

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE
HOJAS DE *Morus nigra* L. EN RATAS ALBINAS**

**Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y
Bioquímico**

TESISTAS:

DIANA ELSA, MAYHUA PONCE

AMILCA HENNY, AVENDAÑO TARAZONA

ASESOR:

Dr. BONILLA RIVERA, PABLO ENRIQUE

Lima – Perú

2018

DEDICATORIA

A nuestro Señor Creador por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi formación profesional, por ser mi fortaleza en los momentos difíciles y por brindarme una vida colmada de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis amados padres, Celestina y Víctor por los valores que me han inculcado, por su constante e invaluable apoyo durante toda mi vida y sobre todo por ser el mejor ejemplo de vida a seguir.

A mí hermano Freddy por ser parte importante de mi vida, por su apoyo, por los momentos compartidos y por ser mi inspiración para salir adelante.

A mí amada sobrina Aitana por su alegría y amor.

A mis hermanas del alma Rosa y Dayana por brindarme su apoyo, comprensión y motivarme a seguir adelante.

A mi amiga Milagros Delgado por su orientación contante y amistad.

Diana Elsa, Mayhua Ponce

A Dios por estar siempre guiándome y ayudándome en los tiempos difíciles.

A mí madre Ceferina por el apoyo incondicional que me brindan día a día y por alentarme a ser una persona de bien.

A mí hermano Yersin por su apoyo y orientación durante mi formación profesional.

A mis queridos sobrinos Gaudil y Yersin.

Amilca Henny, Avendaño Tarazona

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	2
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	4
1.2.1. PROBLEMA GENERAL.....	4
1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS.....	4
1.3.OBJETIVOS.....	4
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO.....	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO.....	6
2.1.1. Nacionales.....	6
2.1.2. Internacionales.....	8
2.2. BASES TEÓRICAS.....	11
2.2.1. Inflamación.....	11
2.2.2. Causas de la inflamación	11
2.2.3. Fases de la inflamación.....	11

2.2.4. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).....	14
2.2.5. Fármaco patrón empleado en el ensayo.....	14
2.2.6. Flavonoides.....	15
2.2.6.1. Efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales.....	16
2.2.7. Alcaloides.....	16
2.2.8. <i>Morus nigra</i> L.....	17
2.2.8.1. Descripción Botánica.....	17
2.2.8.2. Clasificación taxonómica.	18
2.2.8.3. Usos Tradicionales de <i>Morus nigra</i> L.....	18
2.3. HIPÓTESIS.....	19
2.3.1. Hipótesis General.....	19
2.3.2. Hipótesis Específicas.....	19
2.4. VARIABLES.....	19
2.4.1. Variable independiente.....	19
2.4.2. Variable dependiente.....	19
2.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	20
2.6. MARCO CONCEPTUAL.....	21
CAPÍTULO III: MÉTODO.....	23
3.1. TIPO	23
3.2. DISEÑO.....	23
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	23
3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	23
3.4.1. Técnicas.	23
3.4.2. Instrumentos de Recolección de Datos	23
3.4.3. Validación de Instrumentos.....	24

3.4.4. Materiales, reactivos y equipos.	24
3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	25
3.5.1. Recolección y procesamiento pos cosecha.....	25
3.5.2. Prueba de solubilidad.....	26
3.5.3. Marcha Fitoquímica.....	26
3.5.4. Cromatografía en Capa fina.	28
3.5.4.1. Análisis cromatográfico de flavonoides.	29
3.5.5. Determinación de flavonoides totales.....	29
3.5.6. Toxicidad oral aguda.....	30
3.5.7. Efecto antiinflamatorio.....	31
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.....	35
4.1.1. Ensayo de Solubilidad.....	35
4.1.2. Marcha fitoquímica.....	36
4.1.3. Cromatografía en capa fina.....	37
4.1.4. Determinación de flavonoides totales.	37
4.1.5. Toxicidad oral aguda.....	39
4.1.6. Efecto antiinflamatorio.....	39
4.1.7. Análisis Estadístico.....	42
4.1.8. Contrastación de hipótesis.....	43
4.1.9. Discusión de resultados.....	44
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	45
5.1. CONCLUSIONES.....	47
5.2. RECOMENDACIONES.....	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales.	16
Tabla N°2: Operacionalización de variables.	20
Tabla N°3: Tratamientos de Experimentación de la toxicidad aguda.....	30
Tabla N°4: Tratamientos de experimentación del efecto antiinflamatorio	32
Tabla N°5: Cuadro de dosis y volumen de tratamiento y sustancia inductora de edema en el ensayo para evaluar el efecto antiinflamatorio.....	33
Tabla N°6: Resultados del ensayo de solubilidad.....	34
Tabla N°7: Tabla de ensayos y resultados de la Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de las hojas de <i>Morus nigra</i> L.	35
Tabla N°8: Absorbancias de las 3 concentraciones diferentes a las que se analizó el estándar para la curva de calibración	36
Tabla N°9: Resumen de pesos de las patas de los animales de experimentación	38
Tabla N°10: Tabla de la diferencia de los pesos entre la pata derecha de la rata (con un edema inducido) y la pata izquierda de la rata.....	38
Tabla N°11: Porcentaje de efecto antiinflamatorio de las 3 dosis de extracto alcohólico de las hojas de <i>Morus nigra</i> L. y del grupo Naproxeno Sódico.	39
Tabla N°12: Resultados del ensayo antiinflamatorio y análisis estadístico por el test de Tukey-Kramer	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1: Estructura química del Naproxeno.	14
Figura N°2: Núcleo básico de los flavonoides.	16
Figura N°3: Gráfico de barras de los porcentajes del efecto antiinflamatorio del extracto alcohólico de las hojas de <i>Morus nigra</i> L. y grupo Naproxeno Sódico con respecto al grupo control.	39
Figura N°4: Certificación Botánica de <i>Morus nigra</i> L.	55
Figura N°5: Validación UPCH.	56
Figura N°6: Certificado de sanidad de las ratas albinas.	57
Figura N°7: Validación de Instrumentos. Dr. Nesquen Tasayco. Ficha N° 1.....	60
Figura N°8: Validación de Instrumentos. Dr. Nesquen Tasayco. Ficha N° 2.....	61
Figura N°9: Validación de Instrumentos. Mg.Jacinto Hervías, Pedro. Ficha N° 1.. ..	62
Figura N°10: Validación de Instrumentos. Mg.Jacinto Hervías, Pedro. Ficha N° 2.. ..	63
Figura N°11-22: Recolección y procesamiento pos cosecha. ..	64-65
Figura N°23-32: Ensayo de Solubilidad del extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L.	66-67
Figura N°33-44: Marcha Fitoquímica del extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L.....	68-69
Figura N°45-47: Cromatografía en capa fina del extracto de hojas de <i>Morus nigra</i> L.	70
Figura N° 48: Cuantificación de flavonoides totales de las <i>Morus nigra</i> L.....	71
Figura N°49: Curva de calibración de quercetina para la determinación de flavonoides totales del extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L.....	72
Figura N°50: Esquema de preparación de la dosis 1: 250mg/kg del extracto seco de hojas de <i>Morus nigra</i> L. para la determinación del efecto	

antiinflamatorio.....	73
Figura N°51: Esquema de preparación de la dosis 2: 500mg/kg del extracto seco de hojas de <i>Morus nigra</i> L. para la determinación del efecto antiinflamatorio.....	73
Figura N°52: Esquema de preparación de la dosis 3: 1000mg/kg del extracto seco de hojas de <i>Morus nigra</i> L. para la determinación del efecto antiinflamatorio.....	74
Figura N°53-55: Efecto Antiinflamatorio del extracto de hojas de <i>Morus nigra</i> L.: Pesado y separación de las ratas en grupos de experimentación. ..	74
Figura N°56-63: Grupos de experimentación y administración de dosis.....	75-76
Figura N°64-73: Inducción del Edema plantar en la pata trasera con carragenina al 1 %. ..	76-77
Figura N°74-81: Corte de las patas de las ratas.....	78-79
Figura N°82-87: Pesos de las patas de la rata. Pesos de las patas de las ratas tratadas a la dosis de 1000 mg/Kg ..	80
Figura N°88-93: Tratamiento con la dosis de 500 mg/Kg ..	81
Figura N°94-97: Pesos de las patas de las ratas tratadas a la dosis de 250 mg/Kg ..	82
Figura N°98- 103: Tratamiento con la dosis de Naproxeno Sódico 40 mg/Kg. ...	83
Figura N°104-109: Animales de experimentación sin tratamiento (agua destilada) ..	84
Figura N°110: Análisis estadístico1 ..	85
Figura N°111: Análisis estadístico 2.....	86

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°1: Matriz de Consistencia.	54
Anexo N°2: Certificación Botánica	55
Anexo N°3: Validación UPCH: Ensayos farmacológicos: Efecto Antiinflamatoria por edema plantar.....	56
Anexo N° 4: Certificado de sanidad de los animales de experimentación.....	57
Anexo N°5: Instrumentos de Recolección de Datos. N°1	58
Anexo N°6: Instrumentos de Recolección de Datos. N°2.....	59
Anexo N°7: Validación de Instrumentos. Dr. Nesquen Tasayco Yataco. N°1	60
Anexo N°8: Validación de Instrumentos. Dr. Nesquen Tasayco Yataco. N°2	61
Anexo N°9: Validación de Instrumentos. Mg. Jacinto Hervías, Pedro. N°1	62
Anexo N°10: Validación de Instrumentos. Mg. Jacinto Hervías, Pedro. N°2	63
Anexo N°11: Recolección y procesamiento pos cosecha.	64
Anexo N°12: Ensayo de Solubilidad del extracto alcohólico de hojas de <i>Morus</i> <i>nigra</i> L.	66
Anexo N°13: Marcha Fitoquímica del extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L.	68
Anexo N°14: Cromatografía en capa fina del extracto de hojas de <i>Morus nigra</i> L.	70
Anexo N°15: Resultado de la lectura al Espectrofotómetro.....	71
Anexo N°16: Determinación de flavonoides totales.....	72
Anexo N°17: Preparación de las muestras problema.....	73
Anexo N°18: Efecto Antiinflamatorio del extracto de hojas de <i>Morus nigra</i> L. Pesado y separación de las ratas en grupos de experimentación.....	74
Anexo N°19: Grupos de experimentación y administración de dosis	75
Anexo N°20: Inducción del Edema plantar en la pata trasera con Carragenina al 1	

%	76
Anexo N°21: Corte de las patas de las ratas.....	78
Anexo N°22: Pesos de las patas de la rata.	80
Pesos de las patas de las ratas tratadas a la dosis de 1000mg/Kg	
Anexo N°23: Tratamiento con la dosis de 500 mg/Kg	81
Anexo N°24: Pesos de las patas de las ratas tratadas a la dosis de 250mg/Kg.	82
Anexo N°25: Tratamiento con la dosis de Naproxeno Sódico 40 mg/Kg	83
Anexo N°26: Animales de experimentación sin tratamiento (agua destilada)	84
Anexo N°27: Análisis estadístico 1	85
Anexo N°28: Análisis estadístico 2.....	86

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo para determinar el efecto antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. en ratas albinas. La marcha fitoquímica determinó la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides, glicosidos y alcaloides. En la cromatografía en capa fina se identificó flavonoides, mediante Espectrofotometría Ultravioleta se determinó la presencia de flavonoides totales por 3.26 mg de quercetina / en mL de extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. Se evaluó el efecto antiinflamatorio mediante el método del edema plantar inducido por carragenina, descrito en el manual Cytel y Validación UPCH. El método consiste en provocar una reacción inflamatoria en la pata posterior derecha de los animales de experimentación. Se utilizaron 25 ratas albinas (machos) cepa Holtzman distribuidas en 5 grupos: Control; dosis de 250, 500 y 1000mg/kg de extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.; Naproxeno 40mg/kg. La aplicación de los tratamientos fue por vía oral. El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. mostró efecto antiinflamatorio significativa ($p < 0,05$) a dosis de 500 y 1000mg/kg inducidas por carragenina al 1% en las patas de las ratas por 58 y 80.97% respectivamente. Así mismo demuestra que el tratamiento con extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. a dosis de 1000mg/kg tiene buen efecto antiinflamatorio.

Palabras claves: *Morus nigra* L., extracto alcohólico, marcha fitoquímica, compuestos fenólicos, cromatografía en capa fina, espectrofotometría ultravioleta.

ABSTRACT

The present investigation was to determine just the antiinflammatory effect of alcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves in albino rats. The phytochemical action determined the presence of phenolic compounds such as flavonoids, glycosides and alkaloids. In the thin layer chromatography flavonoids was identified by UV spectrophotometry the presence of total flavonoids was determined by 26.3 mg of quercetin / in mL of alcohol leaves *Morus nigra* L. extract the antiinflammatory effect was evaluated by the method of edema plantar induced carrageenan, described in Manual and Cytel validation UPCH. The method involves an inflammatory reaction causing the right hind paw of the experimental animals. 25 albino rats (male) strain Holtzman in 5 groups were used: control; doses of 250, 500 and 1000mg /kg of alcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves; Naproxen 40mg /kg. The application of treatments was orally. The alcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves showed significant anti-inflammatory effect ($p < 0.05$) at doses of 500 and 1000 mg / kg induced 1% carrageenin in rat paws by 58 and 80.97% respectively. Also it demonstrates that treatment with alcoholic extract of *Morus nigra* L. leaves at doses of 1000 mg / kg has good anti-inflammatory effect.

Keywords: *Morus nigra* L., alcoholic extract, phytochemical action, phenolics, thin layer chromatography, UV spectrophotometry.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son un importante recurso terapéutico utilizado por muchos países. La FAO respalda que los conocimientos de los pobladores indígenas “han contribuido al descubrimiento de alrededor de las tres cuartas partes de los medicamentos de origen vegetal que se utilizan ampliamente en el mundo desarrollado”. En el Perú el uso de la medicina natural es una práctica común, especialmente en provincias es una valiosa contribución en la solución de problemas de la salud, que en la actualidad se encuentra en estado crítico, debido a la falta de medicamentos además de los precios altos en el mercado nacional y a esto se suma los problemas del uso irracional de los medicamentos que tiene como consecuencias las reacciones adversas e interacciones medicamentosas. (36).

En el transcurso del tiempo se han ido incrementado los estudios para evaluar los diferentes efectos de las plantas medicinales pero todavía no son suficientes, se debe aprovechar todo el conocimiento empírico de sus propiedades curativas que han sido heredados de nuestros antepasados, estos que han sido acumulando durante milenios y han llegado a ser parte de las tradiciones de muchas culturas.

La *Morus nigra* L. se utiliza como diurético, antitusígeno y antiinflamatorio. Los extractos de plantas de la familia Morera han demostrado poseer actividades antiinflamatorias en muchos modelos animales. El presente trabajo de investigación evaluó el efecto antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. en ratas albinas, de esta manera se contribuye al aprovechamiento de nuestra naturaleza siendo una evidencia más para que esta planta pueda ser aprovechada por nuestro país.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La inflamación, es una respuesta del sistema inmune a una lesión de cualquier origen, por eso la inflamación tiene un papel importante en la patogénesis y control de muchas enfermedades como neoplasias, sepsis, artritis reumatoide y otras. (1)

La inflamación crónica tiene un efecto negativo en las enfermedades neoplásicas y carcinogénesis, ya que los mediadores y células de la inflamación son componentes indispensables en la carcinogénesis y progresión de un tumor.(2) Un ejemplo de ello es la inflamación intraprostática crónica que está relacionada a la carcinogénesis en la próstata.(3) La formación de adenocarcinomas y pólipos benignos en animales de experimentación por sobreexpresión génica de las enzimas ciclooxigenasas, mediadores de la inflamación, reducción de adenocarcinomas y pólipos en animales de experimentación con inhibición génica de las enzimas ciclooxigenasas.(4) El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. En el año 2012 se registraron alrededor de 14 millones de nuevos casos. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo; en 2015, ocasionó 8,8 millones de defunciones. Casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad. (5) Los tumores malignos y enfermedades neoplásicas fueron la principal causa de muerte (20.1%) en el Perú el año 2014. (6)

La sepsis severa es un síndrome causado por una inflamación sistémica inducida por una infección. Esta es la principal causa de muerte en niños menores de cinco años en el mundo.(7) Se estima que la carga epidemiológica de sepsis es de más de treinta millones de personas en el mundo por año y que la mortalidad está cerca de los seis millones según la Organización Mundial de la Salud (OMS).(8) Esta es responsable de aproximadamente 35 000 muertes maternas y pueden contribuir con hasta 100 000 muertes maternas al año. (9)

El síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, es la presencia de un estado de respuesta inflamatoria continua con repercusiones sistémicas. Mediante un estudio retrospectivo de casos y controles se reportó que entre 1989 –

2003, en la Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica en un hospital de México, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica aumenta en un 34 % la probabilidad de defunción, el estudio se realizó en niños quemados con edad promedio de 3.5 años. (10)

La prevalencia mundial de la artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria, es de cerca del uno por ciento. Un gran número de comorbilidades se asocian con la inflamación sistémica y contribuyen a la mortalidad de pacientes con artritis reumatoide. El riesgo de mortalidad de pacientes con artritis reumatoide aumenta en 52 % por accidentes de cerebros vasculares. (11)

La inflamación está relacionada a muchas enfermedades porque es síntoma de muchas de ellas y por ser parte de la fisiopatología de varias otras. Por ello es fácil suponer que en algún momento todas las personas la padecieron. Por esa razón los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos son muy consumidos, se estima que treinta millones de personas la consumen en el mundo diariamente.(12) Pero que a su vez son responsables de aproximadamente el 10 al 30 % de las úlceras pépticas y entre el 15 al 35 % de las complicaciones de las úlceras pépticas. (13)

La medicina tradicional herbaria es una práctica milenaria ampliamente difundida y aceptada por los diferentes estratos sociales y económicos, la OMS estima que más del 80 % de la población mundial la usó en algún momento de su vida. (14) Además es una práctica que requiere ser validada con el necesario rigor científico. (15) Aproximadamente 4,5 billones de personas en el planeta usan la medicina tradicional herbaria como principal sistema de salud o fuente única de la misma. (16) La presente investigación pretende validar el conocimiento popular de la especie *Morus nigra* L. y con este conocimiento poder inspirar futuras investigaciones que puedan afirmar la inocuidad y/o aislamiento de sustancias con efecto farmacológico.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. PROBLEMA GENERAL

¿El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presentará efecto antiinflamatorio en ratas albinas?

