleo

Por otro lado, se muestra el porcentaje de rendimiento de los extractos etanólico, *n*-butanólico y de éter de petróleo de los rizomas de *Curcuma longa* L., expresado en porcentaje peso/peso (p/p), que corresponde a los gramos del extracto obtenido por cada 100 g de material vegetal (**Fig. 13**). Los datos de los experimentos fueron analizados por medio de una prueba de ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey. Se puede observar que los porcentajes de rendimiento de los tres grupos mostraron una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre todos. Por lo tanto, podríamos decir que el extracto que presentó un mejor rendimiento fue el etanólico con un  $21.77 \pm 0.38$  %. Este mayor rendimiento en el extracto etanólico, podría deberse a que los rizomas de *Curcuma longa* L., presentan un alto contenido de carbohidratos (67.14 %) y azúcares (3.21 %) que son solubles en compuestos polares.<sup>7</sup>

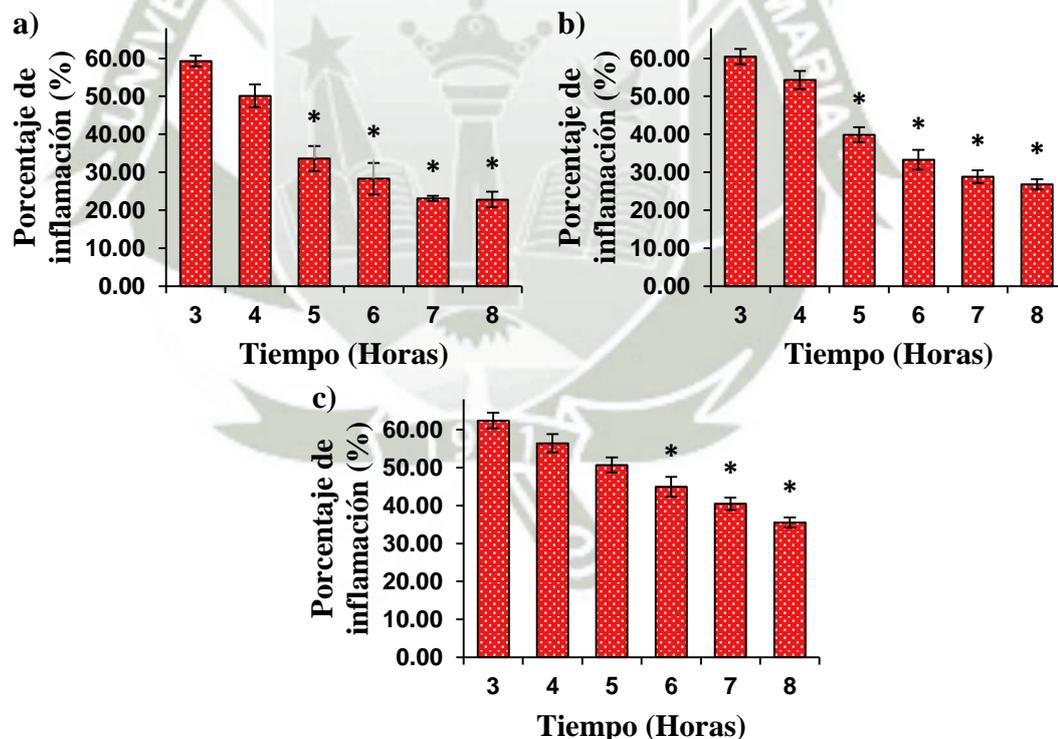


**Fig. 13** Comparación entre los porcentajes de rendimiento de los extractos blandos de rizomas de *Curcuma longa* L. Los valores son presentados como promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Con diferencia

significativa entre todos los grupos \* y \*\* ( $p < 0.05$ ). ANOVA seguido de prueba de Tukey.

## 2. Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria de los extractos

Como se menciona en la parte metodológica (sección 4.2) se ejecutó un estudio preliminar de los extractos blandos del rizoma de *Curcuma longa* L. obtenidos con los tres disolventes: etanol, *n*-butanol y éter de petróleo, con la finalidad de establecer cuál de ellos tuvo un mayor efecto antiinflamatorio. La **Fig. 14** grafica los porcentajes de inflamación de las patas de las ratas luego del edema inducido por carragenina. Cabe resaltar que se toma como grupo control los datos obtenidos en la 3 h, debido a que en otras investigaciones se ha reportado que la máxima inflamación inducida por la carragenina se produce aproximadamente 3 h después de la inyección de la misma.<sup>63,76</sup> Entonces, este control (3 h) se comparó con los datos obtenidos en las horas posteriores (4-8 h) en las cuales se evaluó la aplicación de los extractos, para lo cual se realizó una prueba de ANOVA seguida de la prueba de Dunnett. Este procedimiento estadístico se efectuó para cada extracto.



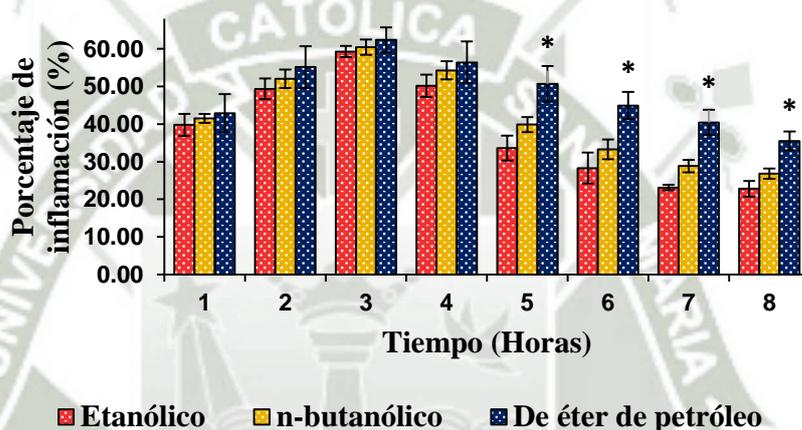
**Figura 14.** Comparación entre los porcentajes de inflamación de las patas de las ratas luego de la inducción del edema y aplicación de las suspensiones a base de los extractos blandos del rizoma de *Curcuma longa* L. a diferentes tiempos. Los valores son presentados como promedio  $\pm$  SEM. ( $n = 3$ ). Con diferencia significativa entre el control (3 h) y las horas posteriores (aplicación de los extractos), \* ( $p < 0.05$ ).

ANOVA seguido de prueba de Dunnett. a) Extracto etanólico, b) Extracto *n*-butanólico y c) Extracto de éter de petróleo.

Los resultados obtenidos muestran que la suspensión a base de extracto blando etanólico y la suspensión a base de extracto blando *n*-butanólico presentan un efecto antiinflamatorio estadísticamente significativo a partir de 5 h (2 h después de la aplicación del extracto), mientras que la suspensión a base del extracto blando de éter de petróleo mostro un efecto significativo desde la 6 h (3 h después de la aplicación del extracto). Este efecto más tardío en el extracto del éter de petróleo probablemente se debió a que en este extracto hubo una menor cantidad de metabolitos secundarios extraídos del rizoma de la *Curcuma longa* L., lo cual fue evidenciado por el bajo porcentaje de rendimiento de este extracto. Además, se sabe que los curcuminoides son unos de los principales compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria de la *Curcuma longa* L.;<sup>77</sup> sin embargo, posiblemente estos compuestos no hayan sido extraídos por el éter de petróleo ya que son insolubles en el mismo, provocando así una actividad antiinflamatoria más lenta.<sup>75</sup>

Por otro lado, la **Fig. 15** muestra la comparación de los porcentajes de inflamación de las patas de las ratas entre la aplicación de los tres tipos de extractos obtenidos (etanólico, *n*-butanólico y de éter de petróleo) a cada hora. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de una prueba de ANOVA seguida de la prueba de Tukey. Se puede observar que entre la 1 h y la 4 h no existe diferencia significativa entre estos grupos, esto se debería a que hasta la 3 h todos los animales de experimentación han recibido un tratamiento similar de la inducción del edema plantar por medio de la carragenina; además, se puede observar que a la 4 h tampoco no hay diferencia significativa, teniéndose en cuenta que a partir de esta hora se evaluó el efecto de los extractos e indicándose que en el párrafo anterior que estos extractos muestran un efecto antiinflamatorio significativo a partir de la 5 h, lo que podría explicar este comportamiento. Asimismo, se puede apreciar que a partir de la 5 h el extracto de éter de petróleo muestra una diferencia significativa en comparación a los otros dos extractos, evidenciando su menor efecto antiinflamatorio. Esto podría deberse a que este extracto no poseería curcuminoides (compuestos medianamente polares y que poseen efecto antiinflamatorio) los cuales son insolubles en disolvente apolares, como el éter de petróleo y hexano.<sup>78</sup>

La finalidad de esta prueba preliminar de los extractos de *Curcuma longa* L., fue escoger el extracto que tuviera un mejor efecto antiinflamatorio; no obstante, los resultados demostraron que el extracto etanólico y el *n*-butanólico tuvieron un efecto antiinflamatorio estadísticamente similar en todas las horas de tratamiento, esto se explicaría por la posible presencia de curcuminoides en estos extractos, como ha sido reportado por diferentes trabajos de investigación.<sup>77,78</sup> Sin embargo, se escogió al extracto etanólico para las siguientes pruebas, debido a que mostró un mayor rendimiento (**Fig. 13**) y el etanol tiene una mayor accesibilidad, bajo precio y menor toxicidad en comparación al *n*-butanol.<sup>79</sup>



**Figura 15.** Comparación entre los porcentajes de inflamación de las patas de las ratas entre los extractos blandos de *Curcuma longa* L. a diferentes tiempos. Los valores son presentados como promedio  $\pm$  SEM ( $n = 3$ ). Con diferencia significativa entre todos los grupos por cada hora, \* ( $p < 0.05$ ). ANOVA seguido de prueba de Tukey.

