



Maestría en

| POSGRADOS |

PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NATURALES

RPC-SO-09-NO.174-2020

Opción de Titulación:
Tesis

Tema:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTINFLAMATORIA DE UN UNGÜENTO
HECHO A BASE DE ACEITES ESENCIALES
DE *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav)
Per. (CHILCA) Y *Cannabis sativa* L.
(CAÑAMO).

Autor(es)

Tatiana Paola Idrobo Bermeo
Mary Mishell Pintag Fuertes

Director:

Paco Fernando Noriega Rivera

QUITO – Ecuador
2022

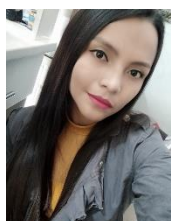
Autores:



Tatiana Paola Idrobo Bermeo
Bioquímica Farmacéutica

Candidata a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

tatuz16@hotmail.com



Mary Mishell Pintag Fuertes

Bioquímica Farmacéutica

Candidata a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

mishell_0792@hotmail.com

Dirigido por:



Paco Fernando Noriega Rivera
Doctor en Ciencias Farmacéuticas

pnoriega@ups.edu.ec

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS

2022 © Universidad Politécnica Salesiana.

QUITO– ECUADOR – SUDAMÉRICA

Tatiana Paola Idrobo Bermeo – Mary Mishell Pintag Fuertes

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINFLAMATORIA DE UN UNGÜENTO HECHO A BASE DE ACEITES ESENCIALES DE *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav) Per. (CHILCA) Y *Cannabis sativa* L. (CAÑAMO)."

Dedicatoria

“El éxito no es un accidente, es trabajo duro, perseverancia, aprendizaje, estudio, sacrificio y sobre todo, amar lo que estás haciendo”. Pelé

A Dios, que, con su amor y misericordia, nos ha brindado la fuerza para alcanzar un peldaño más en nuestra formación académica y profesional.

Tatiana & Mishell

A Melissa, hija mía tu presencia marco en mi vida el amor, no olvides que grandes cosas se logran con el suficiente esfuerzo y confianza en ti misma.

Tatiana

A Jahir y Jaidy, mis amados hijos, por su amor e inspiración a seguir adelante y, con este trabajo, motivarles a cumplir sus sueños.

Mishell

Reconocimiento

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos a la Universidad Politécnica Salesiana, en especial a nuestro querido tutor Ing. Paco Noriega PhD., quien con su orientación, enseñanza, conocimientos y colaboración, permitió el desarrollo de éste trabajo.

Al Quim. Christian Larenas PhD. por su valioso aporte y conocimientos brindados en el análisis estadístico.

Al BqF. Diego Vinueza Msc. por su acertada orientación durante el proceso de investigación.

Al BqF. Benjamín Román, compañero y amigo, por el tiempo dedicado, paciencia y cooperación en el desarrollo del trabajo experimental in-vivo.

Tabla de contenido

Contenido

Resumen.....	8
Abstract.....	9
1. Introducción.....	10
2. Determinación del Problema	12
3. Marco teórico referencial.....	14
3.1. Introducción de las especies.....	14
3.1.1. Información taxonómica.....	14
3.1.2. Información ecológica.....	16
3.1.3. Descripción botánica de las especies.....	19
3.2. Usos tradicionales de las especies.....	20
3.3. Actividad biológica de las especies	21
3.4. Metabolitos secundarios de las especies.	26
3.5. Aceites esenciales de las especies.....	28
3.5.1. Aceite esencial de chilca.....	29
3.5.2. Aceite esencial de cannabis.....	30
3.6. Productos naturales con actividad antiinflamatoria.....	31
3.7. Ensayos de la actividad antiinflamatoria	33
3.7.1. Actividad in vitro.....	34
3.7.2. Actividad in vivo.....	35
4. Materiales y metodología.....	38
4.1. Evaluación de la composición química	38
4.1.1. Evaluación de la composición química de <i>Bacharis latifolia</i>	38
4.1.2. Evaluación de la composición química de <i>Cannabis sativa</i>	39
4.2. Elaboración de fórmula tópica	39
4.3. Análisis in vivo	41
4.4. Análisis estadístico	42
5. Resultados y discusión.....	44
5.1. Composición química de los aceites esenciales.....	44
5.1.1. Composición química de <i>Cannabis sativa</i>	44
5.1.2. Composición química de <i>Bacharis latifolia</i>	46

5.2.	Formula tónica	47
5.3.	Análisis in vivo	48
5.3.1.	Formulación 1.....	48
5.3.2.	Formulación 2	49
5.3.3.	Formulación 3	49
5.3.4.	Formulación 4	49
5.3.5.	Formulación 5	49
5.3.6.	Formulación 6	50
5.3.7.	Formulación 7	50
5.4.	Análisis estadístico	50
5.4.1.	Test de Normalidad	50
5.4.2.	Test de homogeneidad	50
5.4.3.	Test de Ancova	51
5.4.4.	Test de Anova	51
5.4.5.	Regresión lineal.....	51
6.	Conclusiones	53
	Referencias	55
	Anexos.....	60
	CG/MS del aceite esencial de cannabis	60
	CG/MS del aceite esencial de chilca	61
	Procedimiento de evaluación de inflamación in vivo	62
	Test de normalidad	63
	Test de homogeneidad.....	63
	Test de Anova tiempo 1	63
	Test de Anova tiempo 2	64
	Test de Anova tiempo 3	65
	Test de Anova comparación múltiple tiempo 1.....	66
	Test de Anova comparación múltiple tiempo 2.....	67
	Test de Anova comparación múltiple tiempo 3.....	68
	Regresión lineal tiempo 1.....	69
	Regresión lineal tiempo 2.....	69
	Regresión lineal tiempo 3.....	70

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTINFLAMATORIA DE UN UNGÜENTO
HECHO A BASE DE ACEITES ESENCIALES DE
Baccharis latifolia (Ruiz & Pav)
Per. (CHILCA) Y *Cannabis sativa* L. (CAÑAMO).

Autor(es):

Tatiana Paola Idrobo Bermeo

Mary Mishell Pintag Fuertes

Resumen

Dos productos naturales, aceites esenciales de *C. sativa* (cannabis) y *B. latifolia* (chilca), fueron empleados como ingredientes antiinflamatorios en un ungüento de aplicación tópica. Para medir la eficacia, las diversas fórmulas diseñadas a base de estos dos aceites esenciales fueron evaluadas *in-vivo*, mediante el método de inducción del edema plantar en ratas; como control positivo se empleó una formulación de venta libre con ingrediente activo diclofenaco al 1%. La evaluación química de los dos aceites presentó para el aceite de chilca los siguientes componentes principales: ligulóxido 14.02%, andro enecalinalol 9.84%, kesano 7.53%, limoneno 5.6% y Z-cadin-4-en-7-ol con el 5.03%; mientras que en el aceite esencial de cannabis las moléculas más abundantes fueron: E-cariofileno 27.91%, mirceno 21,19%, α -pineno 8.05%, α -humuleno 8.03%, limoneno 7.18%, terpinoleno 7.12% y β -pineno 4.68%. Los resultados de la investigación señalan que aquellas fórmulas con mezclas de los dos aceites esenciales en la formulación al 1%, son las que poseen la mayor actividad antiinflamatoria, desde el punto de vista estadístico la significancia es alta en relación al control positivo en aquellas cuya composición de aceites es la siguiente: aceite esencial de cannabis 75% y aceite de chilca 25%, y aceite esencial de cannabis 50% y aceite de chilca 50%. El resto de las formulaciones presentan actividad, pero esta es similar a la de la fórmula comercial usada como control. De los resultados encontrados se puede proponer a ambos productos naturales como antiinflamatorios, y prever el diseño y comercialización de medicamentos farmacéuticos tópicos usando a estos dos aceites esenciales.

Palabras Clave: *Cannabis sativa*, *Baccharis latifolia*, Aceites esenciales, Actividad antiinflamatoria, sinergia antiinflamatoria.

Abstract

There were two natural products, essential oils of *C. sativa* (cannabis) and *B. latifolia* (chilca), were applied with anti-inflammatory ingredients in an ointment of topical application. To measure the efficacy, the various formulas designed based on these two essential oils were evaluated *in-vivo*, using the method of inducing plantar edema in rats, as a positive control an over-the-counter formulation with the active ingredient diclofenac at 1% was used. The chemical evaluation of the two oils presented the following main components for chilca oil: liguloxide 14.02%, androencecalinol 9.84%, sesquiterpene 7.53%, limonene 5.6%, and Z-cadin-4-en-7-ol with 5.03%. ; while in cannabis essential oil the most abundant molecules were: E-caryophyllene 27.91%, myrcene 21.19%, α -pinene 8.05%, α -humulene 8.03%, limonene 7.18%, terpinolene 7.12% and β -pinene 4.68 %. The results of the investigation indicate that those formulas with mixtures of the two essential oils in the formulation at 1% are those that have the greatest anti-inflammatory activity, from the statistical point of view the significance is high concerning the positive control in those whose Oil composition is as follows: 75% cannabis essential oil and 25% chilca oil, and 50% cannabis essential oil and 50% chilca oil. The rest of the formulations show activity, but this is similar to that of the commercial formula used as a control. From the results found, both natural products can be proposed as anti-inflammatories, and the design and commercialization of topical pharmaceutical drugs using these two essential oils can be foreseen.

Key words: *Cannabis sativa*, *Baccharis latifolia*, essential oils, anti-inflammatory activity, anti-inflammatory synergy.

1. Introducción

La chilca es una planta arbustiva de los Andes de Sudamérica, que se utiliza comúnmente en cataplasmas para aliviar inflamaciones externas, fracturas, dislocaciones y dolores reumáticos, este uso tradicional coincide en reportes de varios países, como: Colombia, Ecuador, Perú y Norte Argentino (Salcedo, 2011). En nuestro país, diferentes etnias utilizan la chilca con fines medicinales ancestrales. En la provincia de Pichincha, por ejemplo, los mestizos utilizan las hojas asadas para curar y aliviar las torceduras y dislocaciones de huesos. Los Kichwa de la Sierra-Loja utilizan el extracto de la planta para tratar heridas con inflamación; además, para las dolencias e inflamaciones de los órganos sexuales femeninos internos. (Guerra, 2016)

De los pocos estudios realizados sobre *B. latifolia* se encuentra reportado principalmente compuestos terpénicos y/o esteroidales, se han aislado cuatro compuestos: uno derivado de timol y tres sesquiterpenos (germacreno D), escualeno y un sesquiterpeno sustituido altamente oxigenado, y de la parte aérea se aislaron siete compuestos, entre los que se cuentan diterpenos de núcleo labdano y sesquiterpenos de núcleo germacreno. (Prada. 2016)

En un estudio realizado en la universidad de San Marcos en Perú ya se estableció la posible creación de un fármaco antiinflamatorio a base de chilca con el diseño de una formulación de aplicación tópica para esto se hizo un estudio del extracto primario de chilca con ratones, midiendo el volumen de la inflamación ocasionada después de administrado el extracto tópicamente. Luego se realizó de nuevo el análisis con la forma farmacéutica final obteniéndose resultados positivos. (Hoyos, 2008). Esto se confirma con el estudio realizado en Bolivia, donde en la formulación final de la crema se analizó por cromatografía la presencia de compuestos activos de la planta indicando que si es factible que la forma tópica tenga actividad biológica positiva. (Suxo, 2014).

La alusión más antigua de las propiedades terapéuticas del cannabis se remonta al 3700 a.C., empleada en la antigua China para el tratamiento de los dolores reumáticos.

El aceite esencial de marihuana o cannabis es el producto más utilizado con fines medicinales, se obtiene de las flores (cogollos) de la planta. El aceite se extrae fácilmente a través de una destilación por arrastre de vapor, se han identificado alrededor de 120 terpenos, siendo los principales alfa pineno, beta mirceno, beta cariofileno, terpinoleno y limoneno. El rendimiento de ésta depende de cada especie y variedad; se pueden obtener alrededor de 1.3 litros de aceite esencial por tonelada métrica de material vegetal recién cosechado. (Ángeles, 2014)

El presente estudio pretende comprobar esta actividad antiinflamatoria combinada usando la chilca, una planta nativa de la Provincia de Chimborazo, y cannabis.

2. Determinación del Problema

Según el boletín técnico de 2019 de registro estadístico de camas y egresos hospitalarios de Ecuador, las principales causas por la atención hospitalaria son las afecciones digestivas, seguido por los traumatismos de toda índole, estos representan un gran consumo de AINES por el dolor y la inflamación producidos, estas dolencias se evidencian más en la región sierra, que por sus climas fríos, la probabilidad de padecer dolor muscular o de articulaciones es alta y más si tomamos en cuenta la edad y las patologías existentes. (INEC, 2019), una de las principales causas para que el proceso curativo de una enfermedad o accidente sea más lento son los episodios inflamación de la zona afectada.