1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

1.2.2.1. ¿Qué tipos de metabolitos presentará el extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.?

1.2.2.2. ¿A qué dosis el extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presentará efecto antiinflamatorio en ratas albinas?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L en ratas albinas.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.3.2.1. Identificar los tipos metabolitos presentes en el extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. que se relacionan con el efecto antiinflamatorio.

1.3.2.2. Evaluar el efecto antiinflamatorio en varias dosis del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. en ratas albinas.

1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

En la actualidad la mayoría de fármacos que se utilizan para el tratamiento de la inflamación, evidencian marcados efectos adversos a nivel de los diferentes sistemas del cuerpo, principalmente en el sistema digestivo y sistema nervioso central, es por ello, que la población de hoy muestra mayor interés hacia el uso de productos medicinales naturales. Por tal motivo, es de suma importancia investigar y sugerir terapias alternativas útiles para disminuir estos padecimientos mediante el uso de productos de origen natural, ya que estos cuentan con un gran potencial farmacológico y económico. El Perú, cuenta con especies vegetales de reconocida actividad medicinal que fueron utilizadas como medicina tradicional; Así tenemos; El llantén (*Plantago major* L.) que destaca el tratamiento de afecciones respiratorias, problemas digestivos y curación de heridas. La hojas de *Morus nigra* L. tiene usos tradicionales por sus propiedades antiinflamatorias e hipoglucemiantes. Es necesario, que a través de técnicas modernas de investigación, se evalúe a *Morus nigra* L. debido a sus propiedades medicinales, además a su fácil acceso a diversos lugares accesibles y al bajo costo. Esta investigación a las hojas de *Morus nigra* L. ofrece una alternativa de tratamiento para quienes padecen de procesos inflamatorios, dejando de lado el uso de fármacos que en la mayoría de los casos presentan efectos adversos y de manera se amplía los estudios de esta planta, contribuyendo a en caminar futuros proyectos de investigación.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

La búsqueda bibliográfica nos ha permitido identificar los siguientes antecedentes:

2.1.1. Nacionales

Dunstan CA y et al. (1997). En su investigación: “*Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays*” Se planteó el objetivo de evaluar el efecto antiinflamatorio de extractos de 38 plantas de Samoa y 8 extractos de plantas Peruanas usadas en la medicina tradicional de la tribu Shipibo-Conibo. Realizaron un estudio pre-clínico experimental controlado *in vitro* y otro estudio pre-clínico experimental longitudinal controlado *in vivo* con la finalidad de identificar el efecto antiinflamatorio mediante la evaluación de la biosíntesis de prostaglandinas y medida del diámetro de orejas inducidas a inflamación con etil fenilpropiolato en ratas macho con 38 extractos de plantas de Samoa y 8 extractos de plantas usadas en la medicina tradicional de la tribu Shipibo-Conibo, entre las que se encuentran las raíces de *Artocarpus altilis* (*Moraceae*) etno taxones uno; dos y tres, respectivamente. El ensayo *in vitro* muestra 64 ± 3 , 77 ± 2 y 80 ± 2 % inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas en *Artocarpus altilis*, los etnotaxones 1; 2 y 3 respectivamente. El ensayo de edema inducido en oreja de ratas muestra efecto antiinflamatorio estadísticamente significativo, entre los resultados más relevante del ensayo *in vivo* se encuentra 35 ± 4 , 27 ± 3 , 30 ± 7 y 37 ± 8 % en el etnotaxón dos después de 30 minutos, una, dos y tres horas de inducida la inflamación, respectivamente. Concluyeron que, al existir un gran número de inhibidores de ciclooxigenasas a los que se le podría atribuir el efecto antiinflamatorio, la combinación de los datos de la literatura química y farmacológica, además de los resultados obtenidos pueden ayudar a explicar el efecto antiinflamatorio de estas especies vegetales de la medicina tradicional. (17)

Villanueva BE (2016) y Huahuarunta J (2015). Las investigaciones: “Determinación del valor nutritivo y energético de las hojas de morera (*Morus alba* L.) y eritrina (*Erythrina sp*) para cuyes” y “Determinación del valor nutritivo de la morera (*Morus alba* L.) a los 45 y 60 días de rebrote para su uso en la alimentación animal” plantearon evaluar el valor nutritivo de las hojas de la especie vegetal *Morus alba* L. para animales. Las especies vegetales fueron colectadas en las regiones Cusco y Trujillo. Ambos autores muestran valores proteicos bastante similares entre 22.8 - 23.5 %. Además del resultado mencionado otros resultados como contenido de carbohidratos, fósforo, calcio, magnesio, nutrientes totales y nutrientes digeribles se consideraron para que los dos autores concluyan que las hojas de *Morus alba* L. son una buena alternativa como alimento o insumo para alimento de animales como cuyes. (18,19)

Narciso y et al. (2011). En la investigación: “Estudio Preliminar de la Actividad Antiinflamatoria del Extracto etanólico de los tallos de *Ageratina sternbergiana* (DC.) R.M. King & H.Rob (Zun Zun)”. Se planteó el objetivo de determinar la propiedad antiinflamatoria de la planta *Ageratina sternbergiana* (DC.) R.M. King & H.Rob “Zun Zun”, utilizada para afecciones que implican procesos inflamatorios. Se evaluó la actividad antiinflamatoria mediante el Método del edema subplantar según Winter et. al. Se utilizó 18 ratones albinos (hembras y machos) cepa Balb C53 distribuidos en 6 grupos: control (sin tratamiento) ,3 grupos con extracto etanólico de tallos a dosis de 50, 100 y 200 mg / Kg; 1 grupo con extracto etanólico de tallos hidrolizado a dosis de 160 mg/Kg y 1 grupo con indometacina en dosis de 10 mg/Kg. La aplicación de los tratamientos fue por vía oral. Los resultados farmacológicos indicaron que el tratamiento con extracto etanólico de los tallos de *Ageratina sternbergiana* (DC.) R.M. King & H.Rob “Zun Zun”, a dosis de 200 mg/Kg tuvo mayor efectividad antiinflamatoria. Así mismo el análisis fitoquímico de los tallos de la planta, reveló la presencia de azúcares, flavonoides, alcaloides, esteroides, camarinas, taninos y aminoácidos. (60)

2.1.2. Internacionales

Padilha M. et al. (2010). El trabajo titulado: “*Antiinflammatory properties of Morus nigra L. leaves*”. Se planteó el objetivo, evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto diclorometano de *Morus nigra* L. con un modelo experimental en animales. El efecto antiinflamatorio del extracto soluble en diclorometano de las hojas de *Morus nigra* L. provenientes de Brasil se evaluó con dos estudios experimentales controlados *in vivo* en ratas. Además se aislaron e identificaron tres compuestos con efecto antiinflamatorio (previamente reportado), germanicol; ácido betulínico y β -sitosterol. Se evaluó el efecto antiinflamatorio con un pletismómetro sobre el edema plantar inducido por carragenina en 40 ratas machos de pesos entre 120 a 122 g divididas en cinco grupos, control; extracto 30,100 y 300 mg/kg e indometacina, administrados por vía oral, siendo la dosis 300mg/kg del extracto la más activa ($p < 0.05$) que el control pero menos que la indometacina ($p < 0.001$). El efecto antiinflamatorio también, mediante la masa de un granuloma inducido con un *pellet* de algodón en 40 ratas machos de pesos entre 120 a 122 g divididas en cinco grupos, control; extracto 30 100 y 300 mg/kg y dexametasona, administrados por vía oral, siendo la dosis 300mg/kg del extracto la más activa ($p < 0.001$) que el control pero menos que la dexametasona ($p < 0.001$). Concluyeron, que el efecto antiinflamatorio podría ser debido a la presencia del germanicol, ácido betulínico y β -sitosterol en el extracto diclorometano. (20)

Basnet P y et al. (1993). En el trabajo titulado: “*Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing fractions of Morus insignis*”. Se aislaron tres benzofuranos, dos esteroides, un triterpeno y dos flavonoides mediante un fraccionamiento y aislamiento guiado por ensayos para determinar el efecto hipoglicemiante en ratas macho, inducidas a diabetes por estreptozocina en buffer citrato de pH 4.5 intravenosa, con cinco semanas de edad y pesos que varían entre los 120 a 140 g. El ensayo

se realizó en el extracto etanolico al 70% de las hojas de *Morus insignis*, proveniente de Argentina, y con las fracciones solubles en acetato de etilo, n-butanol y agua del extracto mencionado. Las dosis evaluadas fueron 100mg/kg de extracto etanolito y 50mg/kg y 100mg/kg de las fracciones. El extracto mostró hasta un 35 % de reducción de la glucemia después de veinte dosis, siendo la fracción acuosa la más activa al reducir hasta un 23.7 % de la glucemia con dosis única. (21)

Cazaña Y. y et al. (2010) .En su investigación “Morera (*Morus Alba* L.): Propiedad Antiinflamatoria” Menciona que tuvo como objetivo determinar la actividad antiinflamatoria de extractos acuosos de hoja, tallo y raíz de *Morus Alba* L. variedad tigreada en ratas Wistar machos (150-200g.), utilizó el modelo de inducción del edema en patas de ratas carragenina, trabajó con 30 ratas induciendo el edema en las patas con carragenina. Los resultados de la actividad antiinflamatoria con los diferentes extractos de morera a una dosis de 400 mg/kg a las cuatro horas de ensayo, mostraron un aumento de la inhibición del edema con relación al control, donde a las ratas les fueron administradas solución salina. Entre los extractos las raíces presentaron los mayores valores (40,2 %) seguido del extracto acuoso de hojas (22,8%), ambos inferiores a la indometacina utilizada como control positivo en el experimento. Los resultados de la especie *Morus Alba* L. presenta una marcada propiedad antiinflamatoria. La especie ubicada en Matanzas, específicamente la variedad Tigreada muestra un efecto antiinflamatorio. Los extractos acuosos de las hojas, tallo y raíz, de esta variedad, presentaron un aumento significativo ($\alpha = 0,05$) de la inhibición del edema con relación al control. Entre los extractos, las raíces presentaron los mayores valores con un 40,2 % de inhibición. Llegó a la conclusión de que la especie *Morus Alba* L. presenta actividad antiinflamatoria y antioxidante especialmente en las raíces en mayor porcentaje encontradas en ratas albinas. (22)

Díaz M. y et al. (2015). En su investigación “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L.”. Menciona que tuvo como objetivo determinar cualitativamente la presencia de fenoles y flavonoides y evaluar la capacidad antimicrobiana de diferentes extractos frescos de hojas de morera frente a patógenos bacterianos. Para los ensayos de fitoquímica y de actividad antimicrobiana se utilizaron hojas de 2 variedades (tigreada e indonesia) y 2 híbridos (IZ 15/7 e IZ 64) de *M. alba* en un diseño totalmente aleatorizado con un control positivo y tres negativos (antibióticos). Se utilizó extractos frescos para la actividad antimicrobiana, la cual se determinó por el método de perforaciones en agar frente a cinco microorganismos que afectan tanto a los animales como al ser humano: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus β hemolítico*. Se concluyó que en todos los extractos hay presencia abundante de flavonoides y de fenoles activos frente a los microorganismos patógenos evaluados sin diferencias significativas entre ellos. Se sugiere la utilización de *Morus alba* L. como una alternativa saludable para enriquecer la dieta animal y se recomienda el uso de estos extractos con fines farmacéuticos para combatir las enfermedades originadas por los microorganismos que se estudiaron. (23)

Chen y et al. (2016) En la investigación: "Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of *black mulberry* (*Morus nigra* L.)" Analizaron el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo del extracto de flavonoides del fruto de *Morus nigra* L. Se obtuvo un extracto de flavonoides a partir de una extracción asistida por ultrasonido con etanol 38% del marco desengrasado con éter de petróleo, en un equipo soxhlet, de los frutos de *Morus nigra* L. colectada en China. El efecto antiinflamatorio se evaluó mediante tres ensayos: Evaluando el porcentaje inhibición del edema plantar, con un caliper, inducido con carragenina; porcentaje de inhibición del edema

en orejas, con una balanza analítica, inducido con xileno y la cantidad de citoquinas proinflamatorias (Interleuquina-1 β , factor de necrosis tumoral- γ , interferon- γ) y óxido nítrico, producidas mediante un ensayo inmunológico, por la aplicación tópica de xileno y la aplicación intraperitoneal de ácido acético 0.6%. Concluyeron que el extracto de flavonoides de los frutos de *Morus nigra* L. cuenta con efecto analgésico y antiinflamatorio de 50 y 100 mg/kg. (24)

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Inflamación

En el cuerpo humano existen varios mecanismos de defensa y uno de los más importantes es la inflamación. Este mecanismo de defensa pretende aislar y eliminar el agente causal de una lesión, endógeno o exógeno, para luego restaurar la funcionalidad del área dañada pero si el agente causal persiste da lugar a la inflamación crónica. (25)

Inflamación crónica

La inflamación crónica propicia muchos ambientes negativos para la salud del ser humano como el estrés oxidativo y este a su vez con otros más peligrosos como la diabetes mellitus y el cáncer. (26,27)

2.2.2. Causas de la inflamación

Después de una agresión por medio de la infección de un microorganismo, lesión tisular, estrés o disfunción celular la inflamación pretende combatir el microorganismo, reparar la lesión tisular y adaptarse ante el estrés para volver a un estado de homeostasis. (1) Esta respuesta se logra principalmente por la interacción entre las prostaglandinas y sus receptores fisiológicos. (27)

2.2.3. Fases de la inflamación

La inflamación se puede dividir sistemáticamente, en 5 etapas: Liberación de mediadores, efecto de los mediadores, llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio, regulación del proceso inflamatorio y reparación. (28)

Liberación de mediadores

Los mediadores son sustancias liberadas y/o sintetizadas por células inflamatorias como mastocito-macrófago, polimorfonucleares y otros linfocitos.(1)

La liberación de estos es consecuencia de varios eventos como: La activación de los suficientes factores activados del sistema del complemento, por la activación del mastocito cuando conecta sus receptores de la fracción constante (FceR) con dos inmunoglobulinas E (IgE) que previamente reconocieron un antígeno y la activación de la adenilato-ciclasa y de la fosfolipasa A₂ (PL A₂) que resulta a la fusión de los gránulos, que contiene mediadores de inflamación, con la membrana de las células inflamatorias y síntesis de ácido araquidónico. Los mediadores presentes en los gránulos previamente mencionados son: Heparina, enzimas proteolíticas y y factores quimiotácticos de neutrófilos y eosinófilos. El ácido araquidónico es el precursor de las enzimas ciclooxigenasas, aquellas que dan origen a las prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX), y lipooxigenasas, aquellas que dan origen a las leucotrienos (LT) (29)

Efecto de los mediadores

Histamina. Se encuentra difundido en varias partes del cuerpo humano y lo almacena principalmente las células cebadas (mastocitos) y basófilos. Actúan sobre cuatro diferentes receptores (H1, H2, H3 y H4). Al interaccionar con H1 produce incremento de la permeabilidad y vasodilatación, al actuar con H2 efectos reguladores de la inflamación.