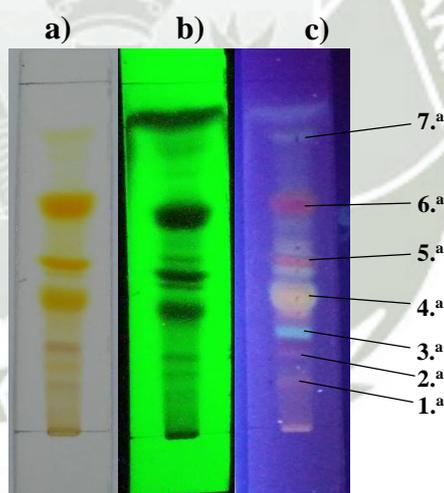
### 3. Análisis fitoquímico preliminar

Como se observó en las secciones anteriores: la extracción realizada con etanol, fue el que tuvo mayor porcentaje de rendimiento; además, el estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria de los extractos preparados mostró que el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. fue uno de los que tuvieron mayor efecto antiinflamatorio. Por lo que el análisis fitoquímico preliminar y las siguientes partes del presente estudio se realizó con el extracto etanólico. Tal como se observa en la sección de métodos, el análisis fitoquímico preliminar se realizó mediante

cromatografía en capa fina (TLC), y se procedió a evaluar la presencia de los siguientes grupos de metabolitos secundarios:

### 3.1. Identificación de curcuminoides

Se muestra la placa cromatográfica del extracto etanólico luego de aplicar el revelador, en el que se observan varias manchas de color naranja-marrón (**Fig. 16 (a)**); este color es característico de los compuestos curcuminoides, tal como muestran diversos estudios.<sup>72,80</sup> Por otro lado, Verma S *et al.*<sup>81</sup> describe las manchas o puntos obtenidos de extractos de *Curcuma longa* L., en el que señala que estas se observan de color gris a 254 nm de longitud de onda, tal como se observa en la **Fig. 16 (b)**; además, el mismo investigador refiere que con luz de 366 nm, las manchas se observan fluorescentes, es el fenómeno que también se observó en el presente estudio, tal como se observa en la **Fig. 16 (c)**. Por todo lo señalado anteriormente, se deduce que las manchas observadas en la placa cromatográfica corresponden a curcuminoides, existiendo unas en mayor proporción que otras.



**Figura 16.** Placa cromatográfica del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. para la identificación de curcuminoides, con revelador (a), observado a  $\lambda$  254 nm (b) y 366 nm (c).

Por otro lado, la **Tabla N° 2** muestra los valores de  $R_f$  para todas las manchas observadas en la **Fig. 16** y se tiene que las manchas 4.<sup>a</sup>, 5.<sup>a</sup> y 6.<sup>a</sup> son los constituyentes más abundantes en el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. Además, el estudio realizado por Freire & Vistel<sup>60</sup> quienes utilizaron la misma fase

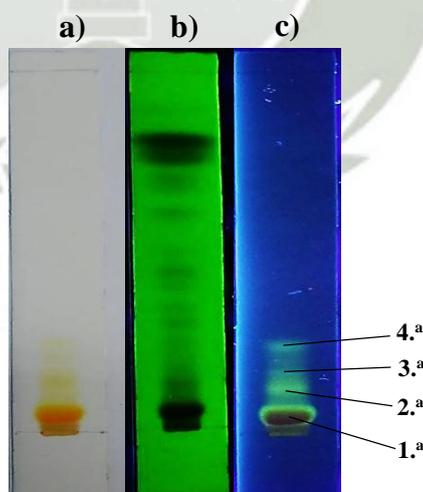
móvil que en el presente estudio, señalan que el estándar de curcumina presenta un  $R_f$  de 0.62; este valor es idéntico al obtenido por la 6.<sup>a</sup> mancha ( $R_f = 0.62$ ), por lo que se deduce que esta mancha correspondería a la curcumina presente en el extracto utilizado.

**Tabla N° 2.** Valores de  $R_f$  de las manchas visibles en la placa cromatográfica para la identificación de curcuminoides.

Mancha en placa con revelador	$R_f$
1. <sup>a</sup>	0.12
2. <sup>a</sup>	0.22
3. <sup>a</sup>	0.27
4. <sup>a</sup>	0.37
5. <sup>a</sup>	0.47
6. <sup>a</sup>	0.62
7. <sup>a</sup>	0.82

### 3.2. Identificación de flavonoides

Se muestra la placa cromatográfica del extracto etanólico de *Curcuma longa* L.; después de aplicar el revelador utilizado (**Fig. 17 (a)**), con luz de 254 nm de longitud de onda (**Fig. 17 (b)**) y la placa con luz de 366 nm de longitud de onda (**Fig. 17 (c)**), en el que se observa fluorescencia de las manchas que es indicativo de la presencia de flavonoides, tal como lo señala Wagner y colaborador.<sup>82</sup>



**Figura 17.** Placa cromatográfica del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. para la identificación de flavonoides, con revelador (**a**), observado a  $\lambda$  254 nm (**b**) y 366 nm (**c**).

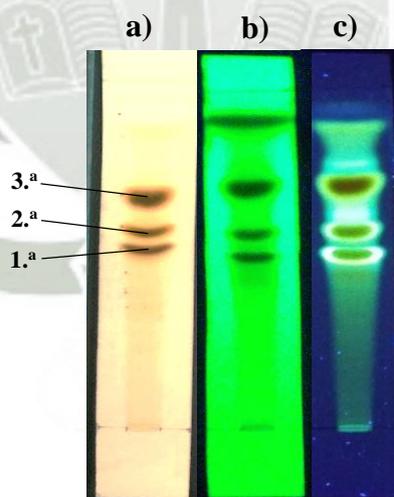
La presencia de flavonoides en extractos de *Curcuma longa* L. es también referido por otras investigaciones realizadas tanto por TLC,<sup>83</sup> como reacciones en tubo.<sup>84</sup> Los valores de  $R_f$  para las manchas identificadas como flavonoides, utilizando como fase móvil *n*-hexano : acetona (8:2), se muestran en la **Tabla N° 3**.

**Tabla N° 3.** Valores de  $R_f$  de las manchas visibles en la placa cromatográfica para la identificación de flavonoides.

Mancha en placa con revelador y luz UV de 366 nm	$R_f$
1. <sup>a</sup>	0.06
2. <sup>a</sup>	0.14
3. <sup>a</sup>	0.18
4. <sup>a</sup>	0.26

### 3.3. Identificación de alcaloides

Se observa la presencia de alcaloides en el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. utilizado; evidenciado por la mancha naranja-marrón como resultado de la reacción con el reactivo de Dragendorff. La presencia de este metabolito secundario es también referido por otras investigaciones que evaluaron extractos de *Curcuma longa* L.<sup>85</sup>



**Figura 18.** Placa cromatográfica del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. para la identificación de alcaloides, con revelador (a), observado a  $\lambda$  254 nm (b) y 366 nm (c).

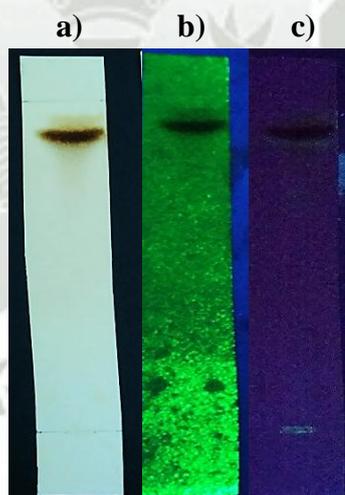
La **Tabla N° 4** muestra los valores de  $R_f$  de las tres manchas que se observan en la **Fig. 18 (a)**, que corresponden a los alcaloides presentes en el extracto.

**Tabla N° 4.** Valores de  $R_f$  de las manchas visibles en la placa cromatográfica para la identificación de alcaloides.

Mancha en placa con revelador	$R_f$
1. <sup>a</sup>	0.53
2. <sup>a</sup>	0.56
3. <sup>a</sup>	0.73

### 3.4. Identificación de taninos

La **Fig. 19** muestra la placa cromatográfica para la identificación de taninos, en el que se puede observar una sola mancha en la parte superior. La reacción positiva para los taninos es el cambio de coloración (a azul), luego de la aplicación del revelador ( $\text{FeCl}_3$  5 %), tal como indica Hashimoto y colaboradores,<sup>86</sup> por lo que es evidente la ausencia de este metabolito secundario en el extracto utilizado de *Curcuma longa* L.; este hallazgo es respaldado por estudios que señalan lo mismo.<sup>84</sup>

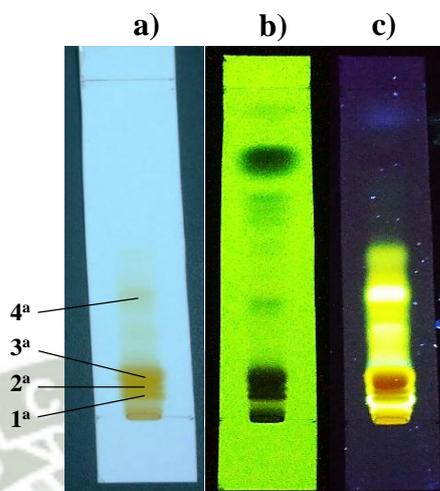


**Figura 19.** Placa cromatográfica del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. para la identificación de taninos, con revelador (a), observado a  $\lambda$  254 nm (b) y 366 nm (c).

### 3.5. Identificación de terpenos

Según señala Wagner y colaborador; la reacción es positiva (para terpenos) por la aparición de colores gris a marrón rojizo.<sup>87</sup> Tal como se observa en la **Fig. 20**, se deduce que el extracto etanólico de *Curcuma longa* L. presenta terpenoides en

cantidades pequeñas (por intensidad de las manchas rojiza-marrón). De igual forma que los anteriores metabolitos secundarios, también es respaldado por otros estudios como la de Pawar y colaboradores.<sup>84</sup>



**Figura 20.** Placa cromatográfica del extracto etanólico de *Curcuma longa* L. para la identificación de terpenos, con revelador (a), observado a  $\lambda$  254 nm (b) y 366 nm (c).