La respuesta inflamatoria saludable es benéfica temporalmente, pero tiene un equilibrio efímero que puede alterarse y causar daño involuntario al tejido con una posterior inflamación anormal o crónica. Este desequilibrio genera un estado “pro inflamatorio” descontrolado y capaz de provocar enfermedades consecuencia del estrés oxidativo, que a su vez no es más que el resultado del daño originado por las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), lo cual tiene como base de generación a la inflamación. (Chilquillo & Cervantes, 2017). Entre los daños por el consumo frecuente e indiscriminado de AINES en aplicación tópica están: daños o afecciones dermatológicas, siendo el principal eritema multiforme, angioedemas, fotosensibilidad y urticaria. Otros de los efectos negativos de los AINEs están los gastrointestinales provocando ulceración.

Desde hace años países con escasos recursos económicos, han decidido retomar y desarrollar el uso de las plantas medicinales para fines terapéuticos en lo que se ha llamado la Revolución Verde de la Medicina, siendo este la razón principal para el desarrollo de nuevos fitofármacos, y más aún si se trata de plantas nativas, generando su producción e incentivando su uso.

El uso de cannabis medicinal ha tenido una incrementada aceptación, se estima que entre el 45% de las personas que buscan el cannabis medicinal lo hacen para manejo del dolor, y el 39% de los pacientes en tratamiento con opioides a largo

plazo también reciben cannabis. Los compuestos en el aceite esencial son en su mayoría terpenos, compuestos con actividad antiinflamatoria comprobada, entre las aplicaciones están el alivio del dolor y del estrés. La acción de los compuestos del cannabis necesita de compuestos afines a la función para potenciar su efecto, en el caso de la actividad analgésica y antiinflamatoria los flavonoides y terpenos combinan bien, estos compuestos están presentes ya con actividad comprobada en la chilca, una planta nativa

ecuatoriana lo que hace que el uso combinado de activos de las plantas pueda incrementar la actividad antiinflamatoria.

3. Marco teórico referencial

3.1. Introducción de las especies.

3.1.1. Información taxonómica

Baccharis latifolia (Ruiz & Pav) Pers.

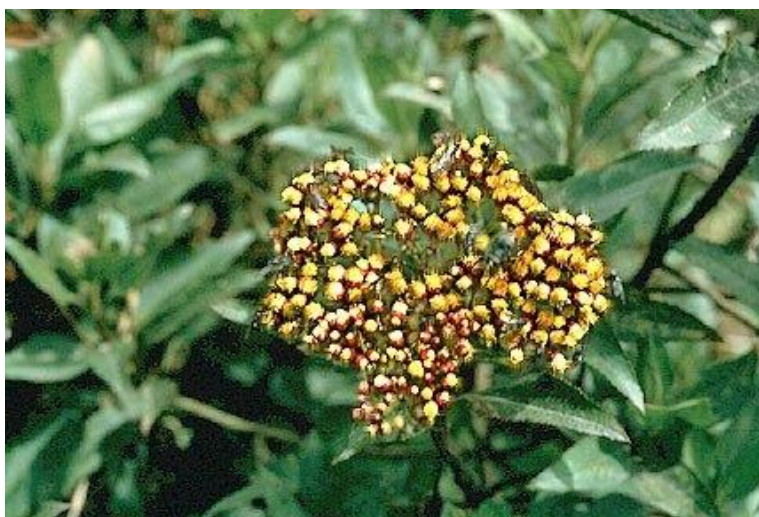


Figura 3-1: *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav) Pers.

Fuente: (Persoon, Christiaan Hendrik, 1807)

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Asteranae Takht.

Orden: Asterales Link

Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presi

Género: *Baccharis* L.

Sinonimia: *Baccharis floribunda* Kunth, *Baccharis polyantha* Kunth, *Baccharis polyantha* fo. *genuina* Hieron., *Baccharis polyantha* var. *macrophylla* Hieron., *Baccharis riparia* Kunth, *Molina latifolia* Ruiz & Pav., *Pinagrea latifolia* (Ruiz & Pav.) F.H. Hellw., *Pluchea glabra* Griseb., *Vernonia latifolia* Gilli

(Persoon, Christiaan Hendrik, 1807)

Nombre común: Chilca (Salcedo. L, 2011)

Cannabis sativa L.



Figura 3-2: *Cannabis sativa* L.

Fuente: (Linnaeus, Carl von, 1753)

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht.

Orden: Rosales Bercht. & J. Presl

Familia: Cannabaceae Martinov

Género: *Cannabis* L.

Sinonimia: *Cannabis chinensis* Delile, *Cannabis indica* Lam., *Cannabis sativa* var. *indica* (Lam.) E. Small & Cronquist

Nombre común: Marihuana

(Linnaeus, Carl von, 1753)

Cannabis sativa L.

Origen: Originaria de Asia Central (Himalaya). (Renobales G. & Sallé J., 2001)

Distribución: Ampliamente distribuida en zonas templadas y subtropicales del mundo. (Ángeles López et al., 2014).

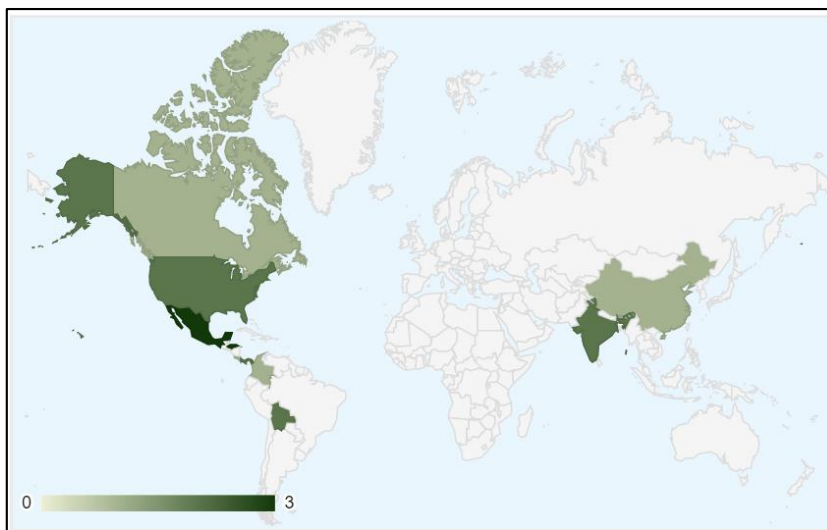


Figura 3-5: Ocurrencia de distribución por país *Cannabis sativa* L.
Fuente: (Tropicos / Name - *Cannabis sativa*, s. f.)

3.1.2.2 HÁBITAT

Baccharis latifolia (Ruiz & Pav) Pers.

Hábitat: Subpáramo. Forma parte de la vegetación del límite del bosque.

Regiones naturales: Matorral Seco de la Costa, Matorral Interandino, Bosque Piemontano Oriental, Bosque Piemontano Occidental, Páramo, Bosque Montano Oriental, Bosque Montano Occidental, Bosque Deciduo de la Costa, Bosque Húmedo Tropical del Chocó. (Romoleroux, K. et al., 2019)

Cannabis sativa L.

Hábitat: Ruderal esporádica y en general variedad de hábitats y altitudes que van desde el nivel del mar hasta las estribaciones montañosas el Himalaya. (ElSohly et al., 2017)

3.1.2.3 CONDICIONES

Baccharis latifolia (Ruiz & Pav) Pers.

Suelos: Generalmente suelos pesados, que posean drenaje lento a nulo, suelos superficiales y degradados con mucha roca expuesta.

Clima: En zonas con heladas eventuales, en un rango de temperatura anual entre 7-19°C y con clima húmedo y subhúmedo, subpáramos secundarios y pantanos de subpáramos primarios respectivamente. Heliófila estricta (prefiere estar bajo el sol), puede permanecer en sombreado muy ligero en matorrales y rastrojos abiertos.

Agua: Sus requerimientos hídricos son moderados, sin embargo, no soporta sequías prolongadas.

Altitud: 2800-3700 m.s.n.m. (Villarpando et al., 2011)

Cannabis sativa L.

Suelo: Suelos con buena humedad, bien drenados y con adecuada cantidad de nutrientes, pH entre 5,0 a 7,5. Presenta buen crecimiento en suelos de estructura franco limosa, franco arcillosa o arcillo limosa enriquecidos con nitrógeno, potasio y fósforo.

Clima: Templado, con un rango de temperatura entre 5,6 a 27,5 °C. Necesita suficiente luz solar durante sus fases de crecimiento, primaria y secundaria, mientras que para su tercera fase (floración) requiere menos horas de luz, por tratarse de una planta de día corto.

Agua: Requiere grandes cantidades de agua, volúmenes entre 250 a 400 mm por ciclo de cultivo incluyendo la humedad disponible del suelo. (Fassio et al., 2013)

3.1.3. Descripción botánica de las especies

Baccharis latifolia (Ruiz & Pav) Pers.

Es un arbusto terrestre, su altura varía de 0,5 a 4 m, sus tallos son jóvenes y angulosos, de una coloración verde a rojiza. Presenta hojas simples, alternas, espiraladas con limbo ovado a lanceolado, de base cuneada o redondeada y ápice agudo, margen finamente dentada, trivenada casi desde la base, con tricomas multicelulares en ambas caras de la lámina. Pecíolo de 0,5-4,5 cm de largo. Posee capitulescencias terminales, capítulos homógamos de flores unisexuadas; capítulos masculinos con 14-45 flores y capítulos femeninos con 100-280 flores; flores de la corolla blanquecina, fusionada. Presenta frutos en aquenios de 0,8-1,3 mm de largo, café claro y comprimidos lateralmente. (Herbario Nacional Colombiano, 2004)

Cannabis sativa L.

Es una planta herbácea anual que llega a medir hasta 4 m de alto, tiene tallo erecto, es dioica, sus hojas son palmadas y estipuladas, las superiores alternas y las inferiores opuestas. Cada hoja tiene entre 3 a 9 foliolos angostos, con márgenes serrados, de ápice agudo y tricomas glandulares recostados sobre el haz y el envés de un color más claro. Las hojas se encuentran sobre peciolo de 7 cm de largo. Los tricomas glandulares producen una resina que sirve de protección a la planta contra las agresiones externas. Presenta inflorescencias al terminar las ramas, específicamente en las axilas de las hojas superiores; las inflorescencias femeninas son densas, pero con pocas flores, de 5 a 8, mientras que las masculinas son ramificadas, laxas y con muchas flores, éstas son pediceladas, con perianto de 5 tépalos y las flores femeninas son sésiles, con perianto entero, membranáceo y pegado al ovario, el cual, posee un óvulo y 2 estigmas. Su fruto es un aquenio, con una sola semilla, ovoide, algo comprimida, blanco o verdoso teñido de púrpura, encerrado en el perianto. (López et al., 2014)

3.2. Usos tradicionales de las especies

Baccharis latifolia (Ruiz & Pav) Pers.

Tradicionalmente se emplean las ramas, florecidas o no, en infusión como antiinflamatoria, antitumoral, antineurótica, antidisentérica y para tratar patologías del hígado, mientras que el soasado (se someten hojas, frutas o vegetales a fuego lento, para luego colocar en el área afectada. Puede colocarse directamente a la llama o en soportes de barro o piedra (Mosquera, 2022) de las ramas para curar las fracturas y como antirreumático. Las hojas se utilizan en emplastos como analgésico, antiinflamatorio (cabeza, ojos) (Herrera et al., 2017), mientras que en cocción se usan para tratar hemorroides, reumatismos, golpes, torceduras y en la desinfección de heridas, además la corteza se emplea para desinflamar hinchazones, limpiar el mal aire y curar el espanto. La planta posee ácido resínico con propiedades repulsivas gran emulsionante del caucho La madera se emplea como leña y en la construcción (Herrera et al., 2017)

Cannabis sativa L.

Es utilizada para producir fibras y confeccionar productos textiles. Se usa en la medicina tradicional desde hace 2700 a.C. Se le atribuyen propiedades analgésicas, relajantes musculares, hipnóticas, antidepresivas, antiinflamatorias, inmunosupresoras, ansiolíticas, broncodilatadoras, entre otras, por sus efectos psicotrópicos, es una de las plantas más antiguas usadas con este fin. En la época de la independencia en México se usó con propósitos rituales mágico-religiosos, para diagnosticar enfermedades, así como para su curación y prevención. El principal uso medicinal es el tratamiento del reumatismo, en el que se usa un preparado con las hojas secas de la planta maceradas en alcohol etílico con ajo y hojas de tabaco, el que se debe aplicar mediante fricciones en la parte afectada. (López et al., 2014)

Ensayos clínicos no controlados presentan utilidad en el tratamiento de la epilepsia, hipointratable, depression, enfermedad bipolar, estados de ansiedad, dependencia de opioides y alcohol, alergias, enfermedad de Alzheimer y procesos inflamatorios. (Rodríguez Carranza, 2012)

3.3. Actividad biológica de las especies

Baccharis latifolia (Ruiz & Pav) Pers.