Enzimas proteolíticas. Algunas de las liberadas por los mastocitos con llevan a la formación de kininas, peptidos que producen vasodilatación, estimulación nerviosa del dolor y aumento de permeabilidad vascular.

Factores quimiotácticos. Contienen péptidos y proteínas que atraen células inflamatorias como eosinófilos y neutrófilos al lugar de la inflamación luego activarlos.

Prostaglandina E₂ (PG E₂). Provoca dolor y vasodilatación. Junto al factor C5a y leucotrieno B₄ aumentan la permeabilidad vascular.

LeucotrienoB₄. Es un factor quimiotáctico para polimorfonucleares y macrófagos.

Factor activador de plaquetas. Entre los efectos que produce este mediador, tenemos: Estimula la agregación plaquetaria al activar a las plaquetas, liberación de mediadores de los gránulos de las plaquetas en la coagulación sanguínea. Además de ser factor quimiotáctico y activador de neutrófilos.

Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

Esta fase se comprende en un primer momento que a través de los efectos de algunos anticuerpos, sistema del complemento, proteína C reactiva y factores de coagulación se traspasan algunas moléculas de la sangre al lugar de la inflamación. Un segundo momento comprende la llegada de células inmunes al lugar de la inflamación.

Los basófilos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y linfocitos B y T son algunas de las células implicadas en esta fase.

Regulación de la respuesta inflamatoria

El fenómeno inflamatorio debe ser regulado para evitar respuestas exageradas o negativas sobre la salud. Para esta regulación están involucrados estos factores:

Histamina. Al interactuar con los receptores H₂ inhibe la liberación de mediadores por los mastocitos y basófilos, frena la actividad del neutrófilo y la quimiotaxis, activa linfocitos T supresores.

Heparina. Tiene un efecto negativo sobre la coagulación sanguínea y activación de factores de la cascada del complemento.

Eosinofilo. Cuando es atraída al lugar de la inflamación por factores quimiotácticos libera mediadores que degradan mediadores de la inflamación.

Reparación

Desde el momento que la lesión o microorganismo causante de la inflamación desaparece o se elimina en esta fase. Comprende la llegada y proliferación de fibroblastos que sintetizarán colágeno, proliferación de células epiteliales y neovascularización cuando es el caso de heridas. (28)

2.2.4. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

También son conocidos como fármacos analgésicos, antipiréticos porque la mayoría tiene acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética. (45)

Acción antiinflamatoria

Los aines disminuyen los síntomas de la inflamación (dolor, calor, edema, enrojecimiento) sus propiedades farmacológicas se derivan por su capacidad de inhibir la enzima ciclooxigenasa, en consecuencia, la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos mas no de leucotrienos.

Este efecto no solo se explica por la inhibición de COX, sino que también inhibe una serie de procesos asociados a la membrana de células características del proceso antiinflamatorio (neutrófilos, macrófagos y linfocitos). (45)

2.2.5. Fármaco patrón empleado en el ensayo

Naproxeno Sódico: Patrón empleado en el ensayo

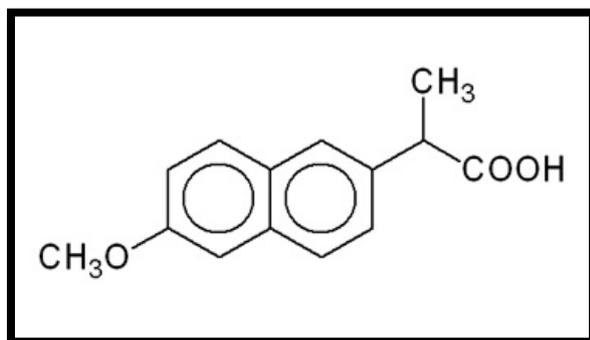


Figura N°1: Estructura química del Naproxeno. (49)

Fuente: www.librosfarmacologia.com/guiafarmacos/naproxeno

Es un derivado del ácido propiónico y pertenece al grupo de los AINES con propiedades antiinflamatorias, actividad analgésica, antipirética. (59)

Tiene propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas, efectos que se atribuyen a su capacidad para bloquear la biosíntesis de prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina por inhibición de la síntesis de prostaglandinas (ciclooxigenasa).

Inhiben tanto la COX-1 como la COX-2. También inhibe la agregación plaquetaria y prolonga el tiempo de protombina. Se absorbe bien a través de la mucosa gastrointestinal y las concentraciones máximas son en 1 a 2 horas después de la administración oral.

Los alimentos modifican la rapidez, pero no el grado de absorción.

Una característica del naproxeno es su vida plasmática más larga: 13 horas.

Se une en 99% a las proteínas plasmáticas. Se distribuye en todo el organismo, incluyendo la barrera hematoencefálica y la placentaria. Se metabolizan en hígado y se elimina con la orina y la leche materna. (59)

2.2.6. Flavonoides

El reino vegetal cuenta con numerosas especies biológicas con compuestos químicos con actividad antiinflamatoria. Un ejemplo de esto son el eugenol, pirogalol, y los ácidos clorogénico, ferúlico, cafeico, cumárico, vainillínico, siríngico, protoocatequínico y gentísico que pueden inhibir a las ciclooxigenasas 1 y 2 y la formación de óxido nítrico. (30). Así tenemos:

Flavonoides antiinflamatorios

Estos importantes metabolitos secundarios, con una estructura general 2-fenilcromen-4-ona con un sistema $C_6C_3C_6$, están altamente difundidos en todo el reino vegetal. (31)

Entre los flavonoides más difundidos con efecto antiinflamatorio se encuentra la quercetina, genisteína, rutina, kanferol, apigenina y otros. (32–36)

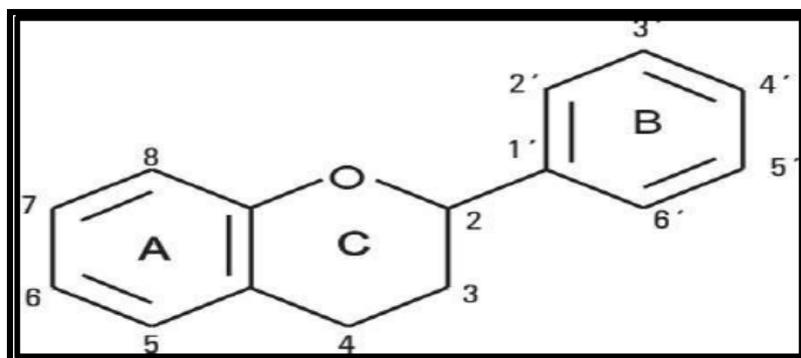


Figura N°2: Núcleo básico de los flavonoides

Fuente: Lock de Ugaz O.(31)

2.2.6.1. Efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales.

Tabla N°1. Efectos farmacológicos de diferentes flavonoides en humanos y animales. (45)

ACTIVIDADES FARMACOLÓGICAS	COMPUESTOS
Analgésica	Quercetina, hesperidina, miricitrina, 5,7-dimetoxi-flavanona-4'-O-[β-D-apiofuranosil-(1→2)]-β-D-glucopiranósido,
Antialérgica	Quercetina.
Antiateroocénica	Quercetina.
Antiinflamatoria	Apigenina, crisina, gopipina, hibrifolina, hipolaetina-8-β-D-glucósido, luteolina, miricetina, nepetina, quercetina, quercitrina, rutina, sidertoflavonona.

2.2.7. Alcaloides

Los alcaloides son sustancias orgánicas y generalmente de origen vegetal. Se caracterizan, en general, por tener una estructura compleja y por ejercer acciones fisiológicas diversas inclusive a dosis muy bajas.

Son tóxicos y capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos. No obstante, existen determinadas sustancias que se consideran alcaloides y que no cumplen con las características generales mencionadas.

A nivel de estructura química, son un grupo muy heterogéneo de compuestos con estructuras muy variadas. Todos contienen C, H y N. Algunos tienen oxígeno y poco azufre. El nitrógeno presente puede formar parte de un ciclo (N- heterocíclico; el más común) o no (con N no heterocíclico, como la estricnina, colchicina)

La presencia de uno o más átomos de nitrógeno como parte del sistema cíclico, manifiestan significativamente la actividad farmacológica y han sido biosintetizados de aminoácidos como precursores, a los cuales se les denomina alcaloides verdaderos, los mismos que se diferencian de los protoalcaloides o aminas biológicas, como las alquilaminas, biosintetizadas también de aminoácidos y de los pseudoalcaloides, aquellos que también poseen nitrógeno en un ciclo, pero no son originados por aminoácidos como por ejemplo, los derivados de purina y los esteroalcaloides. (45)

2.2.8. *Morus nigra* L.

2.2.8.1. Descripción Botánica

Morus nigra L. es un árbol de hoja caduca que crece a 10 m por 15 m a una velocidad lenta. Florece de mayo a junio y las semillas maduran de agosto a septiembre. La especie es monoica (las flores individuales son masculinas o femeninas, pero ambos sexos se pueden encontrar en la misma planta). Adecuado para suelos ligeros (arenosos), medianos (arcillosos), de preferencia suelos bien drenados. Puede crecer en semi-sombra (bosque claro) o sin sombra. Puede tolerar la contaminación atmosférica. (37)

2.2.8.2. Clasificación taxonómica. Constancia Botánica (Anexo N°2).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Hamamelidae

Orden: Urticales

Familia: Moraceae

Género: *Morus*

Especie: *Morus nigra* L

2.2.8.3. Usos Tradicionales de *Morus nigra* L.

En Brasil la infusión de las hojas son usadas para disminuir niveles de colesterol y presión arterial, reposición hormonal femenina y para prevenir derrames. (38)

En Pakistán la decocción de las hojas y raíz son usados como analgésicos. (39)

En Turquía la decocción de las hojas son usados para enfermedades renales. (40)

En Afganistán el fruto es usado para tratar la diarrea y como lavado estomacal. (41)

En la India la ingesta del fruto es usado como laxante y las hojas como astringente, es aplicado sobre heridas y cortes como antiinflamatorio. (42)

En Perú las hojas son usadas para combatir la diabetes, también como antitusígeno y antiinflamatorio. (43)

2.3. HIPÓTESIS

2.3.1. Hipótesis General

El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta efecto antiinflamatorio en ratas albinas.

2.3.2. Hipótesis Específicas

2.3.2.1. El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. contienen tipos de metabolitos relacionados con el efecto antiinflamatorio.

2.3.2.2. El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta efecto antiinflamatorio a diferente dosis.

2.4. VARIABLES

2.4.1. Variable independiente

Los componentes químicos del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.

2.4.2. Variable dependiente

Efecto antiinflamatorio

2.5. TABLA DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla N°2: Operacionalización de variables.

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	FUENTE	INTRUMENTO
Los componentes químicos del extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L.	Presencia de tipos de metabolitos	Presencia de compuestos fenólicos, glicosidos, Alcaloides	Marcha fitoquímica	Ficha de observación Ad-hoc
Efecto antiinflamatorio	Administración oral de la dosis 1, 2 y 3 en ratas. (250 mg/kg, 500 mg/kg y 1000 mg/kg respectivamente)	Diferencia de pesos de las patas de la rata (pata derecha con edema inducido y pata izquierda).	Balanza analítica	Ficha de observación Ad-hoc

2.6. MARCO CONCEPTUAL

1. **Antinflamatorios no esteroideos (AINES).** También son conocidos como fármacos analgésicos antipiréticos, porque la mayoría tiene acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética. (46)
2. **Calor.** Aumento de la temperatura de la zona inflamada debido a un mayor flujo sanguíneo en el área traumática, y esto se debe a la vasodilatación y al incremento del consumo local de oxígeno. (46)
3. **Citocinas.** Son polipéptidos producidos principalmente por macrófagos y linfocitos. Ambas células son de aparición tardía en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. (45)
4. **Dolor.** La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define el dolor como: "Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con una lesión hística real o potencial, o que se describe como ocasionada por dicha lesión. (45)
5. **Extractos Hidroalcohólicos.** Son extractos líquidos concentrados, obtenidos de la extracción de una planta o parte de ella, utilizando como solvente alcohol y agua. Presentan sedimento, color y aroma característicos de la planta de la cual se obtienen. (46)
6. **Flavonoides.** Son compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza. (46)
7. **Humedad.** El agua libre que contiene el material vegetal. El contenido de humedad en la planta fresca varía del 60 a 80% y durante el proceso de secado. (45)
8. **Inflamación.** Es el conjunto de respuestas de los tejidos vivos frente a una agresión física, infecciosa o autoinmune. (44)
9. **Mediadores de la inflamación.** La inflamación puede ser originada por factores endógenos (necrosis tisular o fractura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos, físicos, químicos, biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). (45)
10. **Principios activos.** Los principios activos de los vegetales utilizados en la medicina aparecen en toda la planta, ya sea en las flores, semillas, hojas,

tallos o frutos. Estos principios pueden variar a lo largo en una misma especie y en una misma planta de acuerdo a muchos factores como por ejemplo la época del año, características del suelo, su altura, localización geográfica. (46)

11. **Pulverizado.** Es un proceso mecánico que sirve para reducir el tamaño de partícula. El fin de este paso es el de aumentar la superficie de contacto de la droga con el solvente, lo cual facilita una mejor y mayor disolución de los principios activos. (45)
12. **Rubor.** Corresponde al color rojo de la zona inflamada y se debe a la acumulación de sangre. (46)
13. **Secado de hoja.** Es la etapa más crítica e importante. Generalmente se secan todas las plantas, excepto aquellas que van a ser empleadas para extraer aceites esenciales, preparar algunas tinturas y extractos. (45)
14. **Sistema del complemento.** Existen toxas que en sí mismas no generan daño tisular en forma directa, pero son reconocidas como agentes extraños al organismo y que por esa condición puede inducir una respuesta inflamatoria. (45)
15. **Tumefacción.** Consiste en el aumento de tamaño de la región o el órgano inflamado y es la consecuencia de la acumulación de sangre y de exudado en el foco inflamatorio. (46)

CAPÍTULO III: MÉTODO

3.1 NIVEL

Explicativo. Esta investigación es de nivel explicativo, debido a que su propósito es demostrar que los cambios en las variables dependientes fueron causados por la variable independiente. (34)

3.2. DISEÑO

Experimental

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población del estudio fitoquímico fueron 6 árboles en 6m² del Distrito del Agustino en la Región Lima y la muestra son 3kg. de hojas frescas de *Morus nigra* L.

En el estudio farmacológico se utilizó 25 ratas albinas machos cepa Holtzman, según la Validación UPCH: Ensayos farmacológicos: Actividad Antiinflamatoria por edema plantar (anexo N°3, 49)

3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.4.1. Técnicas.

La recolección de datos de la investigación se realizó mediante la técnica de observación por la cual se registraron datos que nos permitieron desarrollar la presente investigación. (60)

3.4.2. Instrumentos de Recolección de Datos:

El instrumento de recolección de datos que se utilizó en la presente investigación fueron fichas de observación ad-hoc elaboradas para los fines específicos de la investigación.

El instrumento que se utilizó para la recolección de datos del estudio fitoquímico fue una Ficha de Observación ad-hoc.

Así mismo el instrumento que se utilizó para la recolección de datos del estudio farmacológico fue una Ficha de Observación Ad-hoc. (Anexos N°5 y 6).

3.4.3. Validación de Instrumentos:

El instrumento que se empleó fueron fichas de observación Ad-hoc de recolección de datos, estas fueron viables debido a su sencillez y económicas para la aplicación del investigador. Así mismo requirieron de validación previa a su aplicación final, la cual se estableció en base a la determinación de su viabilidad, confiabilidad y validez.