Los valores de  $R_f$  para las manchas identificadas como terpenos, utilizando como fase móvil tolueno:acetato de etilo (97:3), se muestran en la **Tabla N° 5**.

**Tabla N° 5.** Valores de  $R_f$  de las manchas visibles en la placa cromatográfica para la identificación de terpenos.

Mancha en placa con revelador	$R_f$
1. <sup>a</sup>	0.07
2. <sup>a</sup>	0.09
3. <sup>a</sup>	0.12
4. <sup>a</sup>	0.35

#### 4. Preparación del gel

Al extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., (escogido por las razones mencionadas en las secciones anteriores), se le dio forma farmacéutica por medio de la preparación de un gel. El desarrollo de la forma farmacéutica utilizada se muestra en la **Tabla N° 6**.

**Tabla N° 6.** Desarrollo de la formulación del gel al 10 % de extracto blando del rizoma de *Curcuma longa* L.

Rp.

**GEL DE CURCUMA**

Extracto blando de <i>Curcuma longa</i> L. (rizoma)	10 g
Carbopol 940	1 g
Propilenglicol	10 g
Metilparabeno	0.1 g
Trietanolamina c.s.p.	pH 5.0-5.5
Agua destilada c.s.p.	100 mL

El gel (**Fig. 21**) fue preparado tal como se indica en la parte metodológica. Este gel mostró características macroscópicas, tales como un color amarillo-naranja homogéneo, una textura suave y un olor característico del extracto de *Curcuma longa* L. Estas características del gel permanecieron similares durante todo el desarrollo del presente trabajo de investigación. Características similares se han reportado en geles preparados con formulaciones similares, donde el principio activo fue la curcumina.<sup>88,89</sup> El desarrollo de la fórmula para la elaboración del gel al 10 % del extracto blando del rizoma de *Curcuma longa* L. se muestra en la **Tabla N° 6**.



**Figura 21.** Gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.

## 5. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

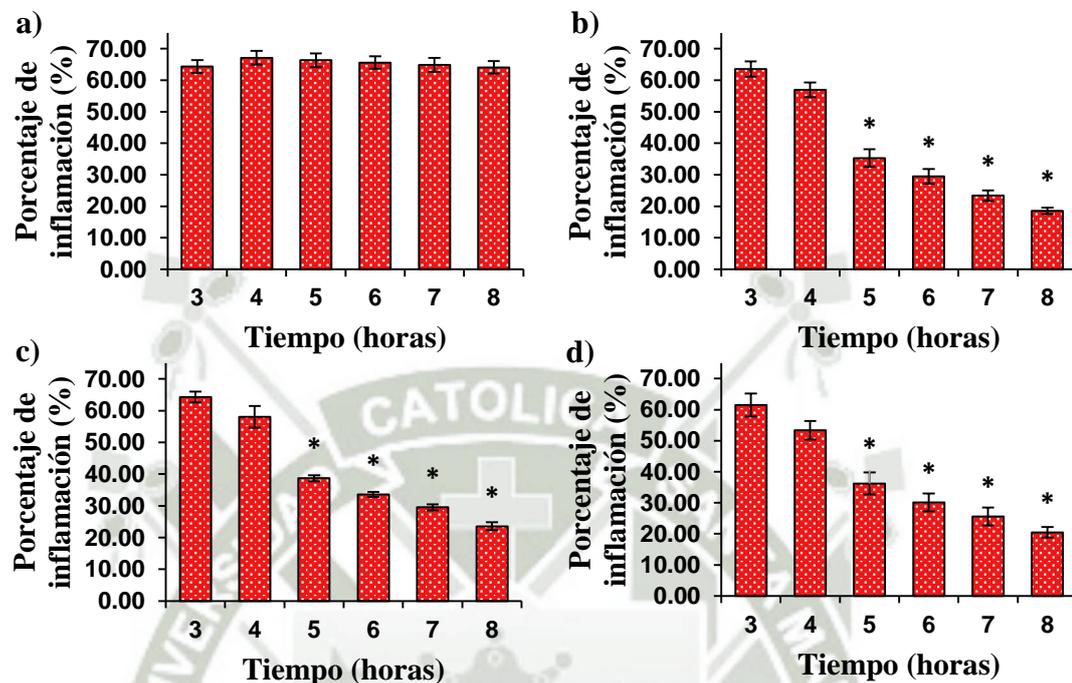
Por medio de la administración subcutánea de la carragenina, en el lado plantar de la pata de las ratas, se produjo una inflamación aguda. Esta inflamación se muestra en la **Fig. 22**. Por lo que se corroboró el resultado del procedimiento descrito por Winter *C et al.* en 1962.<sup>64</sup> Asimismo, existen abundantes investigaciones que han evaluado diversos extractos vegetales, utilizando este modelo experimental para el estudio de la inflamación,<sup>90-92</sup> pudiéndose establecer que es un modelo altamente reproducible.



**Figura 22.** Edema plantar en una rata inducido por carragenina.

Una vez que se estableció que la inducción del edema plantar de las ratas fue factible y que se verificó el adecuado funcionamiento del pletismómetro, se prosiguió con la aplicación del diseño experimental. Como se describió en la metodología (sección 4.5.3) el diseño experimental constó de un grupo control negativo (excipientes), un grupo control positivo (gel diclofenaco sódico 1%), un grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.), y un grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.), con la finalidad de investigar la actividad antiinflamatoria de los dos grupos experimentales. La **Fig. 23** muestra los porcentajes de inflamación de las patas de las ratas luego de la administración subcutánea de la carragenina. Como se discutió en los resultados del estudio preliminar se tomó como punto de control los datos obtenidos en la 3 h (tiempo en el cual se produjo la máxima inflamación). Este control fue comparado con los resultados obtenidos en las horas posteriores (4-8 h) en las cuales se evaluó la aplicación del gel de diclofenaco sódico al 1 %, la suspensión al 10 % de extracto

blando etanólico y gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L., esta comparación se realizó estadísticamente para cada grupo mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett.



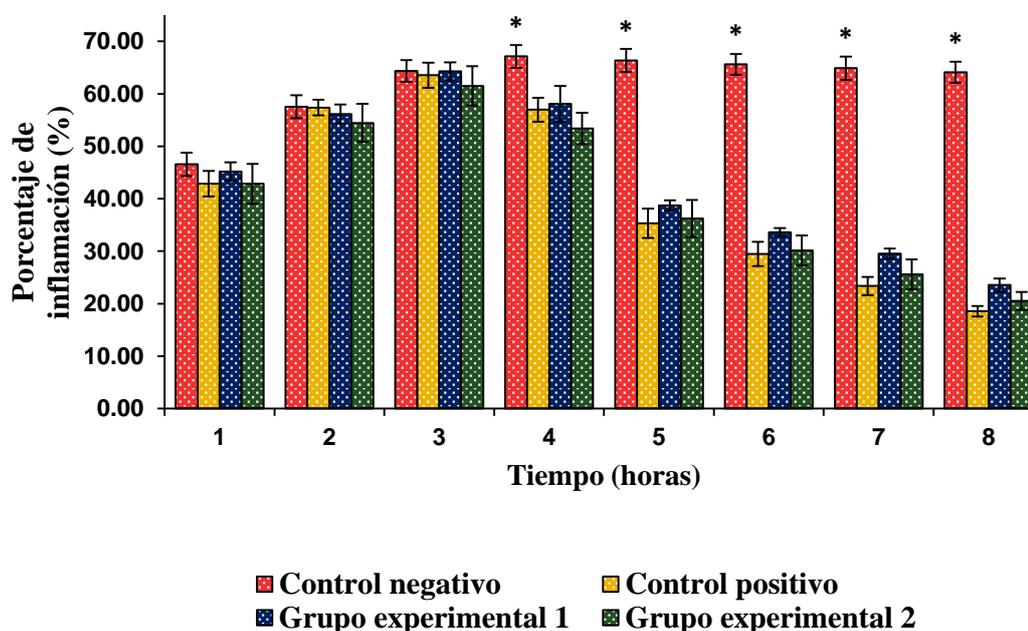
**Figura 23.** Comparación entre los porcentajes de inflamación de las patas de las ratas luego de la inducción del edema y evaluación de los grupos establecidos en el diseño experimental a diferentes tiempos. Los valores son presentados como promedio  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Con diferencia significativa entre el control (3 h) y las horas posteriores (aplicación de los extractos), \* ( $p < 0.05$ ). ANOVA seguido de prueba de Dunnett. a) control negativo (excipientes), b) control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %), c) grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.), y d) grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.).