Actividad Antiinflamatoria

Muestra actividad antiinflamatoria tanto in vitro como in vivo, usualmente en la forma de infusión o cataplasma tal como lo describe el Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales. (Pinzón et al., 2008)

Extractos de diclorometano muestran actividad antiinflamatoria, en el modelo de inhibición del edema de oreja de ratón, a dosis de 300 mg/kg. De la misma manera este extracto, así como el extracto en hexano muestran actividad inhibitoria sobre la COX-1 con porcentajes superiores a los presentados por la indometacina (100%) usada como fármaco de referencia, con efecto significativo sobre la liberación de LTC₄. El efecto inhibitorio sobre la COX-2 fue evidente con el extracto en hexano, diclorometano y acuoso en 98,8, 100 y 98,1% respectivamente. (Castañeda, L.G. et al., 2015)

Actividad Antioxidante

El extracto metanólico de las hojas inhibe la producción de especies reactivas de oxígeno en un 55% en la producción de neutrófilos humanos estimulados con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). (Castañeda, L.G. et al., 2015)

El extracto etanólico de las flores a una concentración de 60 mg/mL produce mayor capacidad de secuestrar moléculas de H₂O₂ en un 47.25% con respecto a los tallos y hojas. (Bayas Morejón et al., 2020)

Actividad Antibacteriana

Extractos etanólicos, con una concentración de 50 mg/mL, muestran actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* con un porcentaje de inhibición de 47,83% y con un halo de inhibición de 20 mm de diámetro, esto debido a su alta concentración de flavonoides. (Calle et al., 2017)

Los aceites esenciales obtenidos de *B. latifolia* han mostrado una interesante actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que los extractos etanólicos de las hojas y flores presentan actividad contra el género *Listeria* y *Salmonella* con zonas de inhibición > 15 mm y >20 mm respectivamente, mediante el método de difusión de disco. (Sequeda Castañeda, L.G. et al., 2015) (Bayas Morejón et al., 2020)

Actividad antifúngica

El aceite esencial muestra una buena actividad contra los hongos *Trichophytum rubrum* y *Trichophytum mentagrophytes* con una concentración inhibitoria mínima de 31.25 y 62.5 µg/mL respectivamente y moderada actividad contra *Aspergillus umigatus* (MIC=157,4 Mg/mL). (Sequeda Castañeda, L.G. et al., 2015)

Extractos acuosos y fenólicos presentan actividad inhibitoria frente a la cepa *Candida albicans* mediante microensayos de Microdilución y el Método de Susceptibilidad por Difusión Bauer-Kirby impregnado con Extracto sobre Agar, en donde se toman en cuenta halos iguales o por encima de 30% de inhibición, mostrando el extracto acuoso un halo de 37% y el extracto fenólico de 35%, lo que indica presencia de actividad antifúngica. (Martínez et al., 2011)

Actividad Anticancerígena

El extracto etanólico muestra importante actividad antiproliferativa contra líneas celulares de Hep3B, HepG2, PLC PFR 5, SNU-182 en una prueba primaria de hepatocitos humanos con un IC₅₀ de 10.8 ± 4.6, 33.3 ± 3.4, 24.3 ± 24.3, 20.1 ± 2.2 mg/mL, respectivamente. El extracto acetónico en una concentración de 200 mg/mL posee un porcentaje de inhibición de 82 ± 3 % y 89 ± 2 % contra líneas celulares cancerosas de la piel y lengua. (Sequeda Castañeda, L.G. et al., 2015)

Cannabis sativa L.

Actividad Analgésica

El efecto de alivio del dolor es gracias a que los derivados del cannabis pueden bloquear o inhibir la transmisión del impulso nervioso en diferentes niveles, esto

debido a la activación de receptores CB1 a nivel del cerebro, neuronas sensoriales periféricas y médula espinal. Por otro lado, los receptores CB2 periféricos estarían implicados en el control del dolor inflamatorio.

Los receptores cannabinoides están acoplados a proteínas G inhibitoras, las cuales inhiben la activación de la adenilatociclasa y la entrada de calcio al interior celular favoreciendo la salida de potasio. El resultado es la disminución de la excitabilidad de la membrana y la actividad neuronal y de esta manera se reduce de la liberación de neurotransmisores.

Cannabis y sus derivados son capaces de controlar el dolor crónico derivado de procesos cancerosos y del dolor neuropático, en este caso varios estudios han sugerido un efecto sinérgico cuando los cannabinoides se combinan con opioides, al parecer, existe una interacción farmacocinética.

Se ha mostrado que cannabis y sus derivados son altamente efectivos en el dolor neuropático debido a que actuarían inhibiendo o liberando una serie de moduladores desde las neuronas y/o tejidos no neuronales, así su efecto analgésico sería más rápido e intenso en tejidos lesionados o inflamados, donde dichos moduladores, sustancias proinflamatorias y proanalgésicas, se encontrarían en cantidades mucho mayores, haciendo que la transmisión del estímulo doloroso sea directamente dependiente a su liberación. (Avello L et al., 2017)

Actividad antiemética

El efecto antiemético es útil, como una opción terapéutica, en pacientes con náuseas y vómitos producidos por los tratamientos con quimioterapia, el mecanismo exacto se desconoce, sin embargo, se han propuesto algunos basados en la acción sobre los receptores cannabinoides y otros no. Se ha observado que los cannabinoides pueden inhibir el vómito gracias a su unión con los receptores CB1 del núcleo del tracto solitario en estudios de experimentación animal. Por otro lado, se han aislado receptores CB1 en el intestino delgado lo que indicaría un mecanismo antiemético periférico. En otras publicaciones se redacta que los agonistas cannabinoides pueden inhibir la activación del receptor 5-HT3 en neuronas ganglionares de la rata. Estos estudios sugieren que, aparte del mecanismo mediado por los receptores, la

inhibición de la transmisión serotoninérgica contribuiría al efecto antiemético de los cannabinoides. (Durán, 2005)

Estimulante del apetito

Se emplea en pacientes con síndrome de desgaste asociado al SIDA. Existe un aumento del consumo calórico gracias a la activación de los receptores CB1 en el núcleo hipotalámico, esta activación del sistema mesolímbico aumenta el deseo hacia los alimentos. Estos receptores han sido encontrados también en el tejido adiposo periférico y su activación estimula la lipogénesis, lo que indica que su consumo mejora el apetito y ofrece ganancia de peso. (Rodríguez-Venegas et al., 2020)

Actividad Antiinflamatoria

Ensayo en modelos de animales han mostrado que el CBD es prometedor en el tratamiento de las enfermedades del tracto gastrointestinal como la colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn y en la artritis reumatoide. (Rodríguez-Venegas et al., 2020)

Los cannabinoides protegen la mucosa gástrica mediante la inhibición de la función motora gástrica, del mismo modo, los agonistas de cannabinoides inhiben el tránsito gastrointestinal. Éstos también suprimen la producción de una variedad de citoquinas pro-inflamatorias en cultivos de células humanas y modelos animales, efecto que se cree que es mediado por los receptores CB2. (Suero-García et al., 2015)

Actividad Anticancerígena

El mecanismo de acción antitumoral se basa en la capacidad que posee el Δ^9 -THC y CBD para promover la muerte apoptótica de las células cancerosas, inhibir la angiogénesis del tumor y reducir la migración de células cancerosas. La apoptosis inducida se produce gracias al aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno. A través de los receptores CB2, los cannabinoides pueden inhibir la producción de factor de necrosis tumoral (TNF)- α , e interleucinas por las microglías y los macrófagos. (Suero-García et al., 2015)

Actividad Inmunomoduladora

El cannabinoide CBN parece participar en la modulación del sistema inmune, actuando sobre el receptor CB2 en esplenocitos y timocitos, mediante la inhibición de la adenilato ciclasa, se reduce la actividad de la proteína quinasa A y de los factores de transcripción ligados al AMPc. De esta manera se produce una disminución, a nivel genético, de la transcripción del gen para la IL-2, que es la proteína participante en la regulación de la actividad del sistema inmune. La disminución de su liberación explicaría la capacidad de inmunomodulación de los cannabinoides.

El CBD suprime la producción de anticuerpos en cultivos celulares de bazo de ratón, en presencia de macrófagos activados y células T. Se ha visto que, en algunas líneas celulares del sistema inmune, el CBD inhibe la producción de diversas citoquinas (IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ). Estos resultados indican sus posibles efectos beneficiosos en enfermedades inflamatorias/autoinmunes. (Ramos Atance & Fernández Ruiz, 2000)

Actividad psicótica

El THC es principal componente psicoactivo, el cual actúa en receptores específicos del encéfalo. Estos receptores también responden a cannabinoides naturales, cannabinoides endógenos, como la anandamida. Los endocannabinoides regulan la acción de los neurotransmisores en la cognición, emoción y la memoria. Los receptores CB1 desempeñan una función clave en los efectos psicoactivos del cannabis.

Las vías dopaminérgicas del sistema de recompensa del cerebro contienen tanto receptores CB1 como CB2, estudios realizados indican que éstos receptores responden al THC aumentando la liberación de dopamina, lo que probablemente explica los efectos euforizantes del cannabis. (World Health Organization, 2016)

Otros

Ensayos clínicos controlados sustentan efectos benéficos en espasticidad por lesión de la médula espinal o por esclerosis múltiple, dolor crónico, en especial de tipo

neuropático, trastornos de movimiento como el síndrome de Gilles de la Tourette, distonía, asma y glaucoma en donde además de reducir la producción del humor acuoso, brinda protección al nervio óptico por diversos mecanismos. (Rodríguez Carranza, 2012)

3.4. Metabolitos secundarios de las especies.

Baccharis latifolia (Ruiz & Pav) Pers.

En la especie se han reportado principalmente compuestos terpénicos y/o esteroidales como α -felandreno, canfeno (40) y óxido de cariofileno (41). De extracciones de la parte aérea se han aislado siete compuestos, entre los que se encuentran sesquiterpenos de núcleo germacreno y diterpenos de núcleo labdano; de la raíz se han aislado cuatro compuestos: uno derivado de timol (44) y tres sesquiterpenos (germacreno D (45), escualeno (46) y un sesquiterpeno sustituido altamente oxigenado(47)).(Prada et al., 2016)

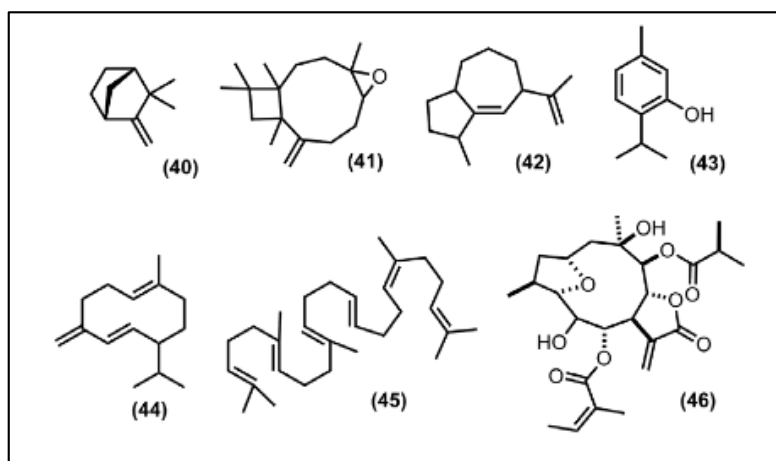


Figura 3-6: Estructuras de algunos compuestos aislados de *B. latifolia*

Fuente: (Prada et al., 2016)

Las hojas contienen resina, bacarina, trementina, taninos gálicos, quercetina, derivados de germacreno, diterpenos, eudesmaneno, limoneno, β -cubebeno, germacreno, δ -cadineno, epi- α -bisabolol, ledol, friedelin y dimetoxiflavona. El Handbook Colombiano de plantas medicinales reporta galotaninos, esteroides, aceite esencial, leucoantocianidina, cumarinas, compuestos fenólicos, alcaloides, y triterpenos como friedelin, flavonoides como quercetina y rutina, así como lactonas

sesquiterpénicas. Un estudio hecho en Ecuador identifica 29 componentes en donde los mayoritarios fueron: limoneno (33.72%), β -felandreno (10.32%), sabineno (10.28%), β -pineno (6.99%) y α -pineno (5.44%). (Valarezo, 2013)