La validez de contenido de las fichas de observación Ad-hoc de recolección de datos se realizó mediante la evaluación por juicio de 2 expertos (anexos N°7-10)

- Dr. Nesquen Tasayco Yataco
- Mg. Jacinto Hervías, Pedro
-

3.4.4. Materiales, reactivos y equipos.

A. Materiales:

- Beaker x 50, 100 mL
- Pipetas de 5 ,10mL
- Papel filtro
- Embudo simple
- Frascos color ámbar de 50, 100, 250 y 1 000 mL
- Bagueta
- Balanza analítica
- Tubos de ensayos
- Gradilla para tubos de ensayos
- Campana extractora
- Pipeta graduada x 10 mL
- Propipeta
- Pizeta con agua destilada
- Espátula

B. Reactivos:

- Etanol
- Metanol
- Éter de petróleo
- Acetato de etilo
- Agua destilada
- Butanol
- Cloroformo
- Shinoda
- Dragendorff
- Mayer
- Wagner
- Gelatina
- Reacción con FeCl₃
- Molish
- Fehling
- Lugol

C. Equipos:

- Balanza analítica
- Balanza gramera
- Estufa
- Campana extractora
- Equipo de disección, para los cortes de las patas
- Sonda nasogástrica

3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.5.1. Recolección y procesamiento pos cosecha,

Se recolectó 3 kg de hojas frescas de *Morus nigra* L. de 6 árboles en 4m² el mes de octubre del año 2017 en horas de la mañana en el Distrito del Agustino, alrededor del Hospital Hipólito Unanue en la Región Lima. Luego se seleccionó el material vegetal, las hojas más

frescas se limpiaron con alcohol de 96° con brocha y algodón para luego secar las hojas limpias seleccionadas sobre papel kraft a temperatura ambiente bajo la sombra. Acto seguido, se procedió a pesar 1850 g de hojas seca de *Morus nigra* L. se redujeron de tamaño mediante trituración mecánica para ser vertidas en un frasco de vidrio color ámbar y macerar el material vegetal seco con etanol de 96° durante siete días, con agitación constante y luego se filtró el líquido resultante con una gasa sobre un embudo de vidrio. El líquido conseguido se concentró a sequedad en una estufa de aire circulante a 40 C° en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, hasta lograr obtener 110g de extracto crudo seco.

3.5.2. Prueba de solubilidad

Se realizó la prueba de solubilidad en el laboratorio de Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Se colocó 0.3 g del extracto seco en 10 ml de etanol y se vertió 1 ml en cada uno de los 8 tubos de ensayos, adicionamos 3 ml de los disolventes indicados (Éter de petróleo, cloroformo, ciclo hexano, acetona, metanol, etanol, n-butanol y agua destilada) se agitó. Se observó la formación de mezcla soluble (mezcla homogénea) y mezcla insoluble (mezcla heterogénea).

3.5.3. Marcha Fitoquímica

Se prepara los reactivos en el laboratorio de Universidad Inca Garcilaso de la Vega. El cual tiene como objetivo determinar la presencia de tipos de metabolitos del extracto de hojas de *Morus nigra* L.

Se dispersó 0.3 g del extracto seco en 10 ml de etanol y se vertió 1 ml en 12 tubos de ensayo ejecutar los ensayos de Fehling, Lugol, Ninhidrina, 2,4-DNF, Shinoda, Cloruro Férrico, Gelatina (31)

Metabolitos Primarios

A. Prueba para Glúcidos.

- **Reactivo de Fehling A y B**

A la muestra se le añade 5 mL de Fehling A y B y se lleva a baño maría la presencia de un precipitado anaranjado ladrillo nos da la presencia de Glúcidos en la muestra.

B. Prueba para Almidón.

- **Reactivo de Lugol**

A la muestra se le añade 1 gotas de Lugol si presenta una coloración oscura nos da la presencia de almidón en la muestra.

C. Prueba para Cetonas.

- **Reactivo de 2,4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH)**

A la muestra se le añade 1 gotas de DNPH si presenta un precipitado amarillo o naranja rojizo nos da la presencia de cetonas en la muestra.

D. Prueba de Aminoácidos

- **Ninhidrina**

A la muestra se le agrega 3 gotas del reactivo de ninhidrina luego se agitó y se llevó a baño maría. Siendo el resultado positivo cuando se observa una coloración violácea.

Metabolitos Secundarios

A. Prueba de Flavonoides y Compuestos Fenólicos.

- **Reactivo de Shinoda.-** (Limaduras de magnesio + HCl concentrado), da coloraciones amarillas a rojas (flavonas y flavonoles), si la coloración es rojo a magenta (flavanonoles), si son coloraciones rojo, violeta o azul (flavanonas), si son amarillos (isoflavonas), si esta no presenta coloración pueden ser isoflavononas, chalconas y auronas.
- **Reactivo de Cloruro Férrico.-** (Cloruro férrico disuelto en agua), darán coloraciones azul, verde o negra cuando se agrega de 3 a 5 gotas, prueba general.

- **Reactivo de Gelatina al 1%.-** (Gelatina + cloruro de sodio), da un precipitado blanco cuando se agrega de 3 a 5 gotas, prueba para taninos.

B. Prueba para Alcaloides

- **Reactivo de Mayer**

(Yoduro de mercurio y potasio), da una coloración blanca a crema cuando se adiciona unas 3 a 5 gotas a la solución acidulada del extracto.

- **Reactivo de Wagner.-** (yodo-yoduro de potasio), da una coloración marrón cuando se agrega de 3 a 5 gotas.

- **Reactivo de Dragendorff.-** (Yoduro de bismuto y potasio), da una coloración rojo a naranja cuando se adiciona unas 3 a 5 gotas a la solución acidulada del extracto. (31)

3.5.4. Cromatografía en Capa fina.

Para las pruebas de cromatografía en capa fina es un método muy empleado en la actualidad para la separación de mezclas de toda clase de productos naturales.

Ambiente de trabajo: Se realizó en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. (Anexo N°14)

Muestra: Extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.

Preparación de la muestra: Se pesó 0.3 g del extracto alcohólico seco de hojas de *Morus nigra* L. y se reconstituyó en 10 mL de etanol 96%

Método: Cromatografía en capa fina (31):

- i. Sistema de solventes: n-butanol: ácido acético: agua (3:1:1)
- ii. Soporte: Silica gel 60F₂₅₄
- iii. Revelador: Reactivo de tricloruro de aluminio. Luz UV 254nm

3.5.4.1. Análisis cromatográfico de flavonoides.

Se disolvió 1 mg de quercetina estándar en 1 ml de etanol para dar origen a la solución estándar (ST).

En un cromatofolio de silica gel 60F²⁵⁴ de 10x5 cm se aplicó con un capilar 4 veces ST y en una a 2 cm a su derecha se aplicó 4 veces con un capilar la solución 0.3 g de extracto en 10 ml usada en la marcha fitoquímica.

La fase móvil para este ensayo se preparó con n-butanol: ácido acético: agua (BAW) en la proporción 3:1:1 en una pera de decantación para poder tomar solo la fase orgánica, que se encuentra arriba.

El cromatofolio se puso en un beaker de 250 ml con la fase móvil BAW para que en ese material se desarrolle la cromatografía en capa fina.

3.5.5. Determinación de flavonoides totales

Ambiente de trabajo: Se realizó en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. (Anexo N°15)

Método: Volumetría (39, Técnica Interna SCC-UPCH)

Muestra problema: Extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L

El ensayo de flavonoides totales mediante espectrofotometría ultravioleta fue realizado según Zhishen y et Al. (39)

Se desarrolló una curva de calibración con el estándar de quercetina. Para ello se disolvió 50.2 mg de quercetina en 50 ml en etanol (St) y de esa solución se tomó 1.2, 5 y 10 ml y las tres se diluyeron en 50 ml de etanol, resultando las soluciones St1, St2 y St3 respectivamente.

En un tubo de ensayo marcado como blanco (B) se vertió 1 ml de agua destilada y a otros 3 tubos se vertieron 1 ml de St1, St2 y St3 respectivamente pero en tubo de ensayo diferente se vertió 1 ml del

extracto a 0.01 g/ml (0.2g disueltos en 20 ml de etanol), designado como M.

Se vertió 150 µl de NaNO₂ al 5 % a los 5 tubos de ensayo luego se agitó y se dejó reposar 5 minutos. Luego se vertió 150 µl de AlCl₃ 10 % a los 5 tubos de ensayos y se homogenizó. Después se vertieron 2 ml de NaOH 4 % mas 1.7 ml de agua para luego agitar los tubos de ensayo y dejar reposar 15 minutos para luego analizar la absorbancia de cada a contenido de los 5 tubos de ensayo a 415 nm de longitud de onda. Cada muestra fue analizada por triplicado. (Anexo N°15)

3.5.6. Toxicidad oral aguda

El ensayo se desarrolló en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se evaluó la toxicidad oral aguda en ratas según el ensayo 423 de la guía OECD para evaluar sustancias químicas. (36)

Se usaron 9 ratas distribuidas en 3 grupos con 3 animales de experimentación cada uno: Grupo control, experimental y repetición. Los animales de experimentación fueron adquiridas del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con un correcto estado sanitario fisiológico (anexo N°4). Después de adquiridas fueron ambientadas por 5 días de acuerdo con el modelo experimental. Durante todo en ensayo y periodo de ambientación, los animales fueron alimentados e hidratados *ad libitum* mantenidos a una temperatura de 22 ± 2 °C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en el bioterio.

Durante el periodo del ensayo a los grupos experimental y repetición se le administró 2000 mg/kg de peso corporal y el volumen de administración fue de 1 mL y al grupo control se le administró solo el diluyente. El ensayo duró 14 días y en ese periodo se pretendió evaluar si hay mortalidad y si existen conductas anormales (como alteración en la actividad motriz, postración, depresión, irritabilidad) o presencia de signos de toxicidad (como salivación, convulsión, piloerección, disnea, diarrea, entre otros) además de la variación de peso corporal antes del

ensayo e interdiario durante el ensayo. Después del ensayo los animales de experimentación fueron sacrificados por dislocación cervical. Tabla N°3.

Tabla N°3: Tratamientos de experimentación de toxicidad aguda.

Dosis (mg / Kg)	N° de animales Machos	Peso por grupos (g)
2000	3	225,80
2000 (repetición)	3	232,76
Control: Agua destilada	3	225,41

3.5.7. Efecto antiinflamatorio

Ambiente de trabajo: El estudio farmacológico se desarrolló en el Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Método: edema plantar inducido por carragenina fue realizado según el método descrito en el manual Cyted y Validación UPCH (49, Anexo N°3).

Fundamento del método: Se basa en la inducción de la inflamación por inyección subplantar (pata posterior derecha de la rata) de una suspensión de λ carragenina al 1% (0.1 mL), cuyo principal signo es la formación de edema, el cual es medido con la diferencia de pesos de las patas de las ratas derechas (edema inducido) con los de la pata izquierda, previamente cortadas (después de haber sido sacrificadas).

Muestra problema: Extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.

Patrón: Naproxeno sódico 40mg/kg.

Animales de experimentación: 25 ratas albinas machos, de la cepa Holtzman, con peso promedio de 220 ± 20 g, de 8 - 10 semanas de edad procedentes del bioterio Universidad Peruana Cayetano Heredia con un correcto estado sanitario fisiológico (anexo N°4). Los animales fueron alimentados e hidratados *ad libitum* mantenidos a una temperatura de 22 ± 2 °C con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en el bioterio. Después de ser adquiridas se dio el proceso

de cuarentena para la aclimatación a las condiciones ambientales y conductuales por 5 días. (Ambientadas).

Divididas de forma aleatoria en cinco grupos denominados: Control, Naproxeno Sódico, dosis 1, dosis 2 y dosis 3. Los animales de experimentación tuvieron un peso promedio de 224 g. Tabla N°4.

Tabla N°4: Tratamientos de experimentación del efecto antiinflamatorio.

Grupos de Tratamientos	Animales	Dosis (mg/kg)
Control: Agua destilada	5	-----
Naproxeno Sódico	5	40
Dosis 1	5	250
Dosis 2	5	500
Dosis 3	5	1000

Preparación de las muestras problema: Se procedió a pesar a las ratas de cada grupo dosis 1, 2 y 3 de 250, 500 y 1000 mg/kg respectivamente (n=5), obteniendo un peso promedio en cada caso.

Las muestras se prepararon con el extracto seco obtenido 110g (que se detalló en 3.5.1). Se desarrolló los cálculos necesarios para obtener el total de extracto seco a utilizar por día. Así mismo es necesario mencionar que se preparó dosis para para 8 ratas por precaución de alguna pérdida. (Anexo N°17)

Efecto antiinflamatorio: Se administró 40 mg/kg de Naproxeno Sódico al grupo denominado de la misma manera y 250, 500 y 1000 mg/kg de extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. a los grupos dosis 1; 2 y 3 respectivamente con una sonda nasogástrica. Se administró 1 ml de tratamiento en los grupos con su respectiva concentración por 21 días. 24 horas después de la última administración se aplicó 0.1 carragenina 1% p/v sobre solución salina (NaCl 0.9%) a todos los grupos como se evidencia en la tabla N°5. Luego de 2 horas se sacrificaron las ratas para pesar las patas de las ratas y registrar la diferencia entre los pesos de las patas derechas (con edema) con los de la pata izquierda.

Tabla N°5. Cuadro de dosis y volumen de tratamiento y sustancia inductora de edema en el ensayo para evaluar el efecto antiinflamatorio

Grupo	Dosis del tratamiento	Vol. de carragenina 3% p/v	Vol. de tratamiento administrado	N° de ratas
Control	0	0.1 ml	1 ml	5
Naproxeno Sódico	40 mg/kg	0.1 ml	1 ml	5
Dosis 1	250 mg/kg	0.1 ml	1 ml	5
Dosis 2	500 mg/kg	0.1 ml	1 ml	5
Dosis 3	1000 mg/kg	0.1 ml	1 ml	5

El Efecto antiinflamatorio se midió de la siguiente manera:

$$\text{Efecto antiinflamatorio (\%)} = \frac{(\Delta C - \Delta T)}{\Delta C} \times 100$$

Donde:

ΔC : Diferencia de peso de las patas de las ratas del grupo control.

ΔT : Diferencia de peso de las patas de las ratas de las muestras ensayadas.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Presentación de resultados

4.1.1. Ensayo de Solubilidad

Los resultados del ensayo de solubilidad se muestran resumidos en la tabla N°6.

Tabla N°6. Resultados del ensayo de solubilidad

Solventes	Resultados
Éter de petróleo	-
Cloroformo	-
Ciclohexano	-
Acetato de Etilo	+
Acetona	+
Metanol	++
Etanol	++
n-Butanol	+
Agua	+

Soluble: (++) , Poco Soluble: (+) , Insoluble:(-)

4.1.2. Marcha fitoquímica

El ensayo se realizó para determinar la presencia de tipos de metabolitos en el extracto de hojas de *Morus nigra* L. Se resumen los resultados en la tabla N°7.

Tabla N° 7. Tabla de ensayos y resultados de la Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.

Reactivos	Metabolitos	Color precipitado	Resultado
Fehling A+ Fehling B	Azúcares reductores	Precipitado anaranjado ladrillo	+++
Lugol	Almidón	Coloración oscura	-
Molish	Carbohidratos	Violáceo	+++
Ninhidrina	Aminoácidos	Color rosado	-
2,4-DNF	Cetónas	Precipitado Anaranjado	+
Shinoda	Flavonoides	Tono rojo	+++
FeCl ₃	Comp. fenólicos	Verde azulado	+++
Gelatina	Taninos	Precipitado blanco	++
Liebermann-bourchard	esteroides	Color verde	+
Mayer	Alcaloides	Precipitado blanco	++
Wagner	Alcaloides	Precipitado marrón	+++
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado rojo o naranja	+++

Abundante: (+++); Regular: (++); Leve: (+); Ausencia: (-)

4.1.3. Cromatografía en capa fina

Sistema de solventes: n-Butanol: ácido acético: agua (3:1:1)

Soporte: Silica gel 60F₂₅₄

Revelador: Reactivo de tricloruro de aluminio. Luz UV 254nm

Rf (extracto): 0.839

Rf (estándar): St. Quercetina: 0.897 (anexo 14)

4.1.4. Determinación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se calculó mediante la siguiente ecuación

$$\frac{Abs\ Ext + a}{b} \times Conc.\ de\ ext^{-1}$$

Donde:

Abs Ext: Absorbancia del extracto a 10 mg/ml \leftrightarrow 0.01g/ml

a y b son datos de la ecuación de la recta

En la tabla N°8. Se muestran las absorbancias de las 3 concentraciones diferentes a las que se analizó el estándar para la curva de calibración.

Tabla N°8: Absorbancias de las 3 concentraciones diferentes a las que se analizó el estándar para la curva de calibración para la determinación de flavonoides totales del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. y extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. (anexo N°15)

Muestra	Concentración (mg/ml)	Absorbancia
St1	0.02410	0.14733
St1	0.02410	0.14671
St1	0.02410	0.14568
St2	0.10040	0.70464
St2	0.10040	0.70608

St2	0.10040	0.70464
St3	0.20080	1.39760
St3	0.20080	1.39700
St3	0.20080	1.39520
Extracto	10	0.24635
Extracto	10	0.24709
Extracto	10	0.24735

3.26 mg de quercetina / ml de extracto (10 mg)

4.1.5. Toxicidad oral aguda

El extracto de hojas de *Morus nigra* L. y el control no produjeron mortalidad a 2000 mg/kg con una repetición durante los 14 días de evaluación de este estudio. La DL₅₀ por vía oral del extracto es mayor a 5000 mg de producto/kg de rata (> 5,0 g/ kg de rata) según el algoritmo que plantea la OECD (36).