Los resultados que se muestran en la **Fig. 23** reportan en cuanto al grupo control negativo que entre las 3 h y 8 h no hay diferencia significativa entre estas horas. A este grupo solo se le indujo el edema plantar con carragenina, y el tratamiento fueron los excipientes (carbopol, propilenglicol, metilparabeno y trietanolamina) que se utilizaron para preparar el gel, por lo que se podría indicar que estos excipientes no presentan ningún efecto antiinflamatorio. En el estudio realizado por Belango Y *et al.* donde se evaluó el efecto antiinflamatorio de un gel (con excipientes similares a los de este trabajo de investigación) obtenido de un extracto vegetal, su control negativo consistió también en los excipientes que utilizaron para preparar su gel y de

forma semejante, esta formulación no mostro capacidad antiinflamatoria.<sup>93</sup> Además, se observó que el efecto de la carragenina llego a un máximo porcentaje de inflamación a las 3 h, y este efecto inflamatorio no presento ningún cambio significativo hasta las 8 h. Esto corrobora la reproducibilidad de este método, el cual ha demostrado un comportamiento similar en otras investigaciones.<sup>94</sup> Por otro lado, se observó que el gel de diclofenaco sódico al 1 %, la suspensión al 10 % de extracto blando etanólico y el gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizomas de *Curcuma longa* L. mostraron un efecto antiinflamatorio estadísticamente significativo a partir de 5 h (2 h después de la aplicación de estas sustancias), por lo que se puede establecer que el extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. y el gel al 10 % a base de este extracto blando presentaran un efecto antiinflamatorio significativo, a un tiempo de acción similar al de una forma farmacéutica comercial, como es el gel de diclofenaco sódico al 1 %. Se ha reportado un estudio que indica que el gel de diclofenaco sódico al 1 % tuvo un tiempo de acción 2 h después de su aplicación, lo que concordaría con el hallazgo encontrando en esta investigación.<sup>95</sup>

Por otro lado, la **Fig. 24** reporta la comparación de los porcentajes de inflamación de los diferentes grupos del diseño experimental (control negativo (excipientes), control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %), grupo experimental 1 (suspensión al 10% de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.) y un grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.)), a cada hora en un intervalo de 1-8 h. Los datos tuvieron un tratamiento estadístico mediante una prueba de ANOVA seguida de la prueba de Tukey. Este grafico muestra que entre la 1 h y la 3 h no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos a cada hora, esto se debería a que en este periodo de tiempo todos los animales de experimentación de los grupos tuvieron una similar inducción del edema plantar por medio de la carragenina. Además; se observó que en el intervalo de tiempo de 4 h a 8 h, la prueba estadística del ANOVA indicó que, sí existió diferencia significativa entre los grupos, debido a esto se aplicó la prueba de Tukey, la cual mostró que el grupo que tuvo un porcentaje de inflamación diferente fue el grupo control negativo. Este resultado demuestra que el gel de diclofenaco sódico al 1 %, la suspensión al 10 % de extracto blando etanólico

del rizoma de *Curcuma longa* L. y gel al 10% de este extracto blando presentan un efecto antiinflamatorio significativo en relación al grupo control negativo, el cual solo constituyó de los excipientes del gel.

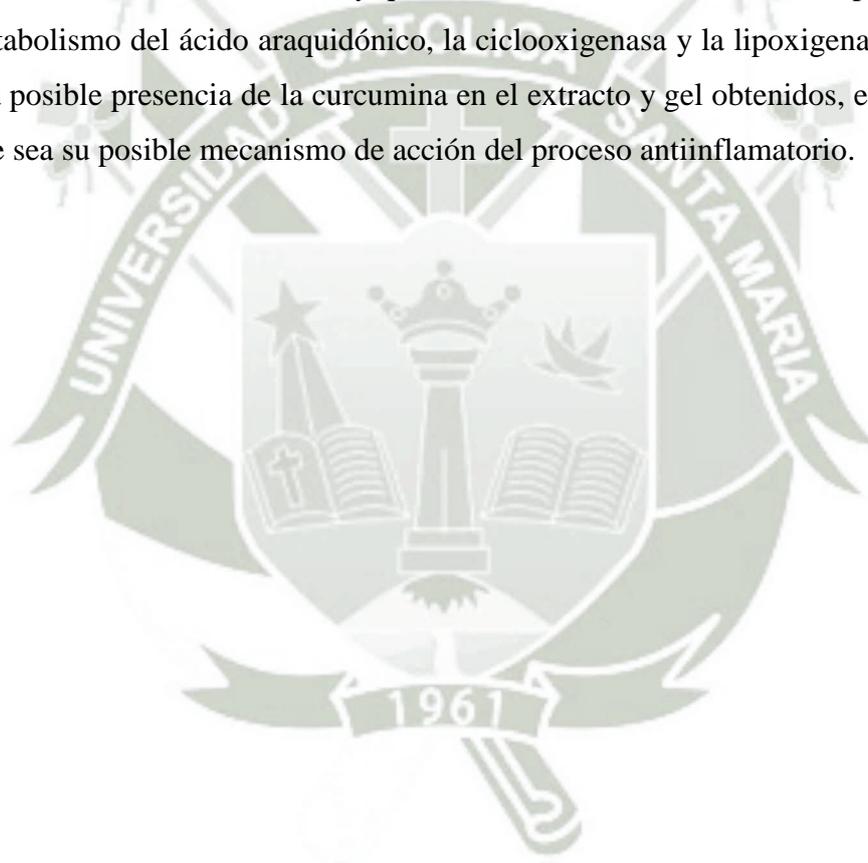


**Figura 24.** Comparación entre los porcentajes de inflamación de las patas de las ratas entre evaluación de los grupos establecidos en el diseño experimental a diferentes tiempos. Los valores son presentados como promedio  $\pm$  SEM (n=5). Con diferencia significativa entre todos los grupos por cada hora, \* ( $p < 0.05$ ). ANOVA seguido de prueba de Tukey.

Asimismo, se observa que en el periodo de tiempo de 4 h a 8 h, no hubo diferencia significativa entre el gel de diclofenaco sódico al 1%, la suspensión al 10% de extracto blando etanólico del rizoma de cúrcuma longa l. y gel al 10% de este extracto blando pudiéndose señalar que tanto el extracto blando como el gel a base de este extracto presentaron un efecto antiinflamatorio similar al del producto comercial (gel diclofenaco sódico al 1%), esto permitiría indicar que el gel de este material vegetal podría ser utilizado como una alternativa natural en el tratamiento de la inflamación, tal como se ha reportado otros geles elaborados a partir de extractos vegetales.<sup>93,96</sup> Por otro lado, la suspensión al 10% de extracto blando etanólico y gel al 10% de este extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. tuvieron un efecto similar, pudiéndose establecer que darle una forma farmacéutica (gel) a este extracto blando de *Curcuma longa* L. no afecta sus propiedades farmacológicas.

Un comportamiento similar se ha reportado en el gel de un extracto de hojas de Sampaguita, donde la formulación de este gel tampoco afecta sus propiedades antiinflamatorias.<sup>93</sup>

Este efecto antiinflamatorio del extracto blando etanólico de los rizomas de *Curcuma longa* L. podría atribuirse a los curcuminoides que posee, especialmente a la curcumina, que como se señaló en la sección 3.1 de los resultados probablemente se encuentre en este extracto. Existen diversas investigaciones que han indicado que la curcumina presenta un efecto antiinflamatorio, ya que inhibe la expresión de distintas citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral, interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12) y quimiocinas. Además, la curcumina puede inhibir el metabolismo del ácido araquidónico, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa.<sup>97,98</sup> Debido a la posible presencia de la curcumina en el extracto y gel obtenidos, es probable que este sea su posible mecanismo de acción del proceso antiinflamatorio.



## CONCLUSIONES

1. Los extractos del rizoma de *Curcuma longa* L. fueron obtenidos mediante el método de extracción por Soxhlet, con tres disolventes de diferente polaridad: etanol, *n*-butanol y éter de petróleo, con los cuales se obtuvo un rendimiento de  $21.77 \pm 0.38\%$ ,  $15.60 \pm 0.46\%$  y  $1.32 \pm 0.12\%$ , respectivamente.
2. La suspensión al 10 % del extracto blando etanólico y la suspensión al 10 % del extracto blando butanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. tuvieron un efecto antiinflamatorio estadísticamente similar y mayor a la suspensión al 10 % del extracto blando de éter de petróleo. Debido a esto, el extracto blando etanólico fue elegido para las siguientes pruebas, ya que mostró un mayor rendimiento y menor costo.
3. Los principales grupos de metabolitos secundarios del extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. fueron identificados mediante cromatografía de capa fina. Estos fueron: curcuminoides, flavonoides, alcaloides y terpenos. Dentro de los curcuminoides se evidenció la posible presencia de la curcumina.
4. El gel a base del 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. fue preparado utilizando como excipientes: carbopol (1 %), propilenglicol (10 %), metilparabeno (0.1 %) y trietanolamina. Sus características macroscópicas fueron: un color amarillo-naranja homogéneo, una textura suave y un olor característico del extracto.
5. No hubo diferencia significativa entre el efecto antiinflamatorio del gel comercial (diclofenaco sódico al 1 %) con la suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L. y el gel al 10 % a base de este extracto blando, a partir de la segunda hora de su aplicación.

## SUGERENCIAS

1. Profundizar la identificación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos del rizoma de *Curcuma longa* L. y establecer cuáles son los responsables del efecto antiinflamatorio.
2. Evaluar la toxicidad de los extractos del rizoma de *Curcuma longa* L.
3. Realizar un análisis de estabilidad y evaluar los parámetros fisicoquímicos del gel obtenido a partir del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* L.
4. Evaluar otros efectos farmacológicos (antioxidante, antimicrobiano, antidiabético, hepatoprotector, etc.) de los extractos del rizoma de *Curcuma longa* L.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Sarkhel S. Evaluation of the anti-inflammatory activities of Quillaja saponaria Mol. saponin extract in mice. *Toxicol Reports*. Elsevier Ireland Ltd; 2016;3:1–3.
2. Xu Q, Wang Y, Guo S, Shen Z, Wang Y, Yang L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. *J Ethnopharmacol*. Elsevier; 2014;152(3):540–5.
3. Hyun TK, Ko Y-J, Kim E-H, Chung I-M, Kim J-S. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Ind Crops Prod*. Elsevier B.V.; 2015;74:263–70.
4. Ibrahim B, Sowemimo A, Van Rooyen A, Van De Venter M. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). *J Ethnopharmacol*. Elsevier Ireland Ltd; 2012;141(1):282–9.
5. Bagad AS, Joseph JA, Bhaskaran N, Agarwal A. Comparative Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Curcuminoids, Turmerones, and Aqueous Extract of *Curcuma longa*. *Adv Pharmacol Sci*. 2013;2013:1–7.
6. ITIS. *Curcuma longa* L. Integrated Taxonomic Information System. 2017.
7. Lim T. *Curcuma longa*. In: *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Switzerland: Springer; 2016. p. 241–362.
8. Ross I. *Curcuma longa*. In: *Medicinal Plants of the World*. 2nd ed. New Jersey: Humana Press Inc.; 2003. p. 227–52.
9. Dharmananda S. *Turmeric: What's in an herb name?* Oregon: Institute for Traditional Medicine; 1999. p. 1–3.
10. Velasco J, Navarro P. Actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* (guisador), mediante el método de macrodilución frente a *S. aureus* y *E. coli*. *Universidad Nacional De La Amazonía Peruana*; 2013.
11. Omosa L, J M, V K. *Curcuma longa*. In: *Medicinal spices and vegetables from Africa*. USA: Elsevier; 2017. p. 425–35.
12. Zhu J. *Curcuma longa* L. In: *Dietary Chinese Herbs*. Vienna: Springer; 2015. p. 107–12.