Figura 3-7: Porcentaje de composición de la parte aérea de *Baccharis latifolia*

Compound	<i>B. latifolia</i> ^a	RI A ^b	RI ^{ref} A	RI P	RI ^{ref} P	Methods of identification ^c
α -Thujene	0.31 $\pm$ 0.07	937	930 ^d	1022	1029 ^e	MS,RI
α -Pinene	5.44 $\pm$ 0.36	942	939 ^d	1015	1032 ^f	MS,RI
Sabinene	10.28 $\pm$ 1.95	974	975 ^d	1154	1132 ^f	MS,RI
β -Pinene	6.99 $\pm$ 1.42	977	979 ^d	1118	1118 ^f	MS,RI
Myrcene	1.44 $\pm$ 0.39	988	990 ^d	1161	1174 ^f	MS,RI
Limonene	33.72 $\pm$ 2.41	1026	1029 ^d	1194	1203 ^f	MS,RI
β -Phellandrene	10.32 $\pm$ 1.54	1028	1029 ^d	1216	1218 ^f	MS,RI
(<i>E</i>)- β -Ocymene	0.28 $\pm$ 0.13	1043	1050 ^d	1252	1250 ^f	MS,RI
γ -Terpinene	0.27 $\pm$ 0.06	1054	1059 ^d	1238	1252 ^e	MS,RI
Terpinolene	0.23 $\pm$ 0.01	1080	1088 ^d	1290	1301 ^e	MS,RI
Linalool	tr	1097	1096 ^d	1546	1553 ^f	MS,RI
Terpinen-4-ol	0.32 $\pm$ 0.08	1176	1177 ^d	1602	1611 ^g	MS,RI
β -Elemene	0.54 $\pm$ 0.13	1382	1390 ^d	1586	1600 ^g	MS,RI
β -Caryophyllene	1.64 $\pm$ 0.46	1409	1419 ^d	1591	1594 ^g	MS,RI
α -Humelene	0.29 $\pm$ 0.07	1452	1454 ^d	1679	1687 ^g	MS,RI
(<i>E</i>)- β -Farnesene	0.43 $\pm$ 0.01	1456	1456 ^d	1673	1662 ^h	MS,RI
allo Aromadendrene	0.70 $\pm$ 0.13	1468	1460 ^d	1672	1661 ^g	MS,RI
γ -Curcumene	5.43 $\pm$ 1.02	1471	1482 ^d	1674	1689 ⁱ	MS,RI
α -Curcumene	1.81 $\pm$ 0.25	1474	1480 ^d	1753	1763 ⁱ	MS,RI
Germacrene D	0.71 $\pm$ 0.14	1476	1481 ^g	1694	1711 ^j	MS,RI
Bicyclogermacrene	0.41 $\pm$ 0.11	1495	1500 ^d	1767	1775 ^g	MS,RI
β -Bisabolene	0.27 $\pm$ 0.07	1501	1505 ^d	1726	1727 ^j	MS,RI
γ -Cadinene	1.31 $\pm$ 0.32	1505	1513 ^d	1769	1776 ^k	MS,RI
δ -Cadinene	0.61 $\pm$ 0.15	1509	1523 ^d	1764	1773 ^g	MS,RI
Unidentified	2.81 $\pm$ 0.75	1525	—	—	—	—
Caryophyllene oxide	0.45 $\pm$ 0.21	1577	1583 ^d	1994	2008 ^g	MS,RI
Cubenol	4.85 $\pm$ 1.12	1630	1646 ^d	2080	2080 ⁱ	MS,RI
τ -Cadinol	0.62 $\pm$ 0.07	1636	1640 ^d	2175	2187 ^g	MS,RI
Unidentified	2.36 $\pm$ 0.49	1654	—	—	—	—
α -Bisabolol	0.45 $\pm$ 0.28	1680	1685 ^d	2232	2219 ^k	MS,RI
Chromolaenin	0.79 $\pm$ 0.20	1721	1726 ^m	2358	2374 ^m	MS,RI
Unidentified	1.44 $\pm$ 0.80	1760	—	—	—	—
Monoterpene hydrocarbons	69.28					
Oxygenated monoterpenes	0.32					
Sesquiterpene hydrocarbons	14.94					
Oxygenated sesquiterpenes	6.37					
Total identified	90.91					

Fuente: (Valarezo et al., 2013)

Cannabis sativa L.

Se han identificado alrededor de 500 compuestos entre los que se encuentran terpenos, alcaloides, estilbenos, flavonoids, lignanamidas, amidas fenólicas y cannabinoides.

Se han identificado cerca de 120 terpenos siendo el óxido de cariofileno el principal compuesto aromático y volátil. Se encuentran, principalmente en las hojas, más de 20 flavonoides, que pueden estar en forma libre o conjugada con un glucósido. Se

han aislado e identificado al menos 10 alcaloides en las raíces, tallos, hojas, polen y/o semillas. Además de contener estilbenoides, lignamidas y amidas fenólicas.

Los metabolitos más abundantes son los cannabinoides y son exclusivos de ésta especie, se conocen aproximadamente 70, de los cuales el THC es el más estudiado, son importantes ya que son capaces de interactuar con todo un sistema de receptores endógenos. (Ángeles López et al., 2014)

Los cannabinoides muestran el típico esqueleto C₂₁ terpenofenólico, los cuales poseen derivados y productos de transformación que también son considerados como cannabinoides. Hasta la fecha se han aislado 120, los cuales se pueden clasificar en 11 tipos generales: : (-)- Δ^9 -trans-tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC), , (-)- Δ^8 -trans-tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), cannabigerol (CBG), cannabicromeno (CBC), cannabidiol (CBD), cannabinodiol (CBND), cannabielsoin (CBE), cannabicitrolol (CBL), cannabinol (CBN), cannabitriol (CBT) y tipos diversos.(Sohly et al., 2017)

3.5. Aceites esenciales de las especies.

Los aceites esenciales, también conocidas como esencias son el producto final del metabolismo, son sustancias volátiles y aromáticas compuestas de elementos orgánicos olorosos, de una textura espesa y color característico según la especie. Se obtiene por varios métodos, el más fácil mediante la destilación por arrastre de vapor.

Son sintetizadas por las plantas en pequeñas cantidades, su importancia radica en la función de repelentes de agentes agresivos para las plantas. La composición química depende de la especie y farmacológicamente son importantes por presentar metabolitos con acción biológica. (Quishpe. 2018)

Los aceites esenciales se extraen de las muestras vegetales frescas o secas mediante varios métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, fluidos supercríticos y enfleurage.

El método más fácil y común es la destilación por arrastre con vapor de agua, en la cual la muestra vegetal generalmente fresca se corta en trozos pequeños, se coloca en una cámara inerte y se somete a una corriente de vapor de agua sobrecalentada,

la esencia así es arrastrada, posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, que se usan en perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada. (Martínez,2003)

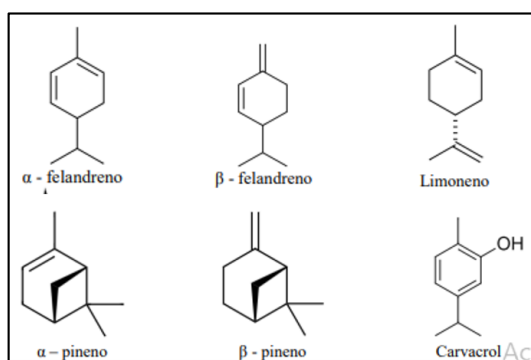
3.5.1. Aceite esencial de chilca

La composición del aceite esencial de chilca va a depender de la zona climática y de la etapa de maduración de la planta, el aceite está compuesto principalmente por:

MONOTERPENOS

Son los compuestos volátiles más pequeños de los terpenos, ayudan al proceso de floración y polinización de la planta, presentan actividades antibacteriales, antimicóticas y mejoran la calidad y variedad aromática.

En la parte aérea se identifican: α -pineno, β -pineno, carvacrol, limoneno, α -felandreno, β -felandreno. (Sandoval.2021)

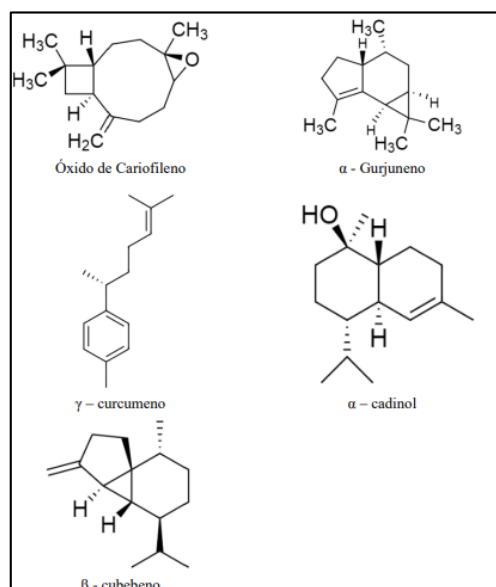


Monoterpenos identificados en chilca

Fuente: Sandoval. (2021)

SESQUITERPENOS

Son terpenoides con esqueleto de 15 carbonos, su función principal es la de repelentes contra insectos, pero también presentan actividad antibiótica, antifúngica y anticancerígena. Los sesquiterpenos presentes en el aceite esencial de chilca son: oxido de cariofileno, α -cadinol, α -gurjuneno, β -cubebeno y γ -curcumenol.



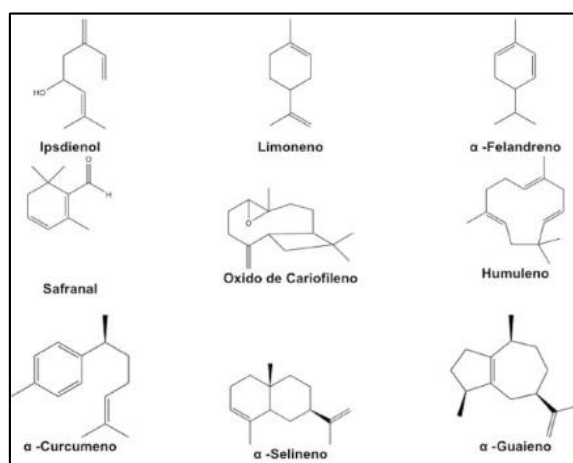
Sesquiterpenos presentes en *B. latifolia*
Fuente: (Sandoval, 2021)

3.5.2. Aceite esencial de cannabis

La composición del aceite esencial de cannabis depende de la especie, y del control de cultivo que se realice, aun así, se ha logrado identificar compuestos de base que poseen todos los aceites esenciales. El rendimiento del aceite esencial depende de la especie, calidad de las hojas, y etapa de floración, y se va obtener por destilación por arrastre de vapor. Se estima que se puede obtener 1,3 litros de aceite esencial por tonelada de planta recién cosechada. (Ángeles, 2014)

TERPENOS

Son metabolitos responsables del sabor de las diferentes variedades y determinan la preferencia entre usuarios. Presentan diferentes actividades y una sinergia positiva en combinación con los cannabinoides. Se ha determinado la presencia de 120 terpenos, entre los más representativos están: limoneno, mirceno, α-felandreno, safranal, humuleno, α-curcumeno, α-selineno y el compuesto más aromático y volátil, es el óxido de cariofileno, usado para la detección de narcóticos por los perros. (Ángeles, 2014)

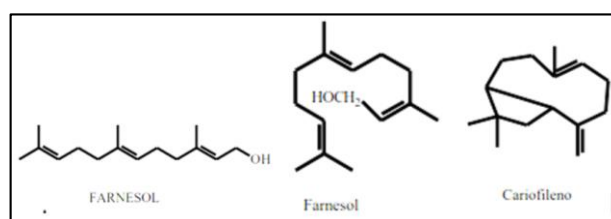


Terpenos encontrados en aceite esencial cannabis.

Fuente: (Ángeles, 2014)

SESQUITERPENOS

En la composición del aceite esencial del cáñamo, nombre denominado a la especie de plantas de cannabis con un bajo nivel de THC, se encuentran sesquiterpenos, entre los más característicos están: cariofileno, α-farneseno, β-farneseno y farnesol. (Martin, 2021)



Sesquiterpenos identificados en aceite esencial de cannabis

Fuente: Martínez, (2003)

3.6. Productos naturales con actividad antiinflamatoria

Entre los tratamientos antiinflamatorios se encuentra el uso de los extractos naturales, una de las formas más antiguas de tratamiento antiinflamatorio pero que hoy se usan muy frecuentemente. Según datos de la Organización Mundial de Salud, el 80 % de la población de los países en desarrollo se tratan con técnicas de medicina popular, y de ese total, 85 % usan extractos de plantas medicinales. (Regalado, A. 2015)

Para conocer el potencial terapéutico de las plantas, es importante determinar los constituyentes químicos que ellas poseen, especialmente sus metabolitos secundarios y en qué lugar de la planta se encuentran. La identificación de sus componentes mayoritarios y los resultados de su evaluación como agentes antiinflamatorios, indicaran los patrones por especies con actividad antiinflamatoria. (Baptista, 2016)

En la literatura se informa el empleo de muchos extractos obtenidos de plantas que tienen efecto antiinflamatorio. Se conoce la relación existente entre las especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno (que provocan estrés oxidativo) con las enfermedades inflamatorias, por lo que extractos de plantas que presentan sustancias como flavonoides, polifenoles y tocoferol con capacidad antioxidante, en muchas ocasiones a su vez presentan efecto antiinflamatorio. (Regalado, 2015).

El papel de los metabolitos secundarios en las plantas como antiinflamatorios esta evidenciado experimentalmente en varias plantas medicinales, tanto in vitro como in vivo, entre ellos se pueden mencionar las investigaciones desarrolladas con algunas plantas presentes en el país.