En base a las observaciones realizadas, no se presentó disminución de peso corporal, alteraciones en la actividad motriz, convulsiones, diarrea, etc., ni efectos adversos en las ratas tratadas a las dosis ensayadas.

4.1.6. Efecto antiinflamatorio

Por 21 días se administraron 1 ml de tratamiento en los grupos con su respectiva concentración, 24 horas después de la última administración se aplicó 0.1 mL de Carragenina al 1% en la aponeurosis de la pata derecha a todos los grupos de tratamiento, induciendo la inflamación. Después de dos horas de inyectado la Carragenina al 1% se sacrificaron los animales y se evaluaron las diferencias de pesos entre la pata derecha y la izquierda, se resume en la Tabla N°9.

Tabla N°9: Resumen de pesos de las patas de los animales de experimentación.

Grupos Animales	Control			Naproxeno Sódico			Dosis 1: 250 mg/kg			Dosis 2: 500mg/kg			Dosis 3: 1000mg/kg		
	PD	PI	D	PD	PI	D	PD	PI	D	PD	PI	D	PD	PI	D
Ratas Albinas															
1	2.28	1.69	0.59	1.72	1.68	0.04	2.27	1.64	0.63	1.86	1.64	0.22	1.81	1.62	0.19
2	2.39	1.63	0.76	1.73	1.66	0.07	2.32	1.59	0.73	1.88	1.68	0.2	1.87	1.69	0.18
3	2.30	1.59	0.71	1.77	1.58	0.19	2.1	1.65	0.45	1.9	1.57	0.33	1.73	1.68	0.05
4	2.33	1.72	0.61	1.75	1.64	0.11	2.24	1.72	0.52	1.92	1.59	0.33	1.79	1.64	0.15
5	2.35	1.71	0.64	1.76	1.71	0.05	2.01	1.67	0.34	1.98	1.67	0.31	1.90	1.84	0.06

El ensayo evaluó los pesos de las patas de las ratas previamente sacrificadas y determinó la diferencia entre el peso de las patas como se muestra en la tabla N°10.

Tabla N°10. Tabla de la diferencia de los pesos entre la pata derecha de la rata (con edema inducido) y la pata izquierda de la rata.

Ratas Albinas	Grupos de tratamientos				
	Control	Naproxeno Sódico	Dosis 1: 250mg/Kg	Dosis 2: 500mg/Kg	Dosis 3: 1000mg/Kg
1	0.59g	0.04g	0.63g	0.22g	0.19g
2	0.76g	0.07g	0.73g	0.2g	0.18g
3	0.71g	0.19g	0.45g	0.33g	0.05g
4	0.61g	0.11g	0.52g	0.33g	0.15g
5	0.64g	0.05g	0.34g	0.31g	0.06g
Promedios	0.66g	0.09g	0.53g	0.28g	0.13g

El efecto antiinflamatorio fue medido por el porcentaje del mismo. El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presentó porcentajes de efecto antiinflamatorio dependiente de la concentración, notable en el figura N°3, con respecto al control como se muestra en la tabla N°11.

Tabla 11. Porcentaje de efecto antiinflamatorio de las 3 dosis de extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L., control y del grupo Naproxeno Sódico.

Grupo	Dosis (mg/Kg)	Efecto antiinflamatorio (%)
Control	0	0
Dosis 1	250	19.33
Dosis 2	500	58.00
Dosis 3	1000	80.97
Naproxeno Sódico	40	86.10

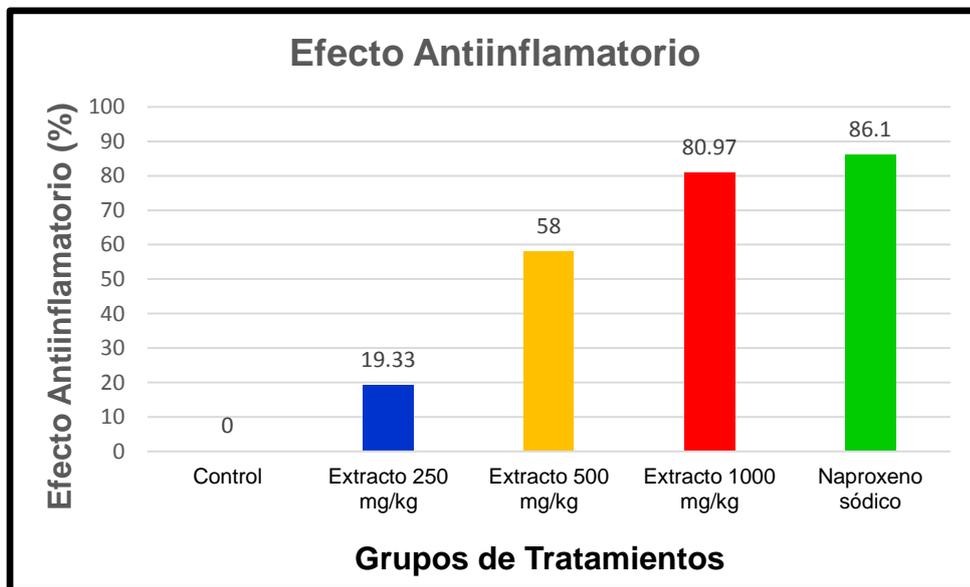


Figura N°3. Gráfico de barras de los porcentajes del efecto antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. y grupo Naproxeno Sódico con respecto al grupo control.

4.1.7. Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos, en los diferentes tratamientos, se analizaron estadísticamente mediante Análisis descriptivo e inferencial con el programa SPSS versión 22, para evaluar el efecto del extracto alcohólico sobre los diferentes tratamientos con niveles de significancia del 95% ($p < 0.05$) por un test de ANOVA y luego por uno de comparación múltiple (Test de Tukey-Kramer) (anexo N° 27, 28) para determinar si existen diferencias significativas. Tabla N°12.

Tabla N°12: Resultados del ensayo antiinflamatorio y análisis estadístico por el test de Tukey-Kramer.

Grupo	Dosis (mg/kg)	Δ pesos +/- ds	% Efecto Antiinflamatoria	Diferencia Estadística
Control	0	0.66 ± 0.07	0	-
Naproxeno Sódico	40	0.09 ± 0.06	86.10	* $p < 0,05$
Dosis 1	250	0.53 ± 0.15	19.33	$p > 0,05$
Dosis 2	500	0.28 ± 0.06	58.00	* $p < 0,05$
Dosis 3	1000	0.13 ± 0.07	80.97	* $p < 0,05$

* $p < 0.05$: Diferencia estadísticamente significativa según el test de Tukey-Kramer;

*ds: Desviación estándar

4.1.8. Contrastación de hipótesis

Para la contrastación de hipótesis, se procedió a aplicar Análisis descriptivo e inferencial con el programa SPSS versión 22.

La prueba estadística de ANOVA, que permite la comparación de las puntuaciones medias entre más de dos grupos muestrales, como es el caso de esta investigación, que considera un grupo de control y cuatro grupos experimentales. El propósito de esta prueba es establecer si existe o no diferencias significativas entre los grupos.

En la primera hipótesis específica: El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. contienen tipos de metabolitos relacionados con el efecto antiinflamatorio. Luego de haber realizado la marcha fitoquímica se determinó la presencia de tipos de metabolitos compuestos fenólicos como flavonoides, glicosidos que podrían ser los responsables del efecto antiinflamatorio y alcaloides (tabla N°7). Por lo que se acepta la primera hipótesis específica.

En la segunda hipótesis específica: El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta efecto antiinflamatorio a diferente dosis en ratas albinas. El ensayo farmacológico se realizó utilizando 5 grupos: Control; dosis de 250, 500 y 1000mg/kg de extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.; Naproxeno 40mg/kg. Se utilizaron 3 dosis del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. Por lo que se segmenta en 3 sub hipótesis específicas. Al evidenciarse un p-valor mayor a 0.05 se puede rechazar la primera sub hipótesis específica: “El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta efecto antiinflamatorio a 250 mg/kg en ratas albinas”, debido a que no muestra una diferencia estadísticamente significativa.

Al evidenciarse un p-valor menor a 0.05 se puede aceptar la segunda sub hipótesis específica: “El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta efecto antiinflamatorio a 500 mg/kg en ratas albinas”, debido a que muestra una diferencia estadísticamente significativa.

Al evidenciarse un p-valor menor a 0.05 se puede aceptar la tercera sub hipótesis específica: “El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta efecto antiinflamatorio a 1000 mg/kg en ratas albinas”, debido a que muestra una diferencia estadísticamente significativa.

Se acepta la hipótesis general al comprobar que dos dosis del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta efecto antiinflamatorio.

4.1.9. Discusión de resultados

En el procedimiento del ensayo de solubilidad realizada al extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. se determinó que es muy soluble en metanol y etanol, así mismo poco soluble en n-butanol, agua, acetato de etilo, acetona. (Tabla N°6).

La marcha fitoquímica del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. determinó la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides, glicosidos y alcaloides (Tabla N°7). Por otro lado en la investigación Padilha M. et al. “Antiinflammatory properties of *Morus nigra* L. leaves”. Se determinó en el extracto de cloruro de metileno de hojas de *Morus nigra* L. la presencia de esteroides y triterpenoides coincidiendo con nuestra investigación en la presencia de esteroides pero en escasas cantidades. (40).

Se procedió a la identificación por cromatografía al compuesto fenólico “flavonoides” debido a que se le atribuye la actividad antiinflamatoria. (44,45).

En el proceso de identificación de flavonoides se logró una buena separación con el sistema de solventes n-butanol: ácido acético: agua (3:1:1), (anexo 14). Se obtuvo para la muestra del extracto Rf. de 0.839 la cual fue comparada con el estándar de quercetina que obtuvo un Rf de 0.897 demostrándose así probablemente la presencia de quercetina en el extracto de hojas *Morus nigra* L.

La cuantificación de flavonoides totales, (anexo 15), se realizó con la finalidad de confirmar la presencia de metabolito secundario en el

extracto de hojas *Morus nigra* L obteniéndose 3.26 mg de quercetina / mL del extracto.

El ensayo de toxicidad oral aguda evidencio que el extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta una DL₅₀ mayor a 2000 mg/kg de peso corporal y que según la guía OECD para evaluar sustancias químicas debería tener un DL₅₀ \geq 5000 mg/kg. (40). Por otro lado Olivera y col.et al. en la investigación “Evaluation of Toxicity and Antimicrobial Activity of an Ethanolic Extract from Leaves of *Morus alba* L. (*Moraceae*)” No evidenciaron señales de toxicidad en los 14 días de experimentación pero si un efecto sobre el volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media de los eritrocitos comparados con el control a 2000mg/kg de peso corporal, con el extracto de hojas de *Morus alba* L. proveniente de Brasil.(41)

La presente investigación ha demostrado que extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta efecto antiinflamatorio en ratas albinas, evidencian efecto antiinflamatorio en las dosis utilizadas en la investigación (250,500 y 1000 mg/kg). Pero solo las dosis de 500 mg/kg con 58 por ciento y 1000 mg/kg con 80.97 por ciento, muestran diferencias significativas ($p < 0,05$), este hecho puede estar relacionado con algunos metabolitos presentes en el extracto, demostrando que a mayor dosis mayor efecto antiinflamatorio en comparación con el grupo naproxeno sódico 40 mg/kg y el grupo control .Así mismo en la investigación Padilha M. et al. “Antiinflammatory properties of *Morus nigra* L. leaves”. Se determinó efectos antiinflamatorios en el extracto de cloruro de metileno de hojas de *Morus nigra* L. a dosis 30 ,100 y 300 mg/kg en grupos experimentales de 8 ratas reduciendo significativamente ($p < 0,05$) el edema de la pata de la rata, logrando un efecto similar en comparación con la indometacina 10mg/kg (40). A diferencia de nuestra investigación utilizamos mayor dosis debido al resultado del ensayo de toxicidad oral aguda (presenta una DL₅₀ mayor a 2000 mg/kg) demostrando que a dosis mayores (250, 500 y 1000mg/kg) presenta efecto antiinflamatorio.

Por otro lado Chen y et al. (2016) En la investigación: "Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L.)" Analizaron la actividad antiinflamatoria del extracto de flavonoides del fruto de *Morus nigra* L. en ratones Kunming se dividieron en seis grupos: Control, solución salina, aspirina (75 mg/kg); dexametasona (3 mg/kg); extracto de flavonoides de 50; 100 y 200 mg/ kg. Los ratones se mantuvieron en la alimentación adaptativa durante 5 días antes de la administración de los tratamientos. El Control, los fármacos y el extracto se administraron por sonda a los correspondientes grupos de ratones una vez al día durante 7 días. Una hora después de la última dosis, los lados ventrales y dorsales de la oreja derecha se trataron tópicamente con 200 μ L de xileno. Una hora después del tratamiento xileno, los ratones se sacrificaron y cortes de 6 mm se hicieron en ambas orejas. Cada disco de la oreja se pesó. El edema de la oreja se redujo significativamente a 65,2 por ciento en Dexametasona en relación al control, con la Aspirina 94,3 por ciento ($p < 0,05$) dio lugar a un mayor grado de efecto antiinflamatorio, el edema de la oreja a una dosis de extracto de 200 mg/kg inhibió significativamente a un 60,1 por ciento ($p < 0,05$). Se evidencia efecto antiinflamatorio a 200 mg/kg del extracto de flavonoides (24). Comparando con nuestra investigación extracto de hojas de *Morus nigra* L. demostramos efecto antiinflamatorio utilizamos a mayores dosis (250, 500 y 1000mg/kg), comparando el peso de las patas de la ratas.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

5.1.1. El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presenta compuestos fenólicos como flavonoides, glicosidos que podrían ser los responsables de la actividad antiinflamatoria y alcaloides.

5.1.2. El extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. presentan efecto antiinflamatorio a dosis de 500 mg/kg y 1000 mg/kg. La dosis 1000 mg/kg tiene buen efecto antiinflamatorio.

5.2. RECOMENDACIONES

5.2.1. Realizar investigaciones para evidenciar los posibles efectos tóxicos tópicos y sistémicos (agudos y crónicos) del extracto de hojas de *Morus nigra* L.

5.2.2. Continuar investigaciones del extracto alcohólico hojas de *Morus nigra* L., mediante la separación de flavonoides que podrían ser los responsables del efecto antiinflamatorio.

5.2.3 .Se recomienda para las futuras investigaciones utilizar laboratorios equipados, para así poder trabajar con tranquilidad y seguridad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García P. Inflamación. Cienc Exact Fís Nat [Internet]. 2008;102(1):91–159. Disponible en: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>
2. Mantovani A. The inflammation - cancer connection. FEBS J [Internet]. 2018;285(4):638–40. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14395>
3. Platz EA, De Marzo AM. Epidemiology of inflammation and prostate cancer. J Urol [Internet]. 2004;171(2 II):36–40. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000108131.43160.77>
4. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. Oncogene [Internet]. 2000;18(55):7908–16. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.onc.1203286>
5. OMS. Cáncer [Internet]. Organización mundial de la salud. 2017 [citado 6 de marzo de 2018]. p. 1. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
6. Base de datos nacional de defunciones. Principales causas de mortalidad por sexo Perú año 2014. MINSA. 2015. p. 1.
7. Castranova V, Asgharian B, Sayre P, Virginia W, Carolina N. A systemic inflammation mortality risk assessment contingency table for severe sepsis. Pediatr Crit Care Med [Internet]. 2016;18(2):1922–2013. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/PCC.0000000000001029>
8. OMS. Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis [Internet]. Organización mundial de la salud. 2017 [citado 6 de marzo de 2018]. p. 1. Disponible en: <http://www.who.int/sepsis/en/>
9. OMS. Recursos para usar y compartir [Internet]. Iniciativa global de sepsis materna y neonatal. 2017 [citado 6 de marzo de 2018]. p. 1. Disponible en: <http://srhr.org/sepsis/es/resources/>
10. Betancourt MJ. Mortalidad infantil por quemaduras y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Rev medica del IMSS [Internet]. 2004;42(2):103–8.