13. Sasikumar B. Turmeric. In: Handbook of Herbs and Spices. Elsevier; 2012. p. 526–46.
14. Ahmad W, Hasan A. Curcuma longa, Linn – A Review. Hippocrat J Unani Med. 2017;5(4):179–90.
15. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1B generation. Clin Exp Immunol. 2006 Nov;147:227–35.
16. Weiss U. Inflammation. Nature. 2008 Jul;454(7203):427–427.
17. Jain P, Pandey R, Shukla SS. Inflammation: Natural Resources and Its Applications. SpringerBriefs in Immunology. New Delhi: Springer; 2015. 1-156 p. (SpringerBriefs in Immunology).
18. Schmid-Schönbein GW. Analysis of Inflammation. Annu Rev Biomed Eng. 2006 Aug;8(1):93–151.
19. Williams TJ, Peck MJ. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. Nature. 1977 Dec;270:530–2.
20. Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. In: Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology. EEUU: Elsevier; 2004. p. 385–405.
21. Friedl HP, Till GO, Trentz O, Ward P a. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. Am J Pathol. 1989;135(1):203–17.
22. Downey GP, Worthen GS, Henson PM, Hyde DM. Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Am Rev Respir Dis. 1993;147(1):168–76.
23. Pearson MJ, Lipowsky HH. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. Am J Physiol Circ Physiol. 2000;279(4):1460–71.
24. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. J Leukoc Biol. 1994;55(5):662–75.
25. Muro S, Wiewrodt R, Thomas A, Koniaris L, Albelda SM, Muzykantov VR, *et al.* A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. J Cell Sci. 2003;116:1599–609.
26. Luster A. Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. N

- Engl J Med. 1998;338(7):436–45.
27. Seely A, Pascual J, Christou N. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit care*. 2003;7(4):291–307.
  28. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454:428–35.
  29. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, Poll T Van Der. In ammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):536–45.
  30. Pawlinski R. Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model. *Blood*. 2003 May;101(10):3940–7.
  31. Kirschfink M. Controlling the complement system in inflammation. *Immunopharmacology*. 1997;38(1):51–62.
  32. Libby P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutr Rev*. 2007;2007(2):140–6.
  33. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, *et al*. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 1999;162(6):3256–62.
  34. White M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Mar;103(3):S378–81.
  35. Shajib MS, Khan WI. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol*. 2015;213(3):561–74.
  36. Livingston M, Heaney L, Ennis M. Adenosine, inflammation and asthma - A review. *Inflamm Res*. 2004;53(5):171–8.
  37. Steinhubl SR. Platelets as Mediators of Inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007;21(1):115–21.
  38. Yost CC, Weyrich AS, Zimmerman GA. The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie*. Elsevier; 2010;92(6):692–7.
  39. Kaplan AP, Joseph K, Silverberg M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(2):195–209.
  40. Davis B, Rothenberg M. Inflammatory and Effector Cells/Cell Migration. In: *Pediatric Allergy: Principles and Practice*. 3rd Ed. Elsevier; 2016. p. 41–53.

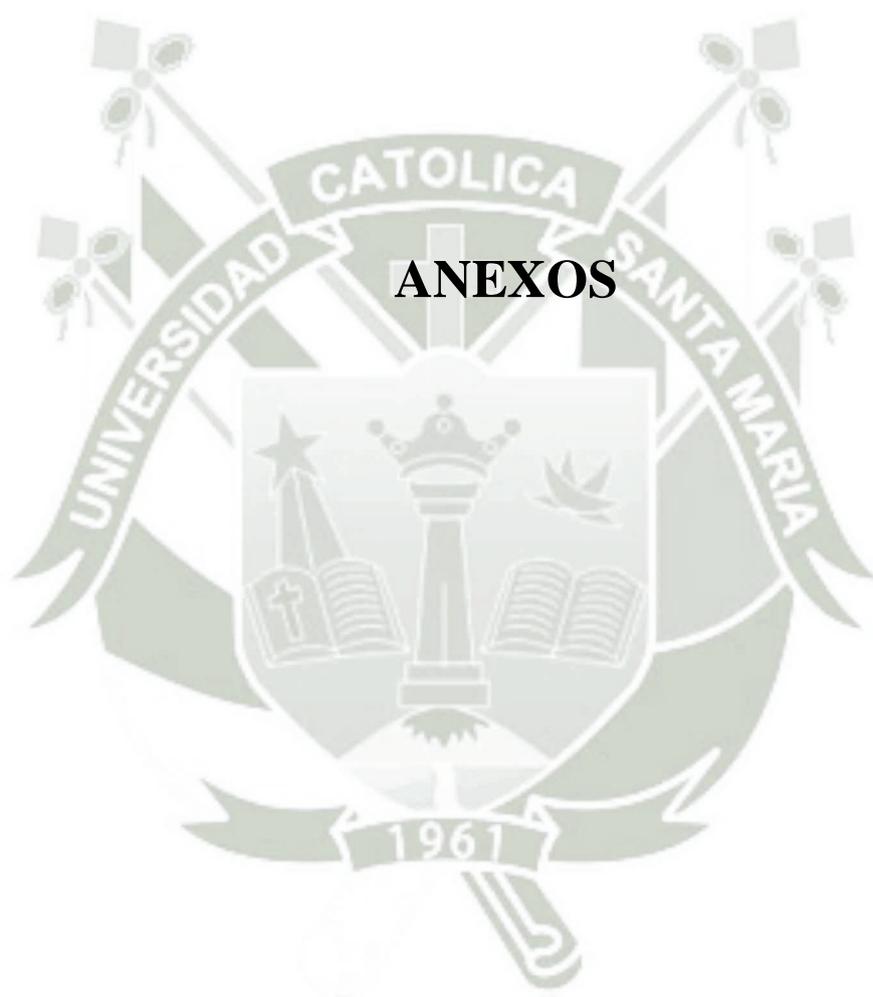
41. Lan HY. Anti-inflammatory Drugs. In: Encyclopedia of Cancer. Berlin: Springer; 2015. p. 283–6.
42. Van der Velden VH. Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators Inflamm.* 1998;7(4):229–37.
43. Recio C, Andújar I, Ríos JL. Anti-Inflammatory Agents from Plants: Progress and Potential. *Curr Med Chem.* 2012;19(14):2088–103.
44. Ghasemian M, Owlia S, Owlia M. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. *Adv Pharmacol Sci. Hindawi;* 2016;2016:1–11.
45. Vazquez E, Navarro M, Salazar Y, Crespo G, Bruges G, Osorio C, *et al.* Systemic changes following carrageenan-induced paw inflammation in rats. *Inflamm Res.* 2015;64(5):333–42.
46. Morris CJ. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. In: *Inflammation Protocols.* New Jersey: Humana Press; 2003. p. 115–22.
47. Azwanida N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants.* 2015;4(3):3–8.
48. Luque de Castro MD, Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *J Chromatogr A. Elsevier B.V.;* 2010;1217(16):2383–9.
49. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African J Tradit Complement Altern Med.* 2011;8(1):1–10.
50. Bora A, Deshmukh S, Swain K. Recent advances in semisolid dosage form. *Int J Pharm Sci Res.* 2014;5(9):3594–608.
51. Nwoko V. Review Article Semi Solid dosage Forms Manufacturing : Tools, Critical Process Parameters, Strategies, Optimization and Validation. *Sch Acad J Pharm.* 2014;3(2):153–61.
52. Gennaro AR. Geles. In: *Remington farmacia.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003. p. 867–9.
53. Kumar R, Arora S, Singh S. Formulation and development of herbal cucumber gel for sunscreen and anti-oxidant activities. *J Pharm Pharm Sci.* 2016;5(6):747–58.
54. Pandey A, Jagtap J, Polshettiwar S. Formulation and Evaluation of in - Vitro Antimicrobial Activity of Gel Containing Essential Oils and Effect of Polymer

- on Their Antimicrobial Activity. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(1):234–7.
55. Boligon AA, da Rosa Moreira L, Piana M, de Campos MMA, Oliveira SM. Topical antiedematogenic and anti-inflammatory effect of *Scutia buxifolia* Reissek gel and stability study. *J Photochem Photobiol B Biol. Elsevier B.V;* 2017;167:29–35.
56. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio. *Inst Nac Salud/Ministerio Salud.* 2008;1–54.
57. Santiago M, Strobel S. Thin Layer Chromatography. In: *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate.* Elsevier; 2013. p. 303–24.
58. Spangenberg B, Poole C, Weins C. Theoretical Basis of Thin Layer Chromatography (TLC). In: *Quantitative Thin-Layer Chromatography.* Berlin: Springer; 2010. p. 13–52.
59. Wagner H, Blatt S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.* 2nd ed. Springer; 1996. 1-357 p.
60. Freire-gonzález R, Vistel-vigo M. Caracterización fitoquímica de la *Curcuma longa* L. *Rev Cuba Química.* 2015;27(1):9–18.
61. Wagner H, Blatt S, Zgainski EM. *Plant Drug Analysis.* Berlin: Springer; 1984.
62. Dantas M, Reis S, Damasceno C, Rolim L, Rolim-Neto P, Carvalho F, *et al.* Development and Evaluation of Stability of a Gel Formulation Containing the Monoterpene Borneol. *Sci World J.* 2016;20:10–3.
63. Whiteley P, Dalrymple S. Models of Inflammation: Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat. *Curr Protoc Pharmacol.* 1998;5:4–6.
64. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Exp Biol Med.* 1962;111(3):544–7.
65. McCarson KE. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. In: *Current Protocols in Pharmacology.* Hoboken, NJ, USA: Wiley; 2015. p. 1–9.
66. Hajhashemi V, Minaiyan M, Banafshe HR, Mesdaghinia A, Abed A. The anti-inflammatory effects of venlafaxine in the rat model of carrageenan-induced paw edema. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(7):654–8.
67. PanLab. Pletismómetro digital. In: *Harvard Apparatus.* Barcelona; 2017. p. 1–2.