Los extractos de flores de Árnica montana (Asteraceae) indican presencia de quercetrina-3-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido y kaemferol-3-O-glucósido entre otros flavonoides, justificando el uso de esta planta como antiinflamatorio de uso externo en la formulación de tópicos. La Caléndula officinalis (Asteraceae) es otro ejemplo de planta medicinal usada como antiinflamatoria, cuyos extractos acuosos que contiene glicósidos de isoramnetina y quercetina, sustancias comprobadas de acción farmacológica. (Regalado, 2015)

Otra planta usada por siglos es el sauce blanco (*Salix alba*) ha sido usada especialmente su corteza durante siglos debido a sus propiedades antipiréticas, antiinflamatorias y analgésicas. En el mercado se encuentran varios grados de extractos, por ejemplo: al 15, 20, o 50% de salicina, compuesto con actividad comprobada de la cual se metaboliza el ácido acetilsalicílico. (Cherres, 2018). Otro ejemplo de esto es el extracto alcohólico del rizoma de jengibre, con actividad antiinflamatoria y antipirética similar al ácido acetyl salicílico, esta ha sido evidenciada en animales de laboratorio. Un estudio en China reportó que 113

pacientes con dolor reumático y lumbalgia crónica, a quienes se inyectó un extracto con 5–10% de jengibre en los puntos dolorosos, experimentaron alivio total o parcial del dolor, disminución de la inflamación articular y mejoría o recuperación de la función articular, por otro lado, la administración oral de polvo de jengibre a pacientes con reumatismo u otras alteraciones musculoesqueléticas ha reportado alivio del dolor y la inflamación. (Aguay, 2012)

Otro ejemplo es el aceite esencial de tomillo, el cual tiene una actividad inhibitoria de la biosíntesis de prostaglandinas por la presencia de carvacrol. Ello justifica la inclusión de la esencia de tomillo en linimentos y otros preparados para el tratamiento de dolores musculares y osteoarticulares. También tiene acción antiinflamatoria el ácido rosmarínico, debido a su capacidad de inhibir la activación del complemento, esta actividad se ha evidenciado in vivo sobre ratas, estarían relacionadas con la presencia de carvacrol y el timol, estas dos moléculas demostraron una fuerte inhibición sobre la acción de la enzima ciclooxigenasa en modelos de animales de experimentación, como así también inhibición de la vía del complemento e inhibición de la producción de óxido nítrico. En aplicación tópica, el aceite esencial de tomillo es rubefaciente, generando una sensación analgésica útil en casos de golpes o esguinces. (Aguay, 2012)

3.7. Ensayos de la actividad antiinflamatoria

La síntesis de mediadores locales inflamatorios como las prostaglandinas (PGs) que son inducidas por la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) forman parte del proceso de una inflamación. La biosíntesis de las prostaglandinas está regulada por la fosfolipasa A₂ (PLA₂), esta a su vez cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de la membrana, y la formación de ácidos grasos libres, como el ácido araquidónico (AA) y lisofosfolípidos. Estos metabolitos fosfolipídicos actúan como precursores de mediadores inflamatorios como los eicosanoides. Por lo que la identificación de inhibidores de COX-2 con propiedades antiinflamatorias más seguras está en continuo desarrollo.

En varios modelos animales se ha demostrado que los metabolitos con acción más marcada son los flavonoides, estos inhiben la inflamación crónica a través de diversos mecanismos.

Los flavonoides han mostrado actividad antioxidante y de barrido de radicales y la capacidad de regular diversas actividades celulares, como la actividad enzimática de COX. Por lo tanto, es importante la identificación de fuentes con alto contenido de flavonoides que sean aceptadas por la población en general. (Muñoz, E. 2012).

3.7.1. Actividad *in vitro*

Los análisis *in vitro* se realizan en base a la búsqueda de la identificación de metabolitos secundarios característicos y clasificarlos según la literatura.

El primer paso para determinar el potencial de un extracto o aceite esencial es el tamizaje fitoquímico, tomando importancia la presencia de flavonoides, fenoles y terpenos. Una vez con resultados positivos se pasa técnicas más específicas.

Uno de los métodos más sencillo es el análisis cromatográfico mediante el sistema de BAW, (n-BuOH: AcOH: H₂O, 4:1:5), en papel Whatman N°1 (11 x 29 cm). Los cromatogramas son secados y observados a luz UV con y sin vapores de amoníaco, identificándose bandas fluorescentes de diferente coloración, las cuales se intensifican o cambian de color luego de su exposición a vapores de amoníaco. Las bandas cromatográficas resultantes son eluidas con metanol, para su estudio con la reacción de Shinoda con el fin de determinar la presencia de flavonoides. (Poma, E. 2011)

Otro método *in vitro* es usando la metodología descrita por Shinde *et al.* Se usa un mL de solución de concentración 1 mg/mL del extracto vegetal a estudiarse, usando un control positivo (diclofenaco de sodio) mezclando una suspensión de eritrocitos en solución isosalina (NaCl 0,9 %) en cantidad de 0,5 mL, 1 mL de buffer fosfato (pH 7,4) y 2 mL de solución hiposalina (NaCl 0,45 %). La mezcla se incuba por 30 min a 37 °C y luego centrifugada a 3 000 rpm por 10 min. Finalmente se determina espectrofotométricamente a 560 nm, el contenido de hemoglobina del sobrenadante. La actividad antiinflamatoria se determina como porcentaje de

inhibición de la lisis osmótica eritrocitaria, y se calcula según la fórmula. (Valdez, 2018)

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{DO control} - \text{DO muestra}}{\text{DO control}} * 100$$

Posterior al análisis cromatográfico se confirma con el análisis cuantitativo de flavonoides totales por espectrofotometría UV-VIS, Se elabora una curva de calibración a diferentes concentraciones de flavonoides utilizando acetato de potasio y nitrato de aluminio como reactivos de desplazamiento. (Poma, E. 2011)

3.7.2. Actividad in vivo

Para la actividad in vivo por lo general se usan ratas o ratones.

El modelo Murino

Para método se realiza un edema auricular siendo inducido por TPA, una solución en acetona de 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (0,125 mg/L), se aplica de manera tópica sobre la superficie interna y externa en la zona de la oreja derecha del animal (10 µL/lado) para inducir la inflamación. Los extractos o formulaciones en estudio se colocan en proporción 1 mg/oreja e indometacina en proporción 0,5 mg/oreja, disueltas en acetona se aplican sobre la superficie interna y externa de la oreja derecha del animal estudiado, inmediatamente antes de la administración del TPA. Pasado el tiempo de 4 h de la administración del agente irritante, se sacrifican por dislocación cervical a todos los animales y se toman secciones circulares de 7 mm de diámetro de ambas orejas tanto la oreja tratada como la no tratada, las cuales se pesan determinándose el edema como el delta de peso. Los resultados se expresan como este delta y como porcentaje de inhibición frente al grupo control, utilizando la expresión siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{peso grupo control} - \text{peso tratamiento}}{\text{peso grupo control}} * 100$$

Se considera como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 al 65% y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65%. (Franco, L. 2013)

Edema plantar por carragenina (EPC)

Es el ensayo de elección para antiinflamatorios por vía oral, en este caso se emplean ratas Wistar hembras, con peso y edad constante. Previo ayuno de 12 horas, se administra por vía oral el tratamiento a evaluar con patrón indometacina en cantidad de 10 mg/kg; extracto o formulación a evaluar en proporción 250 a 1000 mg/ kg. Pasado el tiempo de una hora se administra carragenina λ al 3% como agente inductor de inflamación suspendida en solución salina (0,1 ml) en la pata trasera derecha. Se realiza la evaluación del efecto en la primera, tercera y quinta horas tras la aplicación del irritante mediante la determinación del desplazamiento de volumen que producen las patas de los animales en el pletismómetro digital. El desplazamiento entre la pata derecha irritada la cual es la tratada frente a la izquierda que es la no tratada es calculado. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del edema aplicando la fórmula (siendo V desplazamiento de volumen). (Gonzales, M. 2011)

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{V \text{ del grupo control} - V \text{ tratamiento}}{V \text{ grupo control}} * 100$$

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria de una formulación tópica también se lo puede realizar por el método del edema plantar inducido por carragenina al 1%, según Shanahan; en este caso para el diseño experimental se usan ratas albinas machos, con peso constante en condiciones normales de humedad y temperatura. Se inyecta en la parte subplantar del animal, y se espera a que se inflame lo suficiente, posteriormente se aplica la formulación deseada a 1, 3 y 5 horas posteriores, la evaluación se realiza por medio del pletismómetro y se lo expresa en porcentaje por diferencia de volumen de inflamación. (Savaria, 2005)

Actividad antiinflamatoria en la inducción de artritis

Es un método más específico en animales de experimentación, para esto se usan ratones machos de 10 a 11 semanas en condiciones estándar, para la preparación del antígeno: se disuelve el CII en ácido acético 10 mM a una concentración de 4 mg/ml para la inmunización inicial y de 2 mg/ml para el refuerzo durante un periodo de 8 horas a 4°C mediante una agitación continua. Aparte se prepara el

adyuvante completo de Freund mediante la molienda de 100 µg de Mycobacterium tuberculosis en mortero y su mezcla con adyuvante incompleto de Freund hasta una concentración final de 4 mg/ml. Posteriormente, se prepara la emulsión de CII/CFA para la inmunización y de CII/IFA para el refuerzo.

Finalmente para el protocolo de inmunización se realiza vía intradérmica en la base de la cola. El primer día de experimentación se inyectaron 50 µL de la emulsión del antígeno y una dosis de refuerzo en la semana 6 de la emulsión CII 50 µg en IFA. Mediante la escala visual de severidad de artritis se evalúa el desarrollo de artritis para cada extremidad teniendo la escala de: 0 en el caso que no exista evidencia de edema ni eritema; nivel de 4 si hay eritema y edema severo alrededor del tobillo, pata y dedos. La sustancia a evaluar se hace por administración oral diaria durante dos semanas de la fracción seleccionada. (Gonzales, M. 2011)

4. Materiales y metodología

4.1. Evaluación de la composición química

4.1.1. Evaluación de la composición química de *Bacharis latifolia*

El material vegetal de *B. latifolia*, fue recolectado en la ciudad de Riobamba, latitud: 1° 40' 26" S longitud: 78° 38' 37" W altitud: 2.752 m, en la provincia de Chimborazo.

De la chilca se usaron solo las hojas, las cuales pasaron por un tratamiento de lavado y desecado para posteriormente extraer el aceite esencial en un destilador de acero inoxidable con capacidad de 64 litros, que funciona con el mecanismo de agua y vapor de agua posteriormente se evaluó el rendimiento del aceite y se realizó el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para obtener su composición cuali – cuantitativa.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en columna apolar

La identificación de compuestos se la realizó a través de cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas, para esto se usó un cromatógrafo de gases Trace 1310 acoplado a un espectrómetro de masas ISQ 7000 marca Thermo Fisher Scientific con una columna cromatográfica Thermo Scientific TR-5MS, de longitud de 30 m, un espesor de 0.25 mm y un espesor de película de 0.25 µm. El gas de acarreo fue helio ultrapuro a un flujo de 1 mL/min, y un split-ratio de 1:40. La temperatura del inyector fue de 250 °C.

La temperatura inicial fue de 60 °C por 5 minutos, hasta alcanzar los 100 °C a una velocidad de 2°C/min, posteriormente se sube a los 150 °C, a una tasa de 3 °C/min, se alcanzan los 200 °C a 5°C/min, y finalmente llegamos a los 230 °C manteniéndose a esta temperatura por 5 minutos, siendo el tiempo total de análisis de 60,0 minutos.

Las condiciones del espectrómetro de masas fueron: energía de ionización: 70 eV; corriente de emisión: 10 µAmp; rango de escaneo: 1 scan/s; rango de masas: 40-350 Da; temperatura de la trampa: 230 °C; temperatura de la línea de transferencia: 200 °C.

Identificación de compuestos.

La identificación de las moléculas se realizó a través de la base de datos de espectros de masas NIST 2001. Además, se calculó el índice de retención aritmética (IR), de cada compuesto a través de la comparación de alcanos C8-C30, empleando la siguiente ecuación propuesta por Babushok et al. (2011), para el cálculo de índice de retención con una rampa de temperaturas.

Ecuación en el excel

$$I = 100 \left[\frac{(t_{R1} - t_{Rz})}{t_{R(z+1)} - t_{Rz} + z} \right]$$

Donde, t_{R1} : tiempo de retención de la molécula; t_{Rz} : tiempo de retención del estándar C_n inmediatamente inferior; $t_{R(z+1)}$: tiempo de retención del estándar C_n inmediatamente superior; z : número de átomos de C del estándar inmediatamente inferior; I : índice de retención.

Finalmente se cotejaron los índices de retención aritmética teóricos, contrastando con literatura científica en la base de datos Adams 2012.

4.1.2. Evaluación de la composición química de *Cannabis sativa*

El aceite esencial de cannabis fue adquirido en la tienda Eden Garden Essentials en San Clemente, EEUU, este producto fue entregado con el respectivo análisis en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas como parte de la ficha de calidad del aceite esencial.

4.2. Elaboración de fórmula tópica

Los aceites esenciales de cannabis y chilca fueron usados para la identificación de actividad antiinflamatoria local.

La formulación de elección para la aplicación tópica fue una crema base de textura gruesa, con buena palatabilidad, con la capacidad de penetrar la piel y permitir la óptima absorción de los aceites esenciales en la piel.

Preparación de la formula base:

Fases	Compuesto	Cantidad en porcentaje
Fase oleosa	<i>Aceite mineral</i>	12
	<i>Acido esteárico</i>	10
	<i>Manteca de cacao</i>	5
	<i>Alcohol cetílico</i>	5
	<i>Cera de abeja</i>	3
	<i>*Aceites esenciales</i>	1
Fase acuosa	<i>Agua</i>	63
	<i>TEA</i>	1

Tabla 1: formulación de crema base
Fuente: Autoras

La formulación se realizó como una emulsión, la primera fase (acuosa) se llevó a hasta 70° C, en otro recipiente se calentó la segunda fase (oleosa) hasta que se fundan todos los componentes, y se mantuvo a 70° C, seguido se vertió la una fase en la otra con constante agitación hasta que se forma la crema y las fases no se separen.