Disponible en: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=1976>

11. Gibofsky A. Epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis: A Synopsis. *Am J Manag Care*. 2014;20(7 Suppl):S128----35.
12. Laine L. Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient [Internet]. Vol. 120, *Gastroenterology*. 2001. p. 594–606. Disponible en: <https://doi.org/10.1053/gast.2001.21907>
13. Tenenbaum J. The epidemiology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Can J Gastroenterol*. 1999;13(2):119–23.
14. OMS. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 [Internet]. Ginebra: Organización mundial de la salud ginebra; 2014. Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/
15. Cordell GA. Phytochemistry and traditional medicine - The revolution continues. *Phytochem Lett* [Internet]. 2015;10:xxviii–xl. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390014001001>
16. Cordell GA. Phytochemistry and traditional medicine – A revolution in process. *Phytochem Lett* [Internet]. 2011;4(4):391–8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874390011000796>
17. Dunstan CA, Noreen Y, Serrano G, Cox PA, Perera P, Bohlin L. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 1997;57(1):35–56. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00043-3)
18. Huahuarunta J. Determinación del valor nutritivo de la morera *Morus alba* a los 45 y 60 días de rebrote para su uso en la alimentación animal [Internet]. Universidad nacional de san antonio abad del cusco; 2015. Disponible en: <http://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/UNSAAC/133>
19. Villanueva BE. Determinación del valor nutritivo y energético de las hojas de morera (*Morus alba*) y eritrina (*Erythrina* sp) para cuyes [Internet]. Universidad privada antenor orrego; 2016. Disponible en:

<http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/2950>

20. Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, Dos Santos MH, et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phyther Res* [Internet]. 2010;24(10):1496–500. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ptr.3134>
21. Basnet P, Kadota S, Terashima S, Shimizu M, Namba T. Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing fractions of *Morus insignis*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1993;41(7):1238–43.
22. Cazaña Y, Valdivia A, Perez Y, Diaz M. Morera (*Morus alba*, linn): propiedad antiinflamatoria [Internet]. Matanzas; 2010. p. 7. Disponible en: <http://monografias.umcc.cu/monos/2010/AGRONOMIA/mo10116.pdf>
23. Díaz M, Lugo Y, Fonte L, Castro I, López O, Montejo IL. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. Pastos y forrajes [Internet]. 2017;40(1):40–5. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942017000100006&lng=es&nrm=iso
24. Chen H, Pu J, Liu D, Yu W, Shao Y, Yang G, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra* L). *PLoS One* [Internet]. 2016;11(4):1–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153080>
25. Villalba EW. Inflamación I. *Rev Actual Clínica* [Internet]. 2014;43:2261–5. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000400004&lng=es&nrm=iso
26. Karin M, Lawrence T, Nizet V. Review innate immunity gone awry : linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* [Internet]. 2006;124(4):823–35. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.016>
27. Rosado-pérez J, Mendoza-núñez VM. Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica* [Internet]. 2007;32(2):59–69. Disponible

- en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2007/bq072d.pdf>
28. Bórdes R, Martínez M, Gercía E, Guisado R. El proceso inflamatorio. *Rev Enfermería* [Internet]. 1994;4:9–12. Disponible en: http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero_4/pinflamatorio4.htm
 29. Toledo CL. Inflamación: mediadores químicos. *Rev Actualización Clínica* [Internet]. 2014;43:2266–70. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S230
 30. Fernández F, Torres M. Inflamación y plantas medicinales [Internet]. Organización panamericana de la salud. 2010 [citado 1 de febrero de 2018]. p. 25. Disponible en: http://www.paho.org/cub/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=mnt&alias=896-inflamacion-y-plantas-
 31. Lock de Ugaz O. *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. 3ª ed. Lima: Fondo editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 2017. 288 p.
 32. Balez R, Steiner N, Engel M, Muñoz SS, Lum JS, Wu Y, et al. Neuroprotective effects of apigenin against inflammation , stem cell model of Alzheimer ' s disease. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:1–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep31450>
 33. Devi KP, Malar DS, Nabavi SF, Sureda A, Xiao J, Nabavi SM, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res* [Internet]. 2015;99:1–10. Disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.002>
 34. Fidias G. Arias. *El Proyecto de Investigación, Introducción a la Metodología Científica*. 6ta Edic. Venezuela. [Internet]. (2012). Disponible en <https://metodologiaecs.files.wordpress.com/2014/07/el-proyecto-de-investgfi>
 35. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* [Internet]. 2016;8(3):1–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/nu8030167>
 36. Sadowska-krowicka H, Mannick EE, Oliver PD, Sandoval M, Zhang X, Clark

- DA, et al. Genistein and gut Inflammation: role of nitric oxide. *Exp Biol Med* [Internet]. 1998;217(3):351–7. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.3181/00379727-217-44244>
37. *Morus nigra* L [Internet]. Plant for a future. 1996 [citado 5 de abril de 2018]. p. 1. Disponible en:
<https://www.pfaf.org/user/plant.aspx?latinname=Morus+nigra>
38. Albertasse PD, Thomaz LD, Andrade MA. Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. *Rev Bras Plantas Med*. 2010;12(3):250–60.
39. Adnan M, Ullah I, Tariq A, Murad W, Azizullah A, Khan AL, et al. Ethnomedicine use in the war affected region of northwest Pakistan. *J Ethnobiol Ethnomed* [Internet]. 2014;10(1):1–16. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1186/1746-4269-10-16>
40. Gürdal B, Kültür Ş. An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *J Ethnopharmacol*. 2013;146(1):113–26.
41. Amini MH, Hamdam SM. Medicinal plants used traditionally in guldara district of kabul Afghanistan. *Int J Pharmacogn Chinese Med* [Internet]. 2017;1(3):1–13. Disponible en:
<https://medwinpublishers.com/IPCM/IPCM16000118.pdf>
42. Kumar K, Sharma YP, Manhas RK, Bhatia H. Ethnomedicinal plants of Shankaracharya Hill, Srinagar, J&K, India. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015;170(1):255–74. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.05.021>
43. Bussmann RW, Paniagua Zambrana N, Rivas Chamorro M, Molina Moreira N, Rosario Cuadros Negri ML del, Olivera J. Peril in the Market- Classification and Dosage of Species Used as Anti-Diabetics in Lima, Peru. *J Ethnobiol Ethnomed*. 2013;9(37):1–7.
44. Chilquillo HM, Cervantes RG. Efecto antiinflamatorio analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Senecio canescens* Humb y Bonpl cuatrec vira vira [Internet]. Universidad nacional mayor de san

- marcos; 2017. Disponible en:
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6416>
45. Camacho MG, Honorio CD. Evaluación del efecto antiinflamatorio en ratas albinas según el modelo edema plantar y efecto analgésico en ratones albinos según el modelo tail flick del extracto etanólico de Dalea isidori barneby yerbechil [Internet]. Universidad mayor de san marcos; 2017. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6410>
 46. Carpio DP, Ramon LE. Evaluación del efecto antiinflamatorio de las sustancias contenidas en las hojas de llantén Plantago major L a través de la técnica de inducción de granuloma por algodón [Internet]. Universidad de cuenca; 2009. Disponible en:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2440>
 47. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem [Internet]. 1999;64(4):555–9. Disponible en:
[http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
 48. OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method [Internet]. Paris: OECD Publishing; 2002. 14 p. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1787/9789264071001-en>
 49. CYTED. 270 Plantas medicinales iberoamericanas. 1ª ed. Gupta MP, editor. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo - Subprograma de Química fina Farmacéutica; 1996. 87-93 p.
 50. (OCDE). guideline For testing of chemicals: acute dermal toxicity-fixed dose procedure [Internet]. OCDE; 2004. Disponible en:
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/32037747.pdf>
 51. Padilha M de M, Vilela FC, da Silva MJD, dos Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of the extract of Morus nigra leaves in mice. J Med Food [Internet]. 2009;12(6):1381–5. Disponible en:
<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jmf.2009.0012>
 52. DoNascimento S, Romao AC. Atividade fitoestrogenica de Morus nigra L

- Moraceae em ratas ovariectomizadas. Eur Menopause J [Internet]. 2012; Disponible en: [https://tedebc.ufma.br/jspui/bitstream/tede/68/1/TESE SELMA DO NASCIMENTO SILVA.pdf](https://tedebc.ufma.br/jspui/bitstream/tede/68/1/TESE_SELMA_DO_NASCIMENTO_SILVA.pdf)
53. Reddy PV, Sreenivas N, Urooj A. Acute toxicological studies of leaf extracts of *Morus indica* L. in rats. Ann Phytomedicine An Int J [Internet]. 2016;5(2):108–12. Disponible en: [http://ukaazpublications.com/attached/publications/Vanitha Reddy \(108-112\).pdf](http://ukaazpublications.com/attached/publications/Vanitha Reddy (108-112).pdf)
54. de Oliveira AM, Mesquita M da S, da Silva GC, de Oliveira Lima E, de Medeiros PL, Paiva PMG, et al. Evaluation of Toxicity and Antimicrobial Activity of an Ethanolic Extract from Leaves of *Morus alba* L. (Moraceae). Evidence-Based Complement Altern Med [Internet]. 2015;2015:1–7. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2015/513978/>
55. Zelova H, Hanakova Z, Cermakova Z, Smejkal K, Acqua SD, Babula P, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of prenylated substances isolated from *Morus alba* and *Morus nigra*. J Nat Prod [Internet]. 2014;77(6):1297–1303. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/np401025f>
56. Ilyas R, Andleeb S, Babar M, Mustafa R, Shafique I, Zafar A, et al. Comparative evaluation of biological activities, bioautography and spot screening of boiled and macerated extracts of medicinal plants against zoonotic pathogens. Br Microbiol Res J [Internet]. 2016;14(3):1–13. Disponible en: <http://sciencedomain.org/abstract/14386>
57. Wadood A, Ghufuran M, Jamal SB, Naeem M, Khan A, Ghaffar R, et al. Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Occurring in Local Area of Mardan. Biochem Anal Biochem [Internet]. 2013;2(4):2–5. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/phytochemical-analysis-of-medicinal-plants-occurring-in-local-area-of-mardan-2161-1009.1000144.php?aid=21624>
58. Ramos J, David ES, Waing KGD. Phytochemical screening and antibacterial testing of different varieties of *Morus* spp. (Mulberry). J Biol Eng Res Rev. 2016;3(1):44–8.

59. Pedro Lorenzo Fernández . Farmacología Básica y Clínica (eBook online)
18ª Edición. Octubre 2008:516-525.
Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?isbn=8498354811>
60. Narciso León S. Luis Félix V., Juana Chávez F., Paola Quispe F. Estudio Preliminar de la Actividad Antiinflamatoria del Extracto etanólico de los tallos de *Ageratina sternbergiana* (DC.) R.M. King & H. Rob (Zun Zun). [Internet]. (2011). Disponible en:
https://guzlopeditoras.com/web_des/bio01/biomedicina/pld0375.pdf

Anexo N°1: Matriz de Consistencia.

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		METODOLOGÍA
¿El extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L. presentará efecto antiinflamatorio en ratas albinas?	Determinar el efecto antiinflamatorio del extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L en ratas albinas.	El extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L. presenta efecto antiinflamatorio en ratas albinas.	V1: INDEPENDIENTE	INDICADORES	Nivel: Explicativo Diseño: Experimental Técnicas: Observación. Instrumentos de Recolección de datos: Ficha de Observación de recolección de datos Ad-hoc Población y Muestra: La población del estudio fitoquímico fueron 6 árboles en 6m ² y la muestra son 3kg. de hojas frescas de <i>Morus nigra</i> L. El estudio farmacológico utilizó 25 ratas albinas machos cepa Holtzman, según la Validación UPCH: Ensayos farmacológicos. Procesamiento y análisis de datos: Análisis descriptivo e inferencial con el programa SPSS versión 22. ANOVA y Test de Tukey-Kramer.
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	Los componentes químicos del Extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L.	-Presencia de compuestos fenólicos -Glicosidos -Alcaloides	
1. ¿Qué tipos de metabolitos presentará el extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L.? 2. ¿A qué dosis el extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L. presentará efecto antiinflamatorio en ratas albinas?	1. Identificar los tipos de metabolitos presentes en el extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L. que se relacionan con el efecto antiinflamatorio. 2. Evaluar el efecto antiinflamatorio en varias dosis del extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L. en ratas albinas.	1. El extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L. contienen tipos de metabolitos relacionados con el efecto antiinflamatorio. 2. El extracto alcohólico de hojas de <i>Morus nigra</i> L. presenta efecto antiinflamatorio a diferente dosis en ratas albinas.	V2: DEPENDIENTE	INDICADORES	
			Efecto antiinflamatorio	Diferencia de pesos de las patas de la rata (pata derecha con edema inducido y pata izquierda).	

Anexo N°2: Certificación Botánica

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta proporcionada por las Srtas. MAYHUA PONCE DIANA y AVENDAÑO TARAZONA AMILCA, tesistas de la UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA, Facultad Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Morus nigra* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Hamamelidae
Orden: Urticales
Familia: Moraceae
Género: *Morus*
Especie: *Morus nigra* L.

Se expide la presente certificación a solicitud de las interesadas para los fines que estime conveniente.

Lima, 23 enero 2018


Bigo. Hamilton Beltrán
.....
Hamilton Wilmer Beltran Santiago
Biologo - Botánico
CBP 2719

Figura N°4. Certificación Botánica de *Morus nigra* L.

Anexo N°3: Validación UPCH: Ensayos farmacológicos: Actividad Antiinflamatoria por edema plantar.

 <p style="text-align: center;">UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA</p> <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p style="text-align: center;">Servicio de Control de Calidad</p>	
ST-FR-015.00 2016-05-20 Rev. 00	Pág. 1 de 6
INFORME TÉCNICO N° IT054-2016	
Nombre Comercial : HIG-AZHAM Nombre Genérico : — Documento de Referencia : Cotización N° P0127A-2016 Acta de Muestreo o Pesquisa : — Lugar de Muestreo o Pesquisa : — Muestreado o Pesquizado por : El Cliente Código del SCC : EPO90-N13-2016 Laboratorio Fabricante : LABORATORIO MEGAECUAFARMA NATURAL Importador : — Distribuidor : — Forma de Presentación : Caja x 1 Frasco x 500 mL Forma Farmacéutica : EXTRACTO ACUOSO Número de Lote : 2080116 Fecha de Vendimiento : 08-01-2018 Cantidad Recibida : 2 Frascos Análisis Solicitado por : MANUEL ZAVALETA MALDONADO Análisis Solicitado : Efecto Farmacológico: Actividad Antiinflamatoria Dirección del Solicitante : Quito - Ecuador Fecha de Recepción por el SCC : 22/08/2016	
Técnica: Validación UPCH: Ensayos farmacológicos: Actividad Antiinflamatoria por edema plantar	
RESUMEN	
<p>Este estudio fue realizado para LABORATORIO MEGAECUAFARMA NATURAL con el objetivo de determinar el probable Efecto Farmacológico: Actividad Antiinflamatoria del producto HIG-AZHAM. La vía de administración usada correspondió a la vía oral en un tratamiento por 21 días. El producto de prueba fue administrado mediante sondas nasogástricas a diferentes niveles de concentraciones en un total de 15 ratas albinas machos (3 niveles de dosis), 5 ratas control positivo (Naproxeno Sódico 40 mg/kg) y 5 ratas control de la cepa Holtzman, de acuerdo al procedimiento de Validación del ensayo por edema plantar.</p> <p>Se realizaron observaciones del proceso inflamatorio generado por la administración de Carragenina al 1% a nivel de la aponeurosis plantar de la rata. Al final del estudio se compararon los pesos de los procesos inflamatorios generados a nivel plantar en las patas de los animales de experimentación.</p> <p>La muestra analizada de HIG-AZHAM presenta Actividad Antiinflamatoria en el modelo estudiado, a las dosis de 500 y 1000 mg de muestra/Kg de ratón.</p>	
UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN INVESTIGACIÓN Av. Honorio Delgado N° 430, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres / P.O. Box 4314, Lima 100 Directo: (511) 483-2188 / Central: (511) 319-0000 anexos: 2424 ó 2427 / Fax: (511) 382-0321 e-mail: control.calidad@oficinax-upch.pe / leon.villagas@upch.pe Página Web: www.upch.pe	

Figura N°9. Validación UPCH.

Anexo N° 4: Certificado de sanidad de los animales de experimentación.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CERTIFICADO

Lima, 05 de Febrero del 2018

Mediante la presente se certifica que los 31 ratas albinas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Holtzman, machos con un promedio de peso de 220 g, adquiridos el 02 de febrero del 2018, se encuentran en estado sanitario y fisiológico para ser utilizado en cualquier protocolo biomédico.

Se expide este documento para fines pertinentes.

Atentamente,



DR. CHERIFIA PITOT ALFARO
Jefe de Resorte
LII - UNICE
C.M.V. 0000

Av. Honorio Delgado N° 430, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres / P.O. Box 4314, Lima 100
Central: (511) 319-0000 anexos: 2710
Página Web: www.upch.pe

Figura N°6. Certificado de sanidad de las ratas albinas.