68. La Torre-Villalba L. Evaluación del efecto antiinflamatorio de *Zingiber officinale roscoe* (jengibre) en animales de experimentación. Universidad Católica de Santa María; 2014.
69. Samud AM, Asmawi MZ, Sharma JN, Yusof APM. Anti-inflammatory activity of *Crinum asiaticum* plant and its effect on bradykinin-induced contractions on isolated uterus. *Immunopharmacology*. 1999;43(2):311–6.
70. Sharma JN, Samud AM, Asmawi MZ. Short communication Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice. *Inflammopharmacology*. 2004;12(1):89–94.
71. Altman DG, Bland JM. Standard deviations and standard errors. *BMJ*. 2005;331(7521):903.
72. Kulkarni SJ, Maske KN, Budre MP, Mahajan RP. Extraction and purification of curcuminoids from Turmeric (*curcuma longa* L.). *Int J Pharmacol Pharm Technol*. 2012;1(2):81–4.
73. Nabati M, Mahkam M, Heidari H. Isolation and characterization of curcumin from powdered rhizomes of turmeric plant marketed in Maragheh city of Iran with soxhlet technique. *Iran Chem Commun*. 2014;2:236–43.
74. Jansirani D, Saradha R, Salomideborani N, Selvapriyadharshini J. Comparative evaluation of various extraction methods of curcuminoids from *Curcuma longa*. *J Chem Pharm Sci*. 2014;4:286–8.
75. Joshi P, Jain S, Sharma V. Turmeric (*Curcuma longa*) a natural source of edible yellow colour. *Int J Food Sci Technol*. 2009;44(12):2402–6.
76. Kumar S, Ganachari MS, Banappa, Nagoor VS. Anti-Inflammatory Activity of *Ziziphus jujuba* Lam Leaves Extract in Rats. *J Nat Remedies*. 2004;4(2):183–5.
77. Martin RCG, Aiyer HS, Malik D, Li Y. Effect on pro-inflammatory and antioxidant genes and bioavailable distribution of whole turmeric vs. curcumin: Similar root but different effects. *Food Chem Toxicol*. Elsevier Ltd; 2012;50(2):227–31.
78. Revathy S, Elumalai S, Benny M, Antony B. Isolation , Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric ( *Curcuma longa* L .) by Column Chromatography. *J Exp Sci*. 2011;2(7):21–5.

79. Hartwig A. *n*-Butyl alcohol. In: The MAK-collection for occupational health and safety. Wiley; 2013. p. 99–115.
80. Pawar R, Toppo F, Mandloi A, Shaikh S. Exploring the role of curcumin containing ethanolic extract obtained from *Curcuma longa* (rhizomes) against retardation of wound healing process by aspirin. *Indian J Pharmacol.* 2015;47(2):160.
81. Verma SC, Jain CL, Rani R, Pant P, Singh R, Padhi MM, *et al.* Simple and Rapid Method for Identification of *Curcuma Longa* Rhizomes by Physicochemical and HPTLC Fingerprint Analysis. *Chem Sci Trans.* 2012 Aug 25;1(3):709–15.
82. Wagner H, Bladt S. Flavonoid Drugs Including Ginkgo Biloba and Echinaceae Species. In: *Plant Drug Analysis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 195–245.
83. Safitri A, Batubara I, Khumaida N. Thin layer chromatography fingerprint, antioxidant, and antibacterial activities of rhizomes, stems, and leaves of *Curcuma aeruginosa* Roxb. *J Phys Conf Ser.* 2017 May 17;835:12014.
84. Pawar H, Karde M, Mundle N, Jadhav P, Mehra K. Phytochemical Evaluation and Curcumin Content Determination of Turmeric Rhizomes Collected From Bhandara District of Maharashtra (India). *Med Chem (Los Angeles).* 2014;4(8):588–91.
85. Wagner H, Bladt S. Alkaloid Drugs. In: *Plant Drug Analysis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 3–51.
86. Hashimoto F, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and Related Compounds. LVI Isolation of Four New Acylated Flavan-3-ols from Oolong Tea. *Chem Pharm Bull.* 1987;35(2):611–6.
87. Wagner H, Bladt S. Drugs Containing Sweet-Tasting Terpene Glycosides. In: *Plant Drug Analysis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 329–33.
88. Hosadurga R, Rao S, Jose J, Rompicharla N, Shakil M, Shashidhara R. Evaluation of the efficacy of 2% curcumin gel in the treatment of experimental periodontitis. *Pharmacognosy Res.* 2014;6(4):326–33.
89. Sharma S, Pawar S, Jain U. Development and evaluation of topical gel of

- curcumin from different combination of polymers formulation & evaluation of herbal gel. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2012;4(4):452–6.
90. Boeris MA, Toso RE, Skliar MI. Actividad antiinflamatoria de *Salpichroa originifolia*. *Acta Farm Bonaer.* 2004;23(2):138–41.
91. Enciso E, Arroyo J. Efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de las hojas de *Jungia rugosa* Less (matico de puna) en un modelo experimental en ratas. *An Fac med.* 2011;72(4):231–7.
92. Li CW, Wu XL, Zhao XN, Su ZQ, Chen HM, Wang XF, *et al.* Anti-inflammatory property of the ethanol extract of the root and rhizome of *Pogostemon cablin* (Blanco) benth. *Sci World J.* 2013;2013:1–12.
93. Belango Y, Cruz A, Miguel R, Rotairo C, Oli R. Anti-inflammatory Property of the Formulated Topical Gel from the Crude Leaf Extracts of *Sampaguita* (*Jasminum sambac* L. Family: Oleaceae). *Int J Chem Eng Appl.* 2016;7(3):199–203.
94. Lalan B, Hiray R, Ghongane B. Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of Extract of *Holoptelea integrifolia* and *Argyrea Speciosa* in Animal Models. *J Clin Diagnostic Res.* 2015;9(7):1–4.
95. Awasthi S, Irshad M, Das M, Ganti S, Rizvi M. Anti-Inflammatory Activity of *Calotropis gigantea* and *Tridax procumbens* on Carrageenin-Induced Paw Edema in Rats. *Acta Pol Pharm Drug Res.* 2006;63(4):277–80.
96. Negi A, Sharma N, Singh MF. Formulation and Evaluation of an Herbal Anti-Inflammatory Gel Containing *Eupatorium* Leaves Extract. *Formul Eval an Herb Anti-inflamm Gel Contain Eupatorium Leaves Extr.* 2012;1(4):112–7.
97. Kohli K, Ali J, Ansari M, Raheman Z. Curcumin: a natural antiinflammatory agent. *Indian J Pharmacol.* 2005;37(3):141–7.
98. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev.* 2009;14(2):141–53.



## Anexo 1

### 1. Certificado de identificación de la *Curcuma longa* Linn



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN**  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA  
*HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)*



#### CONSTANCIA 08- 2017-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense (HUSA)* de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

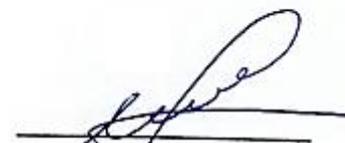
HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca traída al laboratorio para el análisis botánico, por el Bachiller Robert Jimmy Lajo Flores de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, para la realización de su Tesis «Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos y gel de rizoma de *Curcuma longa* Linn "palillo" en ratas sometidas a inflamación subplantar con carragenina. Arequipa 2016» Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde:

DIVISION: Magnoliophyta  
CLASE: Liliopsida  
SUBCLASE: Zingiberidae  
ORDEN: Zingiberales  
FAMILIA: Zingiberaceae  
GENERO: *Curcuma*  
ESPECIE: *Curcuma longa* L.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 14 de Mayo del 2017



Bgo. Leoncio Mariño Herrera  
DIRECTOR  
*Herbarium Arequipense (HUSA)*

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado  
Teléfono: (054) 237755 / 993659045  
Apartado Postal: 0028  
AREQUIPA – PERÚ

## Anexo 2

### 1. Preparación de los extractos de *Curcuma longa* Linn

#### a) Porcentaje de rendimiento de los extractos de rizomas de *Curcuma longa* Linn

	Extractos								
	Etanólico			<i>n</i> -butanólico			De éter de petróleo		
Masa del material vegetal (g)	10.0053	10.0068	10.0069	10.0025	10.0025	10.0032	10.0058	10.0010	10.0032
Masa del vaso (g)	114.8653	109.7832	117.0010	103.9671	113.7475	109.3472	102.7607	102.7509	109.2331
Masa del vaso + extracto blando (g)	116.9682	111.989	119.226	105.4676	115.3971	110.8773	102.9132	102.8614	109.3656
Masa del extracto blando (g)	2.1029	2.2059	2.2249	1.5005	1.6496	1.5301	0.1525	0.1105	0.1325
Porcentaje de rendimiento de extracción	21.02	22.04	22.23	15.00	16.49	15.30	1.52	1.10	1.32
$\bar{X}$	21.77			15.60			1.32		
SEM	0.38			0.46			0.12		

#### b) ANOVA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	660.02	2	330.01	904.17	3.616E-08	5.14
Dentro grupos	2.19	6	0.36			
Total	662.21	8				

#### c) Test de Tukey

Extracto	Cuenta	Promedio del porcentaje de rendimiento de extracción	Grupos homogéneos
Etanólico	3	21.77	X
<i>n</i> -butanólico	3	15.60	X
De éter de petróleo	3	1.32	X