Usando los aceites esenciales se realizó varias formulaciones, en total la cantidad de aceite usado es al 1%, cada formulación con diferentes concentraciones de cada uno de los aceites como se indica en la tabla 2, con los fines de determinar cuál es la combinación porcentual óptima y si existe o no una sinergia entre los dos aceites esenciales.

Formulación con crema base	Proporción de aceites esenciales
Formulación 1	Aceite de cannabis 25%
	Aceite de chilca 75%
Formulación 2	Aceite de cannabis 50%
	Aceite de chilca 50%
Formulación 3	Aceite de cannabis 75%
	Aceite de chilca 25%
Formulación 4	Aceite de cannabis 100%
Formulación 5	Aceite de chilca 100%

Tabla2: proporción de aceites esenciales por formulación
Fuente: Autoras

De cada formulación se prepararon 100g para tener cantidad suficiente, los aceites esenciales se añadieron a la crema base cuando estaba en etapa de enfriamiento, a unos 50° C, para evitar la evaporación y pérdida de los aceites esenciales, además de poder homogenizar la crema antes que se enfríe en su totalidad, enseguida se envaso en frascos de vidrio de uso cosmético, los cuales fueron etiquetados con el número de formulación, sus componentes en concentración de aceites esenciales y la fecha de elaboración.

4.3. Análisis in vivo

El tratamiento de elección fue la determinación de la actividad antiinflamatoria mediante el edema subplantar por carragenina según Shanahan (Savaria, 2005), para esto se usó ratas machos Wistar donadas por la escuela de bioquímica y farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, con un peso entre 180 – 220 g, en condiciones de alimento y agua controlado por peso de ratas, edad entre las 4 y 8 semanas.

Las ratas fueron ambientadas durante 2 semanas en jaulas de 5 ratas cada una, en total fueron 7 jaulas, 5 para la aplicación de cada una de las formulaciones, un grupo control positivo con la aplicación de un antiinflamatorio tópico comercial (diclofenaco 1%) y otro para grupo control negativo al que se le aplico la fórmula de la crema base con ningún ingrediente activo.

Siguiendo el método, primero se midió el volumen de la pata posterior derecha con la ayuda de un pletismometro manual, la diferencia de volumen corresponde al volumen de la pata inicial y sirve para verificar el proceso antiinflamatorio después del tratamiento.

Seguido se inyectó 0.3 ml de la solución de carragenina al 1% en propilenglicol en la zona subplantar, y se dejó reposar al animal por 30 minutos para que el proceso inflamatorio llegue a su máximo.

Preparación de solución de carragenina

Se pesó 1 gramo de carragenina, se disolvió en propilenglicol al 10% y se llevó a fuego hasta disolver completamente, se enfrió hasta 75° C, se filtró y se enceró hasta los 100 mL con propilenglicol.

Pasado el tiempo con la inflamación notoria se toma de nuevo el volumen de la pata, este es el volumen post inflamatorio, e inmediatamente se aplica la formulación correspondiente. De aquí se va a medir el volumen de la pata pasado 1 hora, 3 horas y 5 horas. Teniendo en total 5 tomas.

Los datos obtenidos se toman por diferencia de volumen teniendo, V_1 (volumen del pletismometro con la pata de la rata) menos V_0 (volumen del pletismometro vacío).

4.4. Análisis estadístico

Al tener siete grupos de datos en diferentes tiempos, incluidos los grupos controles tanto positivo como blanco, el estudio estadístico se realizó en 4 etapas.

Mediante el programa R versión 2021 se analizó los datos, tomando en cuenta como principal parámetro la proporción de inflamación causada al inicio y el nivel de desinflamación en los tres tiempos en que se realizó las mediciones, estos parámetros se expresaron en valor neto de inflamación, teniendo de valor el volumen de la pata inflamada menos el volumen de la pata normal.

Primero se determinó si los valores presentan normalidad mediante el test de kolmogorov-sSmirnov con el ajuste de Lilliefors, teniendo en cuenta contrastar por tratamiento aplicado y por tiempo de transcurrido después de la aplicación del tratamiento.

Seguido se realizó el análisis de Homocedasticidad usando el test de Levene en todos los tiempos de medición de inflamación para determinar que las varianzas sean homogéneas, es decir que no exista una variabilidad muy grande entre los grupos de estudio y poder aplicar un test de Tukey posteriormente.

El análisis principal fue el test de Anova, previamente se hizo un análisis de covarianza para descartar la la correlación entre variables variable que no se toma en cuenta, en este caso una posible interacción con el volumen de la pata de la rata en estado inicial

El análisis de Anova se realizó en modelo de una vía para determinar una diferencia significativa entre las medias, se observaron las diferencias entre cada uno de los grupos

frente a otros en los tres tiempos de medición después de colocado el tratamiento para determinar cuál tratamiento es el más efectivo frente a la inflamación, tomando en cuenta los grupos controles blanco y positivo (diclofenaco).

Posteriormente se hizo un estudio de Anova en modelo lineal para ver el comportamiento de cada uno de los tratamientos como un factor dentro de una ecuación de regresión lineal, contrastando cada uno frente al grupo blanco.

5. Resultados y discusión

5.1. Composición química de los aceites esenciales

5.1.1. Composición química de *Cannabis sativa*

El análisis de composición química del aceite esencial de cannabis realizado por la empresa Eden Garden Essentials, ejecutado del Dr. Robert S. Pappas, se puede apreciar en la tabla, El análisis mostró que los componentes mayoritarios son: β - cariofileno con un 27.91%, mirceno 21.9%, α – pineno 8,05%, α – humuleno 8,03% y limoneno 7,08%.

Composición química del aceite esencial de *C. sativa*, proporcionado por la empresa Eden Garden Essentials.

no	Compuesto	% RDA	Índice de retención teórico ^a
1	Hexanol	0.05	863
2	No identificado	0.08	-
3	α -tujeno	0.07	924
4	α -pineno	8.05	932
5	Canfeno	0.08	946
6	Sabineno	0.95	969
7	β -pineno	4.68	974
8	No identificado	0.04	-
9	3-p-menteno	0.06	984
10	Mirceno	21.19	988
11	mesitileno	0.03	994
12	No identificado	0.24	-
13	α -felandreno	0.63	1002
14	δ -3-careno	0.69	1008
15	α -terpineno	0.11	1014
16	p-cimeno	0.22	1020
17	limonene	7.18	1024
18	β -felandreno	0.32	1025
19	1,8-cineol	0.29	1026
20	Z- β -ocimeno	0.24	1032

21	E- β -ocimeno	2.65	1044
22	γ -terpineno	0.10	1054
23	1-octanol	0.04	1063
24	E-sabineno hidrato	0.05	1098
25	terpinoleno	7.12	1086
26	fenchona	0.15	1083
27	linalool	2.25	1095
28	α -fenchol	0.70	1114
29	No identificado	0.06	-
30	borneol	0.13	1165
31	p-cimen-8-ol	0.08	1179
32	α -terpineol	0.33	1186
33	citronelol	0.16	1223
34	α -copaeno	0.05	1374
35	hexanoato de hexilo	0.04	1382
36	Z-cariofileno	0.14	1408
37	No identificado	0.04	-
38	Z- α -bergamoteno	0.05	1411
39	E-cariofileno	27.91	1417
40	α -elemeno	0.04	1434
41	E-bergamoteno	0.42	1432
42	No identificado	0.72	-
43	α -humuleno	8.03	1452
44	No identificado	0.25	-
45	No identificado	0.10	-
46	β -selinene	0.29	1489
47	γ -amorfenol	0.04	1495
48	α -selinene	0.21	1498
49	(E,E)- α -farneseno	0.08	1505
50	β -bisabolenol	0.03	1505
51	No identificado	0.05	-
52	No identificado	0.05	-
53	No identificado	0.11	-
54	No identificado	0.14	-
55	selina-3,7(11)-dieno	0.18	1545
56	germacreno B	0.10	1559
57	óxido de cariofileno	0.90	1582
58	epóxido de humuleno II	0.18	1608

59	No identificado	0.62	-
60	No identificado	0.22	-
Total no identificado		2.71	
Total identificado		97,29	

Tabla de composición química del aceite esencial de Cannabis. Índices de retención teóricos, (Adams, R. P. 2012).

5.1.2. Composición química de *Bacharis latifolia*

El análisis de composición química del aceite esencial de chilca realizado en un cromatógrafo de gases Trace 1310 acoplado a un espectrómetro de masas ISQ 7000 marca Thermo Fisher Scientific, se puede apreciar en la tabla, El análisis mostró que los componentes mayoritarios son: ligulóxido con un 14.02%, andro enecalinalol con un 9.84%, kesano con un 7.53%, limoneno con un 5,6% y Z-cadin-4-en-7-ol con un 5.03%.

No.	nombre	% RDA	IR teorico ^a	IR exp ^b
1	α -tujeno	4.77	924	925
2	α -pineno	4.27	932	933
3	canfeno	0.68	946	950
4	tuuja-2,4(10)-dieno	2.39	953	974
5	verbeneno	2.49	961	980
6	β -pineno	1.1	974	992
7	3-careno	3.4	1008	1011
8	limoneno	5.6	1024	1032
9	β -ocimeno	0.85	1032	1048
10	terpinolen	0.66	1086	1088
11	gurjuneno	0.68	1409	1406
12	cariofileno	1.3	1417	1420
13	humuleno	1.27	1454	1457
14	γ -curcumeno	2.91	1475	1479
15	α -curcumeno	1.97	1483	1484
16	himachaleno	0.26	1481	1486
17	E-muurolo-4(14),5-dieno	3.41	1493	1498
18	β -curcumeno	2.19	1514	1512

19	α -7-epi-selinene	1.98	1520	1523
20	zoraneno	1.01	1529	1529
21	kesano	7.53	1530	1535
22	γ -vetiveveno	0.53	1531	1537
23	ligulóxido	14.02	1534	1544
24	Spatulenol	2.39	1578	1585
25	oxido de cariofileno	0.25	1582	1589
26	α -10 epi-eudesmol	1.23	1622	1614
27	muurola-4,10(14)-dien-1-ol	0.99	1630	1633
28	epi-cadinol	1.06	1638	1638
29	Z-cadin-4-en-7-ol	5.03	1635	1647
30	α -cadinol	1.46	1652	1655
31	valerianol	0.78	1658	1668
32	andro enecalinal	9.84	1677	1679
33	α -bisabolol	1.71	1685	1698
34	ciperotundona	2.1	1695	1706
35	No identificado	1.65		1751
36	No identificado	2.82		1764
37	No identificado	1.84		1769
38	No identificado	1.57		1792
Total identificado		92.11		
Total no identificado		7.89		

Tabla de composición química del aceite esencial de Chilca. Índices de retención teórico base de datos Adams 2012, ^b Índices de retención experimental comparada con una serie homóloga de hidrocarburos C8-C30.).

5.2. Formula tópica

Se determinó las características organolépticas de las cremas al momento de la preparación teniendo: color, olor y consistencia.

	Olor	Color	Consistencia
Blanco	Agradable	Blanco	Firme
Chilca 100%	Aromático	Blanco brillante	Firme
Cannabis 100%	Aromático	Blanco brillante	Firme
Cannabis 25% chilca 75%	Aromático	Blanco brillante	Firme
Cannabis 50% chilca 50%	Aromático	Blanco brillante	Firme
Cannabis 75% chilca 25%	Aromático	Blanco brillante	Firme
Control positivo (Diclofenaco)	Inodoro	Blanco	Oleoso

Tabla de análisis organoléptico de las formulaciones propuestas
Fuente: Autoras

La formulación del blanco tiene características generales de un cosmético tópico con textura gruesa además tiene buena palatabilidad, característica que de la misma manera tienen el resto de formulaciones con los aceites esenciales.

Las formulaciones que poseen aceites esenciales tienen un olor aromático fuerte característicos de los aceites esenciales, y esta es la misma razón por la que presentan un color blanco brillante a diferencia del blanco.

El control positivo al ser un producto farmacéutico con principio activo químico, la formulación ideal del producto es gel con características inodoras e incoloras.

5.3. Análisis in vivo

La tabulación de los resultados se muestran por tratamiento dado para cada individuo de cada grupo. En cada resultado se muestra la diferencia del volumen indicado con el pletismómetro con la pata menos el volumen del pletismómetro vacío, donde:

V_i = volumen de la pata en estado normal antes de la inflamación.

V_o = volumen inicial después de 30 minutos de inflamación de pata posterior derecha.

V_1 = volumen después de 1 hora de aplicar el tratamiento.

V_2 = volumen después de 3 horas de aplicar el tratamiento.

V_3 = volumen después de 5 horas de aplicar el tratamiento.