Anexo N° 5: Instrumentos de Recolección de Datos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

N°: 1

FICHA OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Morus nigra* L. EN RATAS ALBINAS. (RENDIMIENTO Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO)

1. Fecha de recolección:
2. Lugar de recolección de hojas:
3. Peso de hojas frescas:
4. Temperatura de secado de las hojas:
5. Disolvente de extracción:
6. Tiempo de extracción:
7. Técnica de extracción:
8. Temperatura del secado del extracto:
9. Peso del extracto (seco):
10. Ensayo de tamizaje fitoquímico:

Reactivo	Fehling	Lugol	Molish	2,4-DNF	Ninhidrina	Shinoda	FeCl ₃	Gelatina	Liebermann-burchard	Mayer	Wagner	Dragendorff
Compuesto Activo	Azúcares reductores	Almidón	Carbohidratos	Cetónas	Aminoácidos	Flavonoides	Taninos	Taninos	Esterooides	Alcaloides	Alcaloides	Alcaloides
Color												
Presencia: (+) Ausencia: (-)												

Leyenda: Abundante: +++; Regular: ++, Leve: +

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

N°: 2

**FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE
RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN
DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO
ALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Morus nigra* L. EN RATAS
ALBINAS.**

1. Ratas albinas:
2. Diseño de estudio:
3. Agente inductor:
4. Vía de administración del agente inductor:.....
5. Dosis del agente inductor:
6. Sexo de los animales de experimentación:.....
7. Días de ambientación de la rata:.....
8. Hora de la aplicación:.....
9. Tratamiento: g(gramos)
 - Control
 - Naproxeno Sódico 40mg/kg
 - Extracto al 250mg/kg
 - Extracto al 500mg/kg
 - Extracto al 1000mg/kg
10. Hora de la aplicación del tratamiento:.....
11. Fecha de inicio:..... Fecha de término:.....

Anexo N° 7: Validación de Instrumentos. Dr. Nesquen Tasayco Yataco

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**
FACULTAD DE CIENCIA FARMACÉUTICAS Y BIOQUIMICA
HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS
EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE HOJAS DE *Morus nigra* L.
EN RATAS ALBINAS

Luego de haber revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS QUE
50-60-70-80-90-100

1. ¿En qué porcentaje se estima que con éste instrumento se logran los objetivos propuestos? -----() () () () () (X)
2. ¿En qué porcentaje se estima que los ítems están referidos a los conceptos del tema?----- () () () () () (X)
3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr sus objetivos?----- () () () () (X) ()
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable?----- () () () () () (X)
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?----- () () () () () (X)
6. ¿En qué porcentaje valora Ud. que con este instrumento se obtendría datos similares si se aplicaría en otras muestra?----- () () () () (X) ()

Sugerencias:

1. ¿Qué ítem considera usted que debería agregarse?

2. ¿Qué ítem estimaría que debería eliminarse?

3. ¿Qué ítem considera Ud. debería reformularse o precisarse mejor?

Validado por: Dr. Nesquen Tasayco Y. Firma: [Firma]
16/02/2018

Figura N°7: Validación de Instrumentos. Dr. Nesquen Tasayco. Ficha N° 1

Anexo N° 8: Validación de Instrumentos. Dr. Nesquen Tasayco Yataco

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**
FACULTAD DE CIENCIA FARMACÉUTICAS Y BIOQUIMICA
HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS
EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE HOJAS DE *Morus nigra* L.
EN RATAS ALBINAS

Luego de haber revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS QUE
50-60-70-80-90-100

1. ¿En qué porcentaje se estima que con éste instrumento se lograran los objetivos propuestos? -----() () () () () (X)

2. ¿En qué porcentaje se estima que los ítems están referidos a los conceptos del tema?----- () () () () () (X)

3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr sus objetivos?----- () () () () (X) ()

4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable?----- () () () () () (X)

5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?----- () () () () () (X)

6. ¿En qué porcentaje valora Ud. que con este instrumento se obtendría datos similares si se aplicaría en otras muestra?----- () () () () (X) ()

Sugerencias:

1. ¿Qué ítem considera usted que debería agregarse?

2. ¿Qué ítem estimaría que debería eliminarse?

3. ¿Qué ítem considera Ud. debería reformularse o precisarse mejor?

Validado por: Dr. Nesquen Tasayco Y. Firma: 
16/02/2018

Figura N°8: Validación de Instrumentos. Dr. Nesquen Tasayco. Ficha N° 2

Anexo N° 9: Validación de Instrumentos. Mg. Jacinto Hervías, Pedro



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIA FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA
HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE HOJAS DE *Morus nigra* L. EN RATAS ALBINAS

Luego de haber revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS QUE
50-60-70-80-90-100

1. ¿En qué porcentaje se estima que con éste instrumento se logran los objetivos propuestos? -----() () () () ()
2. ¿En qué porcentaje se estima que los ítems están referidos a los conceptos del tema?-----() () () () ()
3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr sus objetivos?-----() () () () ()
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable?-----() () () () ()
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?----- () () () () ()
6. ¿En qué porcentaje valora Ud. que con este instrumento se obtendría datos similares si se aplicaría en otras muestra?-----() () () () ()

Sugerencias:

1. ¿Qué ítem considera usted que debería agregarse?

2. ¿Qué ítem estimaría que debería eliminarse?

3. ¿Qué ítem considera Ud. debería reformularse o precisarse mejor?

Validado por: Mg. Q.F. Pedro Jacinto Hervías Firma: 
16/02/18

Figura N°9: Validación de Instrumentos. Mg. Jacinto Hervías, Pedro. Ficha N° 1

Anexo N° 10: Validación de Instrumentos. Mg. Jacinto Hervías, Pedro



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIA FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA
HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE HOJAS DE *Morus nigra* L. EN RATAS ALBINAS

Luego de haber revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

MENOS QUE
50-60-70-80-90-100

1. ¿En qué porcentaje se estima que con éste instrumento se logran los objetivos propuestos? -----() () () () ()
2. ¿En qué porcentaje se estima que los ítems están referidos a los conceptos del tema?-----() () () () ()
3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr sus objetivos?-----() () () () ()
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable?-----() () () () ()
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?----- () () () () ()
6. ¿En qué porcentaje valora Ud. que con este instrumento se obtendría datos similares si se aplicaría en otras muestra?-----() () () () ()

Sugerencias:

1. ¿Qué ítem considera usted que debería agregarse?

2. ¿Qué ítem estimaría que debería eliminarse?

3. ¿Qué ítem considera Ud. debería reformularse o precisarse mejor?

Validado por: Mg. Q.F. Pedro Jacinto Hervías Firma: 
16/02/18

Figura N°10: Validación de Instrumentos. Mg. Jacinto Hervías, Pedro. Ficha N° 2

Anexo N°11: Recolección y procesamiento pos cosecha.



Figura N° 11-14: Altura Del árbol *Morus nigra* L. 4.5 metros

Material biológico:



Figura N°15: Hojas de *Morus nigra*.L fresca



Figura N°16: Control de calidad de hojas de *Morus nigra* L.



Fig. N°17: Separación de hojas de *Morus nigra* L.

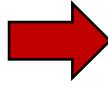


Fig. N°18: Hojas de *Morus nigra* L. colocado en caja de papel Kraft



Fig. N°19: Deseccación de hojas de *Morus Nigra* L.



Fig. N°20: Hojas desecadas de *Morus nigra* L.



Fig. N°21: Reducción de hojas secas de *Morus nigra* L. para realizar el macerado

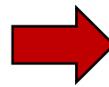


Fig. N°22: Macerado alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.

Anexo N°12: Ensayo de Solubilidad del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L.

1. Éter de petróleo



Figura N°23: Insoluble (-)

2. Cloroformo



Figura N°24: Insoluble (-)

3. Ciclohexano



Figura N°25: Insoluble (-)

4. Acetato de etilo



Figura N°26: Poco soluble (+)

4. Acetona



Figura N°27: Poco soluble (+)

5. Metanol



Figura N°28: Soluble (++)

7. Etanol



Figura N°29: Soluble (++)

8. n-Butanol



Figura N° 30: Poco soluble (+)

9. Agua



Figura N°31: Poco soluble (+)



Fig. N°32: Resultados del ensayo de Solubilidad

Anexo N°13: Marcha Fitoquímica del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra*
L.

1. Fehling A + Fehling B



Fig.N°33: anaranjado ladrillo

2. Lugol



Fig.N°34: Coloración oscura

3. Molish



Fig.N°35: Anillo violáceo

4. Ninhidrina



Fig.N°36: Color rosado

5. 2,4 DNFH.



Fig.N°37: pp. anaranjado

6. Shinoda



Fig.N°38: Tono rojo

7. FeCl_3



Fig.N°39: Verde azulado

8. Liebermann-bourchard



Figura N°40: Verde

9. Mayer



Fig. N°41: pp. Blanco

10. Wagner



Figura N°42: pp. Marrón

11. Dragendorff



Fig. N°43: pp. Naranja

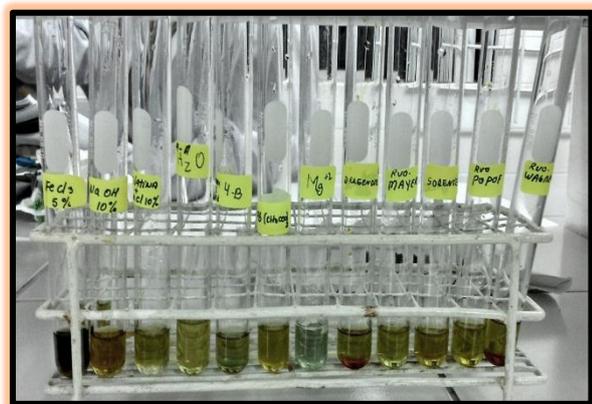


Fig. N°44: Resultados del ensayo de Marcha fitoquímico

Anexo N°14. Cromatografía en capa fina del extracto de hojas de *Morus nigra* L.

A. Flavonoides:

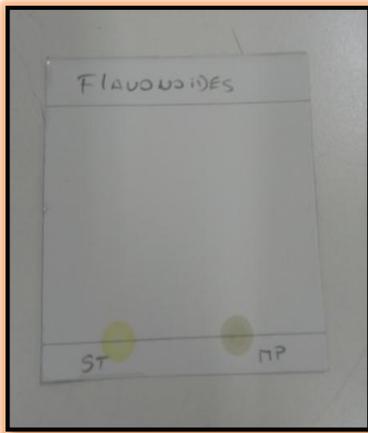


Fig. N°45. Sembrado de las muestras

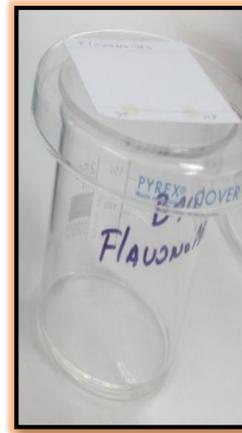


Fig. N°46. Cámara cromatográfica

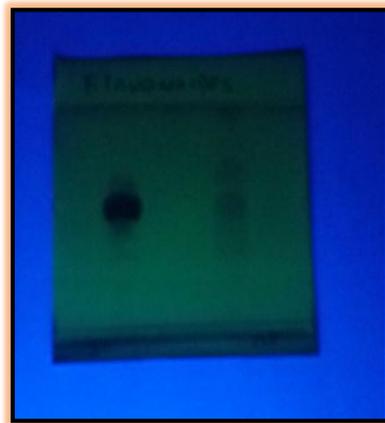


Fig. N°47. CCF a luz UV 254nm

Anexo N°15. Resultado de la lectura al Espectrofotómetro de hojas de *Morus nigra* L.

COPIA CONTROLADA

	SERVICIO DE CONTROL DE CALIDAD	Código y Versión: FQ-PR-035.00
	ÁREA DE ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS	Fecha de Emisión: 2016-01-11
	REPORTE DE CONTENIDO POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-Vis	Página 1 de 1

DATOS DEL PRODUCTO:

Nombre: <u>Morus nigra L.</u>	Fabricante: _____
Presentación: <u>Extracto de hojas Morus nigra L.</u>	Fecha de Vencimiento: <u>5/7</u>
Lot #: _____	Norma Técnica: <u>Técnica Interna SCC-SPCH</u>
Código SCC-UPCH: _____	Fecha de análisis: <u>2018-03-02</u>

SISTEMA ESPECTROFOTOMÉTRICO:

Equipo: ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS Código: RQ-FQ-32
 Longitud de onda: 412 nm

DATOS DEL ESTÁNDAR:

Nombre: QUERCETINA Primario: ✓ Secundario: --- Working Std: ---
 LOTE: A104792 612 Fecha de Vencimiento: _____
 Potencia: 100.0 % T/C Código: _____
 Peso molecular en forma de Sal: _____ Humedad: _____ %
 Peso: 50.2 mg Volumen envasado: 50 mL

Etiquetas de la curva

24 ug /mL. Vol. dilución 1: <u>1.2</u> mL. Vol. ensayo 1: <u>50</u> mL.	100 ug /mL. Vol. dilución 1: <u>5</u> mL. Vol. ensayo 1: <u>50</u> mL.	200 ug /mL. Vol. dilución 1: <u>10</u> mL. Vol. ensayo 1: <u>50</u> mL.
---	--	---

mg/mL	Factor de corrección	(mg/mL) Corregido	Absorbancia
0.02410	1	0.02410	0.14733
0.02410	1	0.02410	0.14671
0.02410	1	0.02410	0.14558
0.10040	1	0.10040	0.70464
0.10040	1	0.10040	0.70464
0.10040	1	0.10040	0.70464
0.20080	1	0.20080	1.39760
0.20080	1	0.20080	1.39760
0.20080	1	0.20080	1.39520



$y = bx + a$

ECUACIÓN DE LA RECTA: $Y = 7.065x - 0.017$

a: -0.017
b: 7.065

DATOS DE LA MUESTRA Morus nigra L.

Peso o volumen de muestra: 0.20 (mL) Volumen de ensayo: 20 (mL)

CÁLCULOS:

MUESTRA	ABSORBIANCIA
MUESTRA A1	0.24635
MUESTRA A2	0.24709
MUESTRA A3	0.24735
MUESTRA	3.2523
MUESTRA	3.2428
MUESTRA	3.2665
PROMEDIO	3.26

RESULTADOS: 3.26 ug de Quercetina/ mL de extracto

ESPECIFICACIONES/ OBSERVACIONES: Los Flavonoides Totales se expresan en mg equivalentes de Quercetina /mL de extracto

CONCLUSIÓN: _____

ANALISTA
2018-03-02
FECHA DE REPORTE

Figura N°48. Cuantificación de flavonoides totales de hojas de *Morus nigra* L.

Anexo N°16. Determinación de flavonoides totales

Se analizaron las absorbancias a 415 nm de longitud de onda para la determinación cuantitativa de flavonoides totales expresados en mg de quercetina por ml de extracto.

Para este ensayo se describió una gráfica en el sistema de coordenadas cartesianas para representar la curva de calibración con quercetina en la figura 2 donde las absorbancias se muestran en el eje "Y" y las concentraciones del estándar en el eje X (mg/ml).

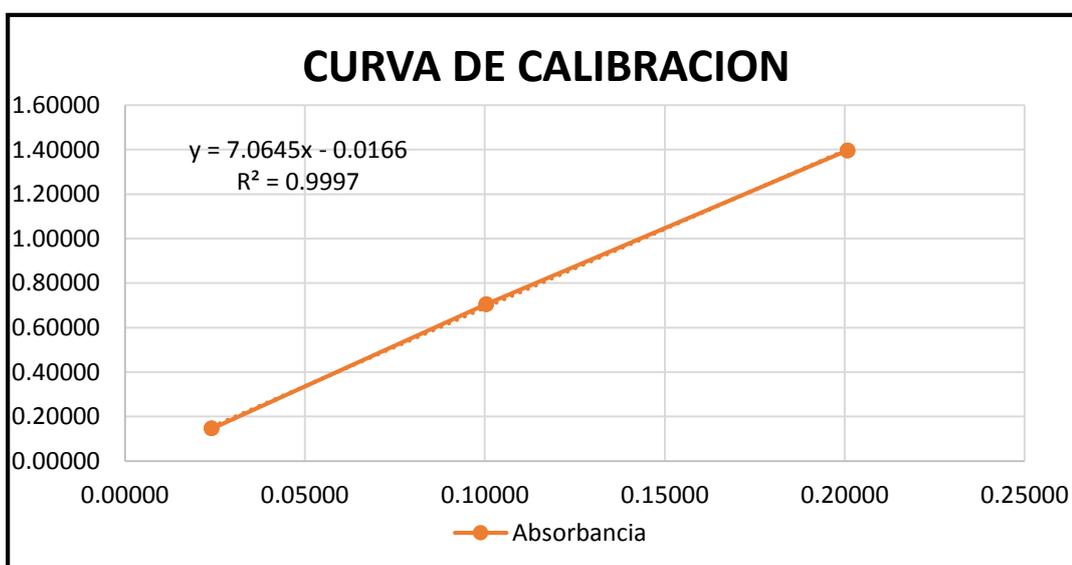


Figura N°49: Curva de calibración de quercetina para la determinación de flavonoides totales del extracto alcohólico de hojas de *Morus nigra* L. El eje Y expresa absorbancias y el eje X expresa concentraciones (mg/ml).