### Anexo 3

#### 1. Estudio preliminar de la actividad antiinflamatoria de los extractos blandos del rizoma de *Curcuma longa* Linn

##### a) Volúmenes del edema plantar a diferentes tiempos luego de la inducción del edema y aplicación de las suspensiones a base de los extractos blandos del rizoma de *Curcuma longa* Linn

Suspensión a base de extracto blando		Volúmenes (mL) del edema plantar a diferentes tiempos								
		0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h
Etanólico	1	0.87	1.23	1.27	1.37	1.27	1.13	1.08	1.07	1.06
	2	0.82	1.18	1.27	1.33	1.28	1.15	1.12	1.02	1.04
	3	0.91	1.22	1.34	1.44	1.35	1.19	1.13	1.11	1.09
<i>n</i> -butanólico	1	0.88	1.26	1.35	1.38	1.33	1.23	1.18	1.14	1.12
	2	0.74	1.03	1.09	1.19	1.13	1.01	0.95	0.93	0.92
	3	0.83	1.18	1.29	1.36	1.32	1.19	1.14	1.09	1.07
De éter de petróleo	1	0.84	1.23	1.32	1.35	1.31	1.25	1.18	1.17	1.13
	2	0.85	1.13	1.23	1.34	1.25	1.23	1.19	1.15	1.12
	3	0.77	1.15	1.26	1.30	1.28	1.25	1.17	1.13	1.08

##### b) Porcentajes de inflamación del edema plantar a diferentes tiempos luego de la inducción del edema y aplicación de las suspensiones a base de los extractos blandos del rizoma de *Curcuma longa* Linn

Suspensión a base de extracto blando		Porcentaje de Inflamación del edema plantar a diferentes tiempos								
		0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h
Etanólico	1	0.00	41.38	45.98	57.47	45.98	29.89	24.14	22.99	21.84
	2	0.00	43.90	54.88	62.20	56.10	40.24	36.59	24.39	26.83
	3	0.00	34.07	47.25	58.24	48.35	30.77	24.18	21.98	19.78
	$\bar{x}$	0.00	39.78	49.37	59.30	50.14	33.63	28.30	23.12	22.82
	SEM	0.00	2.95	2.78	1.46	3.06	3.32	4.14	0.70	2.09
<i>n</i> -butanólico	1	0.00	43.18	53.41	56.82	51.14	39.77	34.09	29.55	27.27
	2	0.00	39.19	47.30	60.81	52.70	36.49	28.38	25.68	24.32
	3	0.00	42.17	55.42	63.86	59.04	43.37	37.35	31.33	28.92
	$\bar{x}$	0.00	41.51	52.04	60.49	54.29	39.88	33.27	28.85	26.84
	SEM	0.00	1.20	2.44	2.04	2.41	1.99	2.62	1.67	1.34
De éter de petróleo	1	0.00	46.43	57.14	60.71	55.95	48.81	40.48	39.29	34.52
	2	0.00	32.94	44.71	57.65	47.06	44.71	40.00	35.29	31.76
	3	0.00	49.35	63.64	68.83	66.23	62.34	51.95	46.75	40.26
	$\bar{x}$	0.00	42.91	55.16	62.40	56.41	51.95	44.14	40.44	35.52
	SEM	0.00	5.05	5.55	3.34	5.54	5.33	3.91	3.36	2.50

**c) ANOVA – Control (3h) vs. Tiempos posteriores**

**c.1) Aplicación de la suspensión a base de extracto blando etanólico a diferentes tiempos**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	3442.08	5	688.42	30.93	< 0.001	3.10
Dentro grupos	267.01	12	22.25			
Total	3709.09	17				

**c.2) Aplicación de la suspensión a base de extracto blando *n*-butanólico a diferentes tiempos**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	2895.0	5	579.00	45.59	< 0.001	3.10
Dentro grupos	152.41	12	12.70			
Total	3047.41	17				

**c.3) Aplicación de la suspensión a base de extracto blando de éter de petróleo a diferentes tiempos**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	1560.50	5	312.10	6.06	< 0.001	3.10
Dentro grupos	617.95	12	51.50			
Total	2178.45	17				

**d) Prueba de Dunnett - Control (3h) vs. Tiempos posteriores**

**d.1) Aplicación de la suspensión a base de extracto blando etanólico a diferentes tiempos**

Comparación	Dif. de promedios	q'	p	p<0.05
8h vs. 3h	36.487	9.473	< 0.001	Si
7h vs. 3h	36.184	9.395	< 0.001	Si
6h vs. 3h	31.003	8.050	< 0.001	Si
5h vs. 3h	25.670	6.665	< 0.001	Si
4h vs. 3h	9.161	2.378	0.123	No

**d.2) Aplicación de la suspensión a base de extracto blando *n*-butanólico a diferentes tiempos**

Comparación	Dif. de promedios	q'	p	p<0.05
8h vs. 3h	33.657	11.567	< 0.001	Si
7h vs. 3h	31.646	10.876	< 0.001	Si
6h vs. 3h	27.222	9.356	< 0.001	Si
5h vs. 3h	20.617	7.086	< 0.001	Si
4h vs. 3h	6.203	2.132	0.183	No

**d.3) Aplicación de la suspensión a base de extracto blando de éter de petróleo a diferentes tiempos**

Comparación	Dif. de promedios	q'	p	p<0.05
8h vs. 3h	26.881	4.588	0.003	Si
7h vs. 3h	21.953	3.747	0.011	Si
6h vs. 3h	18.256	3.116	0.034	Si
5h vs. 3h	10.446	1.783	0.312	No
4h vs. 3h	5.983	1.021	0.762	No

**e) ANOVA – Entre suspensiones de extractos blandos**

**e.1) 1h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	14.69	2	7.34	0.21	0.81	5.14
Dentro grupos	214.01	6	35.67			
Total	228.70	8				

**e.2) 2h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	50.44	2	25.22	0.57	0.59	5.14
Dentro grupos	267.15	6	44.52			
Total	317.59	8				

**e.3) 3h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	14.60	2	7.30	0.42	0.67	5.14
Dentro grupos	104.57	6	17.43			
Total	119.17	8				

**e.4) 4h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	61.03	2	30.51	0.67	0.54	5.14
Dentro grupos	275.11	6	45.85			
Total	336.14	8				

**e.5) 5h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	520.45	2	260.22	6.01	0.03	5.14
Dentro grupos	259.77	6	43.29			
Total	780.22	8				

**e.6) 6h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	393.76	2	196.88	5.01	0.05	5.14
Dentro grupos	235.77	6	39.29			
Total	629.53	8				

**e.7) 7h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	467.30	2	233.65	16.06	0.004	5.14
Dentro grupos	87.28	6	14.55			
Total	554.58	8				

**e.8) 8 h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	252.65	2	126.32	10.14	0.012	5.14
Dentro grupos	74.75	6	12.45			
Total	327.40	8				

**f) Prueba de Tukey - Entre suspensiones de extractos blandos**

**f.1) 1 h**

Extracto	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Etanólico	3	39.78	X
<i>n</i> -butanólico	3	41.51	X
De éter de petróleo	3	42.91	X

**f.2) 2 h**

Extracto	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Etanólico	3	49.37	X
<i>n</i> -butanólico	3	52.04	X
De éter de petróleo	3	55.16	X

**f.3) 3 h**

Extracto	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Etanólico	3	59.30	X
<i>n</i> -butanólico	3	60.50	X
De éter de petróleo	3	62.40	X

**f.4) 4 h**

Extracto	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Etanólico	3	50.14	X
<i>n</i> -butanólico	3	54.29	X
De éter de petróleo	3	56.41	X

**f.5) 5h**

<b>Extracto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Etanólico	3	33.63	X
<i>n</i> -butanólico	3	39.88	X
De éter de petróleo	3	51.95	X

**f.6) 6h**

<b>Extracto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Etanólico	3	28.30	X
<i>n</i> -butanólico	3	33.27	X
De éter de petróleo	3	44.14	X

**f.7) 7h**

<b>Extracto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Etanólico	3	23.12	X
<i>n</i> -butanólico	3	28.85	X
De éter de petróleo	3	40.44	X

**f.8) 8h**

<b>Extracto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Etanólico	3	22.82	X
<i>n</i> -butanólico	3	26.84	X
De éter de petróleo	3	35.51	X

Anexo 4

1. Estudio de la actividad antiinflamatoria de los extractos blandos del rizoma de *Curcuma longa* Linn

a) Volúmenes del edema plantar a diferentes tiempos luego de la inducción del edema y aplicación del diseño experimental

Extracto		Volúmenes (mL) del edema plantar a diferentes tiempos								
		0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	
Control negativo (excipientes)	1	0.8 0	1.2 0	1.3 0	1.3 5	1.3 7	1.3 7	1.3 6	1.3 6	1.34
	2	0.7 5	1.0 8	1.1 6	1.2 3	1.2 5	1.2 4	1.2 4	1.2 3	1.22
	3	0.7 3	1.1 2	1.1 9	1.2 3	1.2 6	1.2 5	1.2 4	1.2 4	1.24
	4	0.8 4	1.1 9	1.2 8	1.3 7	1.3 8	1.3 8	1.3 7	1.3 6	1.36
	5	0.8 7	1.2 5	1.3 5	1.3 7	1.4 0	1.3 9	1.3 9	1.3 8	1.38
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1%)	1	0.7 4	1.0 6	1.1 5	1.2 5	1.1 7	0.9 9	0.9 7	0.9 1	0.88
	2	0.7 8	1.0 4	1.2 0	1.2 2	1.2 7	1.1 1	1.0 4	0.9 9	0.93
	3	0.8 5	1.2 4	1.3 4	1.4 0	1.3 3	1.1 8	1.1 3	1.0 7	1.02
	4	0.7 5	1.1 0	1.2 2	1.2 6	1.1 9	1.0 2	0.9 7	0.9 3	0.90
	5	0.8 2	1.1 9	1.2 9	1.3 1	1.2 2	1.0 3	0.9 9	0.9 6	0.94
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma. longa</i> L.)	1	0.7 2	1.0 8	1.1 7	1.2 2	1.2 3	1.0 1	0.9 6	0.9 3	0.91
	2	0.7 5	1.0 9	1.1 6	1.2 5	1.1 9	1.0 5	1.0 2	0.9 9	0.95
	3	0.8 0	1.1 7	1.2 5	1.3 0	1.2 1	1.0 8	1.0 5	1.0 1	0.98
	4	0.8 2	1.1 4	1.2 4	1.3 1	1.2 6	1.1 4	1.0 9	1.0 6	0.99
	5	0.8 4	1.2 2	1.3 1	1.3 7	1.3 1	1.1 7	1.1 3	1.1 0	1.02
Grupo experimental 2 (gel al 10% de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	1	0.8 1	1.0 9	1.1 9	1.2 3	1.2 0	1.0 5	1.0 2	0.9 9	0.96
	2	0.7 9	1.1 5	1.2 6	1.3 1	1.2 6	1.1 3	1.0 7	1.0 3	0.97
	3	0.8 1	1.0 8	1.1 7	1.2 4	1.1 7	1.0 2	0.9 8	0.9 4	0.93
	4	0.7	1.1	1.2	1.3	1.2	1.1	1.0	1.0	0.98