5.3.1. Formulación 1

Aceite de cannabis 25% + Aceite de chilca 75%

N de animal	V_i (ml)	V_o (ml)	V_1 (ml)	V_2 (ml)	V_3 (ml)
1	1,4	2,7	2,6	1,4	1,4
2	1	3,7	2,2	2,2	1,5
3	1,4	3,1	2,3	1,6	1,5
4	1	3,1	3	2	1,7
5	1	3,8	3,1	2,4	2,1

5.3.2. Formulación 2

Cannabis 50% + chilca 50%

N de animal	Vi (ml)	Vo (ml)	V1 (ml)	V2 (ml)	V3 (ml)
1	1,1	3,5	3	2,4	2
2	1,2	3,1	2,4	1,6	1,5
3	1	3,5	2,1	2,1	1,5
4	1	3,4	3	1,7	1,2
5	0,9	3,7	2,7	2	1,8

5.3.3. Formulación 3

Aceite de Cannabis 75% + aceite de chilca 25%

N de animal	Vi (ml)	Vo (ml)	V1 (ml)	V2 (ml)	V3 (ml)
1	0,6	3,3	2,2	1,4	1
2	0,6	3,3	2,2	1,4	1
3	0,7	3	1,3	1,5	0,9
4	1,1	3	1,5	1,5	1
5	0,6	2,5	1,2	1,3	1

5.3.4. Formulación 4

Aceite esencial de cannabis 100%

N de animal	Vi (ml)	Vo (ml)	V1 (ml)	V2(ml)	V3 (ml)
1	0,5	2,5	2,3	2	0,9
2	0,5	1,9	1,5	1,2	1,4
3	0,5	1,9	2,1	1,3	1,2
4	0,5	1,6	2,1	1,5	1,1
5	0,7	1,7	2,1	1,5	1,2

5.3.5. Formulación 5

Aceite esencial de chilca al 100%

N de animal	Vi (ml)	Vo (ml)	V1 (ml)	V2 (ml)	V3 (ml)
1	1,3	2,3	1,5	2,1	2,1
2	0,9	2,3	2,3	2,5	0,8
3	0,9	2,4	1,6	2	2
4	1,3	2,1	2,1	1,5	1,5
5	1,1	2,6	2,4	2,1	1,7

5.3.6. Formulación 6

Control positivo crema base sin aceites esenciales.

N de animal	Vi (ml)	Vo (ml)	V1(ml)	V2 (ml)	V3 (ml)
1	1,6	3,5	4,3	4,2	3
2	2	3,1	4,1	4	2,5
3	2	3,8	3,7	3,6	2,9
4	2,1	3,4	4,2	4,2	2,5
5	2,6	3,1	4,2	4,2	2,4

5.3.7. Formulación 7

Control blanco, Diclofenaco comercial al 1%

N de animal	Vi (ml)	Vo (ml)	V1 (ml)	V2 (ml)	V3 (ml)
1	1,5	4	2,5	2,4	2,3
2	1,2	4,3	4,2	4	2,5
3	1,7	4,2	4,2	3,9	2,5
4	2	3,7	4,9	4,8	3,5
5	2,5	4	5	4	2

5.4. Análisis estadístico

5.4.1. Test de Normalidad

Se realizó el análisis de normalidad por tiempo transcurrido después del tratamiento aplicado en los siete niveles, se comprobó la homogeneidad de varianzas ($\text{sig} > 0.05$) lo que indica que la población evaluada tienen una distribución normal.

5.4.2. Test de homogeneidad

El segundo supuesto es la homocedasticidad con un valor de $p > 0,05$ indicando que las varianzas son homogéneas, no hay una variabilidad entre los grupos y es posible aplicar una test de comparaciones posteriores, también se lo hizo por niveles de tiempo transcurrido después de aplicado el tratamiento.

5.4.3. Test de Ancova

Se evaluó una posible covarianza, para determinar si los valores estudiados dependen de las condiciones iniciales en las que se realizó el experimento. El parámetro analizado fue el diámetro inicial de las patas de las ratas sin efecto de los tratamientos, considerando que existen diferencias iniciales entre los volúmenes de las patas, se puede concluir que no existe ninguna correlación de los resultados finales de los tratamientos con las condiciones iniciales del volumen de la pata, pudiendo continuar con un análisis de diferencias de medias.

5.4.4. Test de Anova

La prueba de Anova de una vía muestra que si existen diferencias significativas entre las medias aritméticas entre todos los grupos, principalmente en los grupos de análisis donde se aplicó combinaciones de aceites esenciales

Se evidencian diferencias significativas entre todos los grupos de los tratamientos administrados en los diferentes niveles con el análisis múltiple de medias Tukey, las diferencias son más marcadas en el segundo tiempo, a las 3 horas los grupos si hay diferencias de actividad de inflamación en la mayoría de los grupos, mientras que en el tercer tiempo a las 5 horas y en el primer tiempo a la hora de tratamiento solo se ven diferencias significativas entre los tratamientos de combinaciones de aceites y el blanco, además el tratamiento de cannabis 75% chilca 25% fue el único grupo que presentó diferencias con el control positivo y tratamientos puros en todos los tiempos.

5.4.5. Regresión lineal

Los valores estimados representan el coeficiente numérico de cada tratamiento en los tres tiempos estudiados contrastado con el grupo blanco; se entiende que mientras más grande es el valor mayor es el efecto de la actividad antiinflamatoria.

El valor estimado del grupo blanco es 0, los valores de los grupos representan cuanto más actividad tienen, en este sentido el grupo con mayor actividad es el grupo de cannabis 75% chilca 25%, que muestran los valores más altos en los tres tiempos.

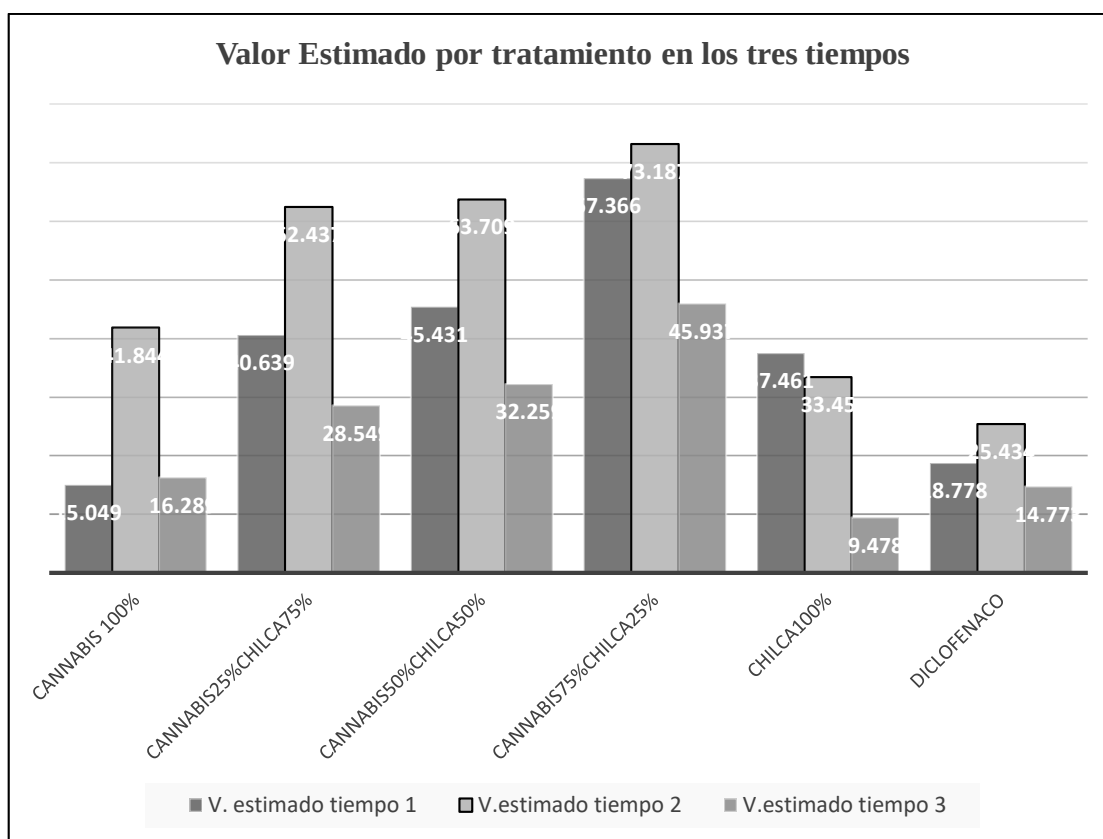


Gráfico de niveles de valores estimado en las regresiones lineales de los tres tiempos de todos los tratamientos de estudio.

El gráfico muestra una diferencia significativa de actividad en dos formulaciones, aquella con 75% de cannabis y 25% de chilca y la que contiene 50% de cannabis y 50% de chilca, se destacan están dos formulaciones pues en todos los tratamientos son aquellas con mejores resultados antiinflamatorios. El resto de formulaciones poseen una actividad similar a las del control positivo, evidenciándose una menor actividad en aquellas formuladas con los aceites esenciales puros.

6. Conclusiones

La composición química del aceite esencial de cannabis con moléculas mayoritarias como el cariofileno, mirceno, humuleno, limoneno y pinenos, es muy similar a la que podemos encontrar en la literatura científica (Malingre et al, 1975; Novak et al 2001; Zegin et al, 2018). Tanto para cariofileno (Dahham et al, 2015; Bakir et al, 2008), como para mirceno (Surendran et al, 2021), existen estudios que conforman su actividad antiinflamatoria en diversos ensayos.

A diferencia del aceite esencial de cannabis el de chilca tiene pocos estudios, lo que no nos permite tener suficientes fuentes de comparación, el estudio realizado por Valarezo et al, 2013, muestra semejanzas y diferencias dentro de la composición química del aceite, lo que podría deberse a las variables ecológicas de los lugares de recolección de la planta. En referencia a los componentes más abundantes en nuestra investigación: ligulóxido, andro encecalinol y kesano, no se tienen estudios de bioactividad lo que deja abierta la posibilidad de aislar dichas moléculas y verificar sus propiedades medicinales entre ellas la antiinflamatoria.

Básicamente todas las formulaciones que contienen aceites esenciales individuales o en mezclas al 1% en la formulación, muestran actividad, si consideramos su comparación con el control positivo (formulación comercial con diclofenaco al 1%), son destacables sin embargo aquellas fórmulas de mezclas de aceites esenciales cuya actividad positiva desde el punto de vista de la significancia estadística, presentan una mejor bioactividad antiinflamatoria con respecto al control positivo y a los aceites esenciales puros. Las dos formulaciones más efectivas son aquellas con un 25% de aceite de chilca (250 mg en 100 gramos de ungüento) y 75% de aceite de cannabis (750 mg en 100 gramos de ungüento) y la que contiene 50% de aceite de chilca (500 mg en 100 gramos de ungüento) y 50% de aceite de cannabis (500 mg en 100 gramos de ungüento), prácticamente en todos los test (1, 3 y 5 horas), la estadística revela su significancia en comparación con el control positivo, lo que nos llevaría a proponerlas como fórmulas posibles en el mercado de los productos naturales.

Las cantidades de aceites esenciales empleadas son pequeñas lo que daría como resultado un producto competitivo comercialmente, a esto debemos añadir que la especie *B. latifolia* es abundante en los andes del Ecuador y que en el país se empieza a producir cannabis medicinal, en donde los aceites esenciales podrían ser uno de los metabolitos de interés más allá de CBD.

Referencias

- Adams, R. P. (2012). Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy. Academic press.
- Aguay, M. (2012), “evaluación de la actividad antiinflamatoria de la mezcla de extractos fluidos de jengibre (*zingiber officinale*), tomillo (*thymus vulgaris* L.), romero (*rosmarinus officinalis*) mediante el test de edema inducido en ratas (*Rattus novergicus*), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2003/1/56T00311.pdf>.
- Ángeles, G. (2014), Cannabis sativa L., una planta singular, Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, vol.45 no.4 Ciudad de México, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952014000400004.
- Avello L, M., Pastene N, E., Fernández R, P., & Córdova M, P. (2017). Potencial uso terapéutico de cannabis. Revista médica de Chile, 145(3), 360-367. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872017000300010>.
- Baptista, J. (2016), Constituyentes químicos y actividad antiinflamatoria de Marcetia taxifolia, An International Refereed Scientific Journal of the Facultad experimental de Ciencias at the Universidad del Zulia, Vol.24, N.2, Abril/Junio 2016, https://web.archive.org/web/20180514124231id_/http://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/viewFile/21582/21387
- Bayas Morejón, Rivelino, R, García Pazmiño, M. & Mite Cárdenas. G. (2020). Antibacterial and antioxidant effect of natural extracts from Baccharis latifolia (chilca). 18, 489-493.
- Calle, A., San Martin, Á., Melgarejo, M., Flores, Y., & Almanza, G. R. (2017). Evaluation of flavonoid contents and antibacterial activity of five Bolivian baccharis species. Revista Boliviana de Química, 34(4), 112-122.
- Cherres, I, (2018), ¿Son seguros los productos naturales analgésicos en los pacientes con alergia a los antiinflamatorios no esteroideos?, Revista de alergias, Méx. vol.65 no.1 Ciudad de México ene./mar. 2018, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2448-91902018000100099&script=sci_arttext
- Chilquillo Torres, H. M., & Cervantes Macizo, R. G. (2017). Efecto antiinflamatorio, analgésico y antioxidante del extracto hidroalcohólico de las hojas de Senecio canescens (Humb. & Bonpl.) Cuatrec.“vira-vira”. Perú, http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/6416/Chilquillo_th.pdf?sequence=3&isAllowed=y

Durán, M. (2005). USO TERAPÉUTICO DE LOS CANNABINOIDES. EGUZKILORE, 19, 139-149.