Ecuación de la recta en la curva de calibración fue:

$$y = 7.065 x - 0.017$$

Dónde:

$$a = 0.017, \quad b = 7.065$$

Anexo N°17. Preparación de las muestras problema:

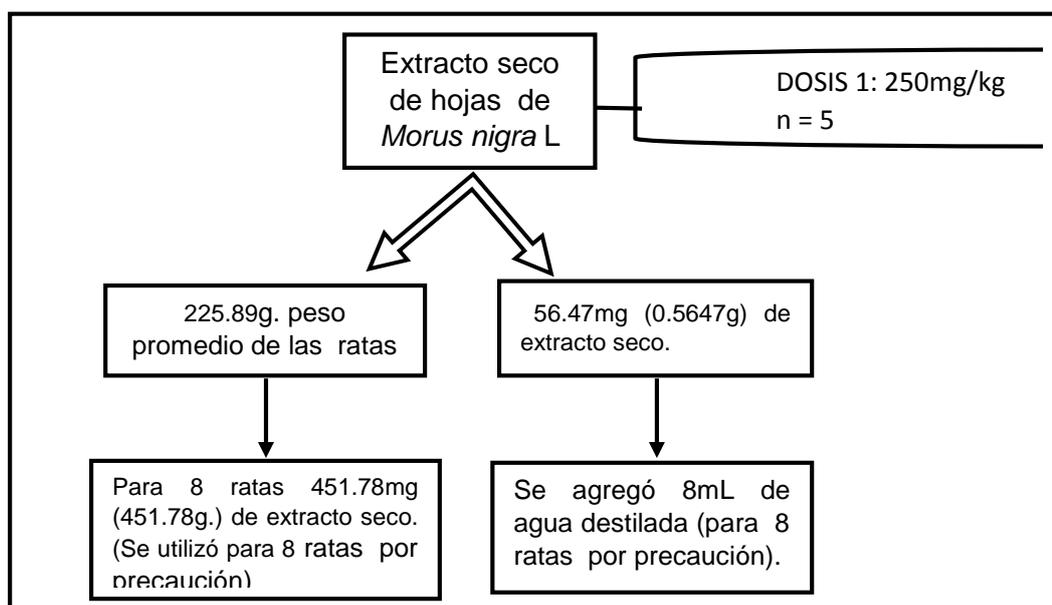


Figura N°50: Esquema de preparación de la dosis 1: 250mg/kg del extracto seco de hojas de *Morus nigra* L. para la determinación del efecto antiinflamatorio.

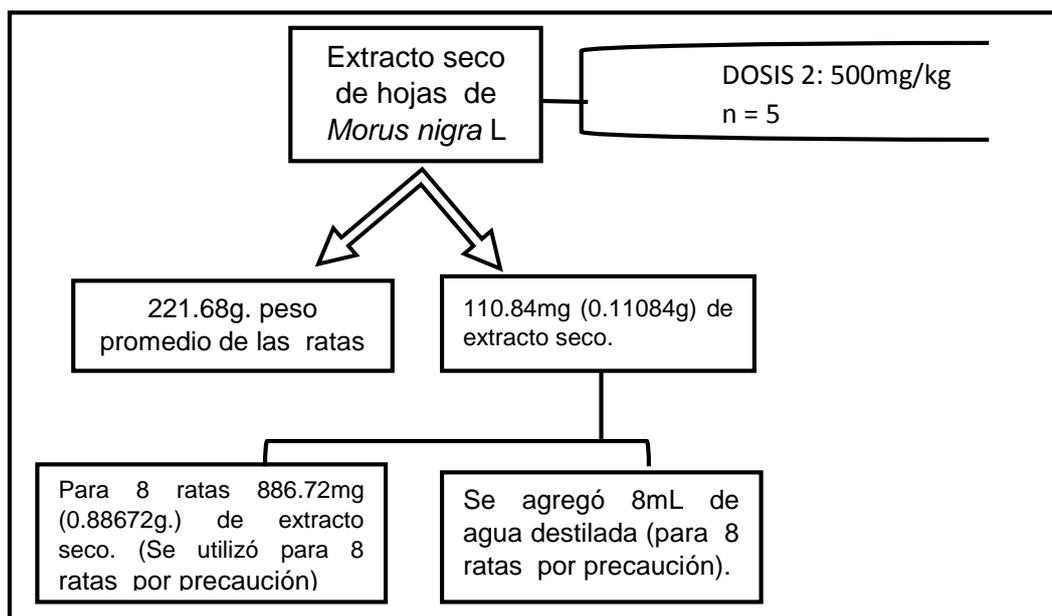


Figura N°51: Esquema de preparación de la dosis 2: 500mg/kg del extracto seco de hojas de *Morus nigra* L. para la determinación del efecto antiinflamatorio.

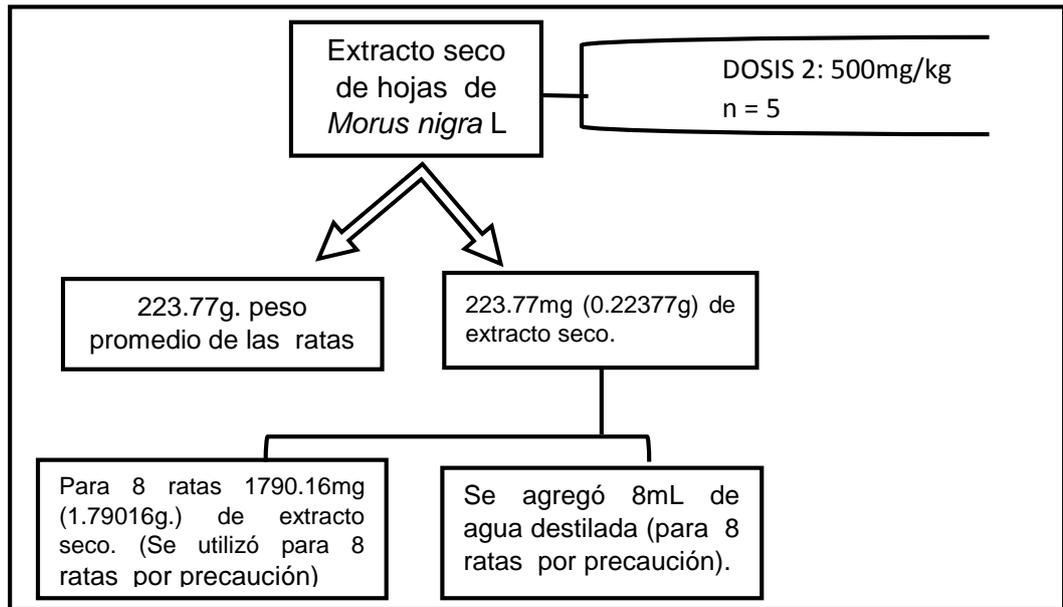


Figura N°52: Esquema de preparación de la dosis 3: 1000mg/kg del extracto seco de hojas de *Morus nigra* L. para la determinación del efecto antiinflamatorio.

**Anexo N°18: Efecto Antiinflamatorio del extracto de hojas de *Morus nigra* L.:
Pesado y separación de las ratas en grupos de experimentación.**



Fig. N°53: Preparandonos para realizar el trabajo



Fig. N°54: Realizando el pesado de las ratas



Fig. N°55: Realizando el pesado de las ratas

Anexo N°19: Grupos de experimentación y administración de dosis

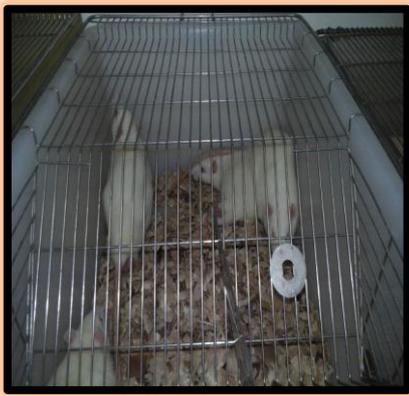


Fig. N°56: Grupo de Dosis Control



Fig. N°57: Grupo de Dosis 250mg/kg



Fig. N°58: Grupo de Dosis 500mg/kg



Fig. N°59: Grupo de Dosis 1000mg/kg



Fig. N°60: Grupo de Naproxeno 40mg/kg



Fig. N°61: Dosis para los grupos del Ensayo Farmacologico

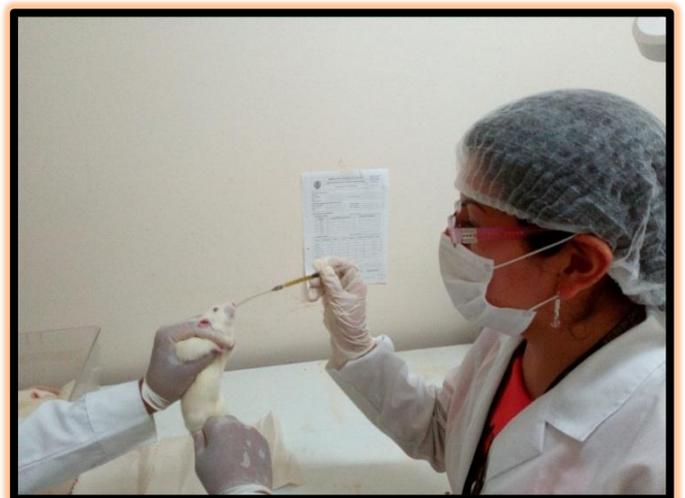


Fig. N°62: Administrando la dosis a los grupos de ensayo.



Fig. N°63: Administrando la dosis a los grupos de ensayo.

Anexo N°20: Inducción del Edema plantar en la pata trasera con Carragenina al 1 %

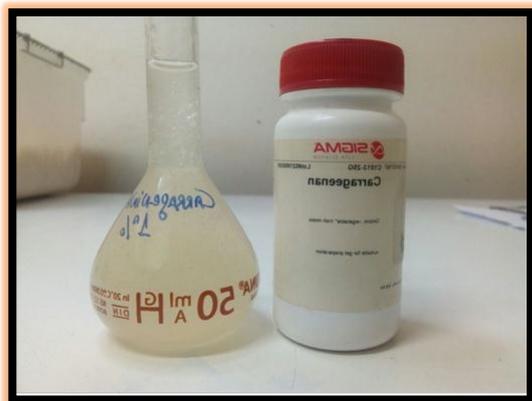


Fig. N°64: Carragenina 1%.



Fig. N°65: Preparando la Carragenina 1%.



Fig. N°66: Preparando la Carragenina 1%.



Fig. N°67: Aplicando la Carragenina 1% a las ratas



Fig. N°68: Aplicando la Carragenina 1% a las ratas



Fig. N°69: Induciendo el Edema plantar a la rata



Fig. N°70: Observando el Edema en la pata de la rata



Fig. N°71: Observando el Edema en la pata de la rata



Fig. N°72: Observando el Edema en la pata de la rata



Fig. N°73: Observando el Edema en la pata de la rata

Anexo N°21: Corte de las patas de las ratas



Fig. N°74: Preparando a las ratas para realizar el sacrificio

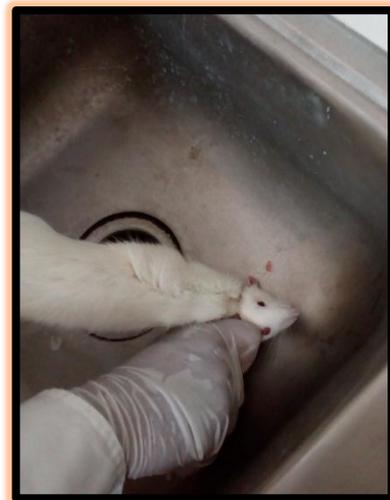


Fig. N°75: Realizado el sacrificio de las ratas



Fig. N°76: Cortando las patas de la rata

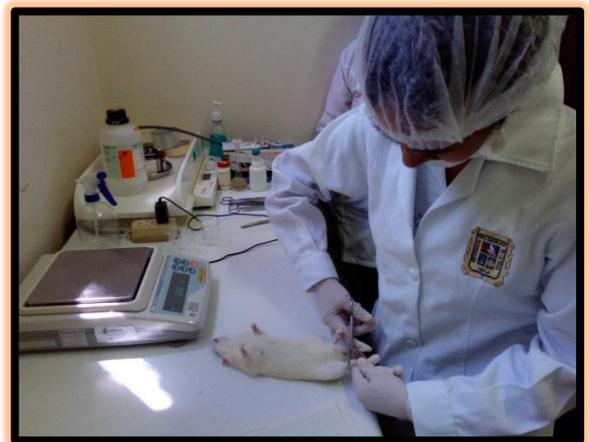


Fig. N°77: Cortando las patas de la rata



Fig. N°78: Cortando las patas de la rata



Fig. N°79: Cortando las patas de la rata



Fig. N°80: Realizando el pesado de las patas de ratas



Fig. N°81: Patas de las ratas cortadas para realizar la comparacion de pesos

Anexo N°22: Pesos de las patas de la rata.

Pesos de las patas de las ratas tratadas a la dosis de 1000 mg/Kg



Fig. N°82: 1000 mg/kg



Fig. N° 83: 173g



Fig. N°84: 186g

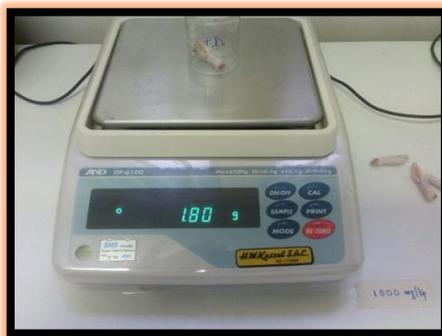


Fig. N°85: 180g



Fig. N°86: 190g



Fig. N°87:173g

Anexo N°23: Tratamiento con la dosis de 500 mg/Kg



Fig. N°88: 500mg/Kg



Fig. N°89: 190g



Fig. N°90: 86g



Fig. N°91: 188g



Fig. N°92: 198g



Fig. N°93: 192g

Anexo N°24: Pesos de las patas de las ratas tratadas a la dosis de 250 mg/Kg



Fig. N°94: 232g



Fig. N°95: 224g



Fig. N°96: 210g



Fig. N° 97: 201g

Anexo N°25: Tratamiento con la dosis de Naproxeno Sódico 40 mg/Kg



Fig. N°98: Control: Naproxeno Sódico 40mg/Kg



Fig. N°99: 176g



Fig. N°100: 177g



Fig. N°101: 172g



Fig. N°102: 173g



Fig. N°103: 175g

Anexo N°26: Animales de experimentación sin tratamiento (agua destilada)



Fig. N°104: Control



Fig. N°105: 235g



Fig. N°106: 233g



Fig. N°107: 228g



Fig. N°108: 239g



Fig. N°109: 230g

Anexo N°27: Análisis estadístico 1

ANÁLISIS DE VARIANZA DE UN FACTOR						
Control Negativo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg	Naproxeno sodico		
0.59	0.63	0.22	0.19	0.04		
0.76	0.73	0.2	0.18	0.07		
0.71	0.45	0.33	0.05	0.19		
0.61	0.52	0.33	0.15	0.11		
0.64	0.34	0.31	0.06	0.05		
0.662	0.534	0.278	0.126	0.092		
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Control Negativo	5	3.31	0.662	0.00507		
250 mg/Kg	5	2.67	0.534	0.02313		
500 mg/Kg	5	1.39	0.278	0.00397		
1000 mg/Kg	5	0.63	0.126	0.00443		
Naproxeno sodico	5	0.46	0.092	0.00372		
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.262256	4	0.315564	39.13244048	3.43802E-09	2.866081402
Dentro de los grupos	0.16128	20	0.008064			
Total	1.423536	24				

Figura N°110: Análisis estadístico1: ANOVA

Anexo N°28: Análisis estadístico

PRUEBA DE TUKEY	
HSD	0.17
Mul	4.23
Mse	0.008064
n	5

	Control Negativo	250 mg/Kg	500 mg/Kg	1000 mg/Kg	Naproxeno sodico
Control Negativo		0.128	0.384	0.536	0.57
250 mg/Kg			0.256	0.408	0.442
500 mg/Kg				0.152	0.186
1000 mg/Kg					0.034
Naproxeno sodico					

Valores mayores al HSD, son los que hacen la diferencia, los grupos comparados con el control negativo presentan actividad exceptuando la dosis de 250 mg/Kg, con respecto al control negativo.

Figura N°111: Análisis estadístico 2: Prueba de Tukey