		9	7	6	4	5	1	6	4	
	5	0.7 6	1.1 6	1.2 3	1.2 7	1.1 9	1.0 8	1.0 2	0.9 7	0.93

**b) Porcentajes de inflamación del edema plantar a diferentes tiempos luego de la inducción del edema y aplicación del diseño experimental**

Extracto		Porcentaje de Inflamación del edema plantar a diferentes tiempos								
		0h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	7h	8h
Control negativo (excipientes)	1	0.00	50.00	62.50	68.75	71.25	71.25	70.00	70.00	67.50
	2	0.00	44.00	54.67	64.00	66.67	65.33	65.33	64.00	62.67
	3	0.00	53.42	63.01	68.49	72.60	71.23	69.86	69.86	69.86
	4	0.00	41.67	52.38	63.10	64.29	64.29	63.10	61.90	61.90
	5	0.00	43.68	55.17	57.47	60.92	59.77	59.77	58.62	58.62
	$\bar{x}$	0.00	46.55	57.55	64.36	67.14	66.37	65.61	64.88	64.11
	SEM	0.00	2.21	2.18	2.07	2.17	2.20	1.97	2.23	2.02
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1%)	1	0.00	43.24	55.41	68.92	58.11	33.78	31.08	22.97	18.92
	2	0.00	33.33	53.85	56.41	62.82	42.31	33.33	26.92	19.23
	3	0.00	45.88	57.65	64.71	56.47	38.82	32.94	25.88	20.00
	4	0.00	46.67	62.67	68.00	58.67	36.00	29.33	24.00	20.00
	5	0.00	45.12	57.32	59.76	48.78	25.61	20.73	17.07	14.63
	$\bar{x}$	0.00	42.85	57.38	63.56	56.97	35.30	29.48	23.37	18.56
	SEM	0.00	2.45	1.49	2.40	2.30	2.81	2.30	1.72	1.00
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma. longa</i> L.	1	0.00	50.00	62.50	69.44	70.83	40.28	33.33	29.17	26.39
	2	0.00	45.33	54.67	66.67	58.67	40.00	36.00	32.00	26.67
	3	0.00	46.25	56.25	62.50	51.25	35.00	31.25	26.25	22.50
	4	0.00	39.02	51.22	59.76	53.66	39.02	32.93	29.27	20.73
	5	0.00	45.24	55.95	63.10	55.95	39.29	34.52	30.95	21.43
	$\bar{x}$	0.00	45.17	56.12	64.29	58.07	38.72	33.61	29.53	23.54
	SEM	0.00	1.76	1.83	1.69	3.42	0.96	0.80	0.98	1.25
Grupo experimental 2 (gel al 10% de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L	1	0.00	34.57	46.91	51.85	48.15	29.63	25.93	22.22	18.52
	2	0.00	45.57	59.49	65.82	59.49	43.04	35.44	30.38	22.78
	3	0.00	33.33	44.44	53.09	44.44	25.93	20.99	16.05	14.81
	4	0.00	48.10	59.49	69.62	58.23	40.51	34.18	31.65	24.05
	5	0.00	52.63	61.84	67.11	56.58	42.11	34.21	27.63	22.37
	$\bar{x}$	0.00	42.84	54.44	61.50	53.38	36.24	30.15	25.59	20.51
	SEM	0.00	3.81	3.62	3.74	2.99	3.53	2.85	2.88	1.70

**c) ANOVA – Control (3h) vs. Tiempos posteriores**

**c.1) Control negativo (excipientes) a diferentes tiempos**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	35.25	5	7.05	0.32	0.90	2.62
Dentro grupos	535.16	24	22.30			
Total	570.41	29				

**c.2) Control positivo (gel diclofenaco 1%) a diferentes tiempos**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	8424.06	5	1684.81	71.63	< 0.001	2.62
Dentro grupos	564.49	24	23.52			
Total	8988.55	29				

**c.3) Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* Linn) a diferentes tiempos**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	6648.56	5	1329.71	85.67	< 0.001	2.62
Dentro grupos	372.50	24	15.52			
Total	7021.06	29				

**c.4) Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* Linn) a diferentes tiempos**

Fuente de	Suma de	Grados	Promedio	F	P	Valor crítico
-----------	---------	--------	----------	---	---	---------------

variación	cuadrados	Libertad	cuadrados			para F
Entre grupos	6566.98	5	1313.40	28.83	< 0.001	2.62
Dentro grupos	1093.36	24	45.56			
Total	7660.34	29				

**d) Prueba de Dunnett - Control (3h) vs. Tiempos posteriores**

**d.1) Control positivo (gel diclofenaco 1 %) a diferentes tiempos**

Comparación	Dif. de promedios	q'	p	p<0.05
8h vs. 3h	45.001	14.671	<0.001	Si
7h vs. 3h	40.188	13.102	<0.001	Si
6h vs. 3h	34.074	11.109	<0.001	Si
5h vs. 3h	28.253	9.211	<0.001	Si
4h vs. 3h	6.589	2.148	0.151	No

**d.2) Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* Linn) a diferentes tiempos**

Comparación	Dif. de promedios	q'	p	p<0.05
8 h vs. 3 h	40.749	16.354	<0.001	Si
7 h vs. 3 h	34.765	13.953	<0.001	Si
6 h vs. 3 h	30.686	12.315	<0.001	Si
5 h vs. 3 h	25.575	10.264	<0.001	Si
4 h vs. 3 h	6.220	2.496	0.076	No

**d.3) Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de *Curcuma longa* Linn) a diferentes tiempos**

Comparación	Dif. de promedios	q'	p	p<0.05
8 h vs. 3 h	40.990	9.602	<0.001	Si
7 h vs. 3 h	35.912	8.413	<0.001	Si
6 h vs. 3 h	31.348	7.344	<0.001	Si
5 h vs. 3 h	25.256	5.916	<0.001	Si
4 h vs. 3 h	8.119	1.902	0.235	No

e) ANOVA – Entre extractos

e.1) 1h

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	50.31	3	16.77	0.47	0.71	3.24
Dentro grupos	569.51	16	35.59			
Total	619.82	19				

e.2) 2h

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	31.07	3	10.36	0.35	0.78	3.24
Dentro grupos	468.73	16	29.29			
Total	499.80	19				

e.3) 3h

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	26.82	3	8.94	0.27	0.85	3.24
Dentro grupos	538.09	16	33.63			
Total	564.91	19				

e.4) 4h

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	566.20	3	188.73	7.34	0.003	3.24
Dentro grupos	411.41	16	25.71			

Total	977.61	19				
-------	--------	----	--	--	--	--

**e.5) 5h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	3320.84	3	1106.95	33.94	<0.0001	3.24
Dentro grupos	521.87	16	32.62			
Total	3842.71	19				

**e.6) 6h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	4520.89	3	1506.96	67.19	<0.0001	3.24
Dentro grupos	358.83	16	22.43			
Total	4879.72	19				

**e.7) 7h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	5718.13	3	1906.04	88.58	<0.0001	3.24
Dentro grupos	344.28	16	21.52			
Total	6062.41	19				

**e.8) 8h**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados Libertad	Promedio cuadrados	F	P	Valor crítico para F
Entre grupos	7074.99	3	2358.33	197.80	<0.0001	3.24
Dentro grupos	190.77	16	11.92			
Total	7265.75	19				

**f) Prueba de Tukey - Entre extractos**

**f.1) 1h**

Grupo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Control negativo (excipientes)	5	46.55	X

Control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %)	5	42.85	X
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	45.17	X
Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	42.84	X

**f.2) 2 h**

Grupo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Control negativo (excipientes)	5	57.55	X
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %)	5	57.38	X
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	56.12	X
Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	54.43	X

**f.3) 3 h**

Grupo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Control negativo (excipientes)	5	61.50	X
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %)	5	63.56	X
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	64.29	X
Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	61.50	X

**f.4) 4 h**

Grupo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Control negativo (excipientes)	5	67.15	X
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %)	5	56.97	X

Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	55.29	X
Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	53.38	X

**f.5) 5 h**

Grupo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Control negativo (excipientes)	5	66.37	X
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %)	5	35.30	X
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	38.72	X
Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	36.24	X

**f.6) 6 h**

Grupo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Control negativo (excipientes)	5	65.61	X
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %)	5	29.48	X
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	33.61	X
Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	30.15	X

**f.7) 7 h**

Grupo	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Control negativo (excipientes)	5	64.88	X
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1 %)	5	23.37	X
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de	5	29.53	X

extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.			
Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	25.59	X

**f.8) 8 h**

<b>Grupo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Promedio</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
Control negativo (excipientes)	5	64.11	X
Control positivo (gel diclofenaco sódico 1%)	5	18.56	X
Grupo experimental 1 (suspensión al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	23.54	X
Grupo experimental 2 (gel al 10 % de extracto blando etanólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.)	5	20.51	X