Fassio, A, Rodríguez, M. & Ceretta, S. (2013). Cáñamo (*Cannabis sativa* L.) (Vol. 103). INIA.
https://catalogo.latu.org.uy/opac_css/doc_num.php?explnum_id=2348

Franco, L. (2013), Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*, Revista Cubana Plantas Medicinales, Vol.18, No.1, Ciudad de la Habana ene.-mar. 2013, http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1028-47962013000100006#fo2

Gonzales, M, (2011), Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de *myrcianthes leucoxila*, *calea prunifolia*, *curatella americana* y *physalis peruviana* en los modelos edema auricular por pata, edema plantar por carragenina y artritis inducida por colágeno, Revista Biosalud, Volumen 10 No. 1, enero - junio, 2011. págs. 9 – 18, <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v10n1/v10n1a02.pdf>

Guerra. P, 2016, Evaluación de la actividad antioxidante bioautográfica de dos variedades de aceites esenciales andinos *Clinopodium nubigenum* (Kunt) Kuntze y *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers tesis de grado obtenido no publicada, Universidad Politécnica Salesiana, Quito – Ecuador, recuperado de: <file:///C:/Users/Win/AppData/Local/Temp/UPS-QT09569.pdf>

Herbario Nacional Colombiano. (2004). Chilca, chilco (Caldas, Tolima); chilca morada (Caldas); chilca negra, algodoncillo, auraucho (Tolima); chilca dulce, chilco blanco (Antioquia); chilco común (región Andina) (*Baccharis latifolia*). Catálogo Virtual de Flora de Alta Montaña. <https://catalogofloraaltamontana.eia.edu.co/species/189>

Linnaeus, Carl von. (1753). *Cannabis sativa* L. En *Species Plantarum*. Tropicos (Impensis Laurentii Salvii, Vol. 2, p. 1027). <https://www.tropicos.org/name/21302042>.

Loja Herrera, B., Alvarado Yarasca, Á., Salazar Granara, A., Ramos Yica, E., & Jurado, B. (2017). Cribado fitoquímico del *Baccharis latifolia* (R&P.) Pers. (Chilca). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 22(1), 1-7.

López, A., G. E., Brindis, F., Niizawa, C. S., & Martínez, V. (2014). *Cannabis sativa* L., una planta singular. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, 45(4), 1-6.

Martin, A. (2021), Aceites esenciales procedentes de materia vegetal originaria en Cantabria y su posible uso contra el SARS-CoV-2, universidad de Cantabria, España, <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/22711/436681.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Martínez, A. (2003), ACEITES ESENCIALES, Universidad de Antioquia, pág.,
2 y 3. http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf

Martínez, S., Mollinedo, P., Mamani, O., Almanza, G., & Terrazas, E. (2011). Estudio in vitro de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Candida albicans*. *Revista Boliviana de Química*, 28(1), 35-40.

Mosquera, T. (2022). Productos naturales Investigación y perspectivas en Ecuador (1.a ed.). Abya-Yala. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21673/4/Productos%20naturales%202022.pdf>

Muñoz, E. (2012), Comparación del contenido fenólico, capacidad antioxidante y actividad antiinflamatoria de infusiones herbales comerciales, *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, Vol.3 No.3, Edición: may./jun. 2012, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000300006.

Persoon, Christiaan Hendrik. (1807). *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. En *Synopsis Plantarum. Tropicis* (Villancico. viernes Cramerum, Vol. 2, p. 424). <https://www.tropicos.org/name/2700275>.

Pinzón, R., Liévano, D., Mora, A., Rueda, D. & Sandoval, A. (2008). *Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales*. Imprenta Nacional de Colombia. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SA/vademecum-colombiano-plantas-medicinales.pdf>

Poma, E. (2011), Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (guanábana) de cuzco, *Revista de Ciencia e Investigación*: pag:29-33, Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM 2011, http://ateneo.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/123456789/2318/ciencia_e_investigacion06v14n2_2011.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

Prada, J., Ordúz-Díaz, L. L., & Coy-Barrera, E. (2016). *Baccharis latifolia*: Una *Asteraceae* poco valorada con potencialidad química y biológica en el neotrópico. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(1), 92-105. <https://doi.org/10.18359/rfcb.1858>

Quishpe, K. (2018), evaluación de la actividad insecticida de extracto acuoso y alcohólico de ruda (*ruta graveolens*), marco (*ambrosia arborescens mill.*), chilca (*baccharis latifolia*), romero (*rosmarinus officinalis*), utilizados para controlar el pulgón (*brevicoryne brassicae*) en cultivo de col (*brassica olerasia var capitata*) en Riobamba, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador, <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/9703/1/56T00837.PDF>

Ramos Atance & Fernández Ruiz. (2000). Cannabinoides: Propiedades químicas y aspectos metabólicos. *Adicciones*, 12(2), 41-55.

Regalado, A. (2015), Plantas cubanas con efecto antiinflamatorio, Revista Cubana Farmacéutica vol.49 no.1 Ciudad de la Habana ene.-mar. 2015, http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000100015.

Renobales G. & Sallé J. (2001). Cannabis sativa: Morfología y ecología. 1.

Rodríguez Carranza, R. (2012). Los productos de Cannabis sativa: Situación actual y perspectivas en medicina. Salud Mental, 35(3), 247-256.

Rodríguez-Venegas, E. de la C., Fontaine-Ortiz, J. E., Rodríguez-Venegas, E. de la C., & Fontaine-Ortiz, J. E. (2020). Situación actual de Cannabis sativa, beneficios terapéuticos y reacciones adversas. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 19(6). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1729-519X2020000700008&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Romoleroux, K., Cárate-Tandalla, D., Erler, R., & Navarrete, H. (2019). Baccharis latifolia. Plantas vasculares de los bosques de Polylepis en los páramos de Oyacachi.

<https://bioweb.bio/floraweb/polylepis/FichaEspecie/Baccharis%20latifolia>

Salcedo. L, 2011, Uso de Baccharis latifolia (Chilca) en La Paz, Bolivia, BIOFARBO v.19 n.1 La Paz, Bolivia, recuperado en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632011000100009&script=sci_arttext&tlng=es

Sandoval, M. (2021), Análisis de las características fitoquímicas, propiedades farmacológicas, usos y aplicaciones más comunes de la Chilca (Baccharis latifolia) en el Ecuador, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador, <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/33670/1/BQ%20290.pdf>.

Savaria, 2005, Manual de ensayos toxicológicos y farmacológicos experimentales in vivo e in vitro, capítulo 87, pág. 423-425.

Sequeda-Castañeda, L. G., Célis, C., & Luengas-Caicedo, P. E. (2015). Phytochemical and therapeutic use of Baccharis latifolia (Ruiz & Pav.) pers. (Asteraceae). Pharmacology, 2, 14-17.

Sohly, M. A., Radwan, M. M., Gul, W., Chandra, S., & Galal, A. (2017). Phytochemistry of Cannabis sativa L. En A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, & J. Kobayashi (Eds.), Phytocannabinoids (Vol. 103, pp. 1-36). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45541-9_1.

Suero-García, C., Martín-Banderas, L., & Holgado, M. Á. (2015). Efecto neuroprotector de los cannabinoides en las enfermedades neurodegenerativas. Ars Pharmaceutica (Internet), 56(2), 77-87. <https://doi.org/10.4321/S2340-98942015000200002>

Suxo. P, 2014, “Elaboración de una fórmula farmacéutica de uso tópico antiinflamatorio y analgésico en base a un extracto etanólico de baccharis

latifolia (chillka)” tesis de grado obtenido no publicada, Universidad Mayos San Andrés, La Paz, Bolivia.

Tropicos | Name—*Baccharis latifolia*. (s. f.). Recuperado 22 de abril de 2022, de <https://www.tropicos.org/name/2700275>

Tropicos | Name—*Cannabis sativa*. (s. f.). Recuperado 22 de abril de 2022, de <https://www.tropicos.org/name/21302042>

Valarezo, E., Rosillo, M., Cartuche, L., Malagón, O., Meneses, M., & Morocho, V. (2013). Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, 25(3), 233-238. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.775679>.

Valdez, L. (2018), Actividad antiinflamatoria y antioxidante in vitro de extractos etanólicos de *Jatropha aethiopica* Müell Arg var *inermis*, *Revista Cubana de Química*, Vol.30, No.3, Santiago de Cuba, edición: set.-dic. 2018, http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2224-54212018000300005&script=sci_arttext&tlng=en.

Vibrans, H. (2009, agosto 16). *Baccharis salicifolia*—Ficha informativa. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/baccharis-salicifolia/fichas/ficha.htm>

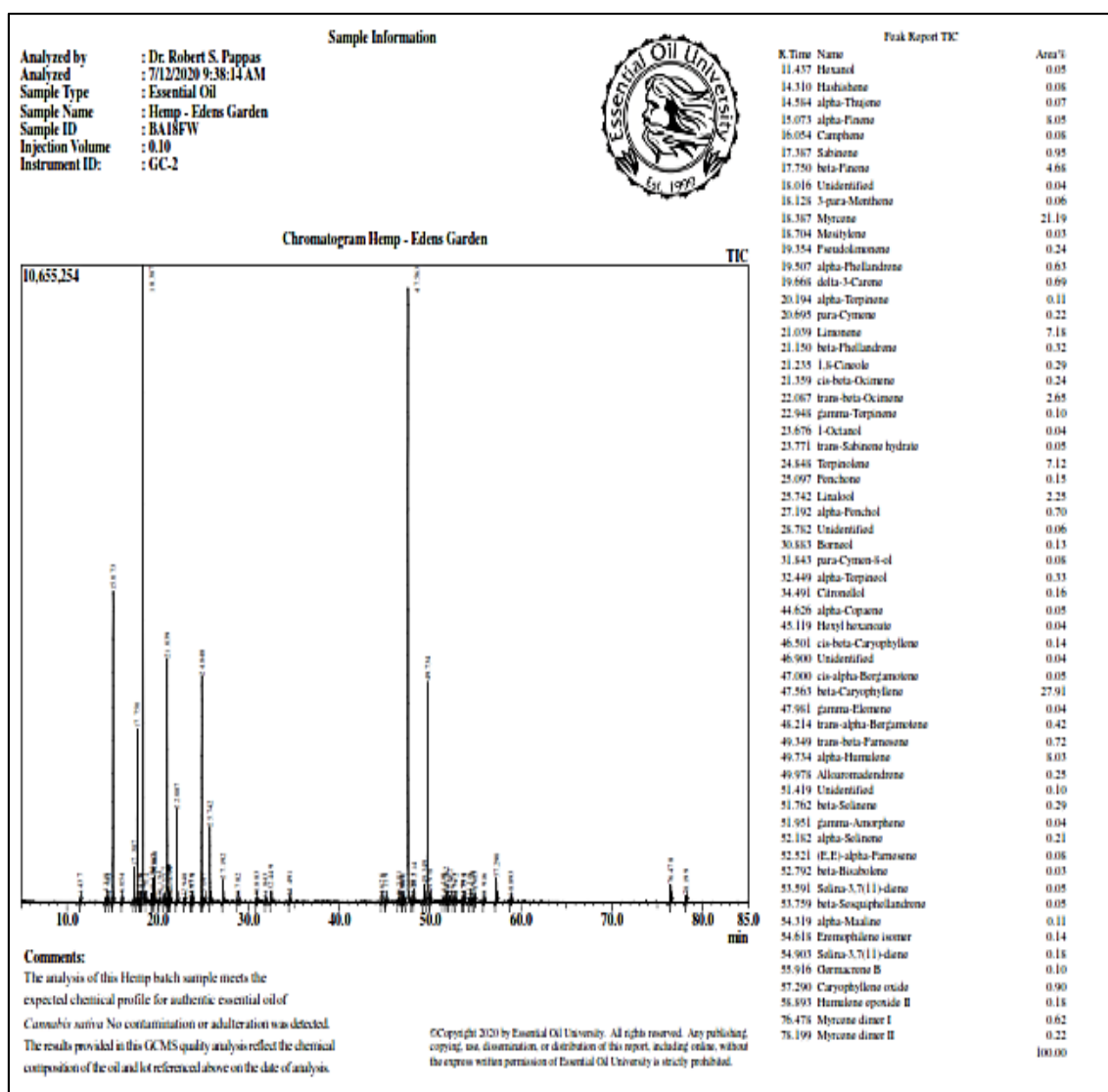
Villarpando, D. (2011). Fichas Botánicas de Especies Agroforestales Nativas y Naturalizadas aptas para Tierras Altoandinas. <http://www.ecosaf.org/altiplano/Fichas%20botanicas%20CARE.pdf>.

World Health Organization. (2016). The health and social effects of nonmedical cannabis use. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/251056>.

Anexos

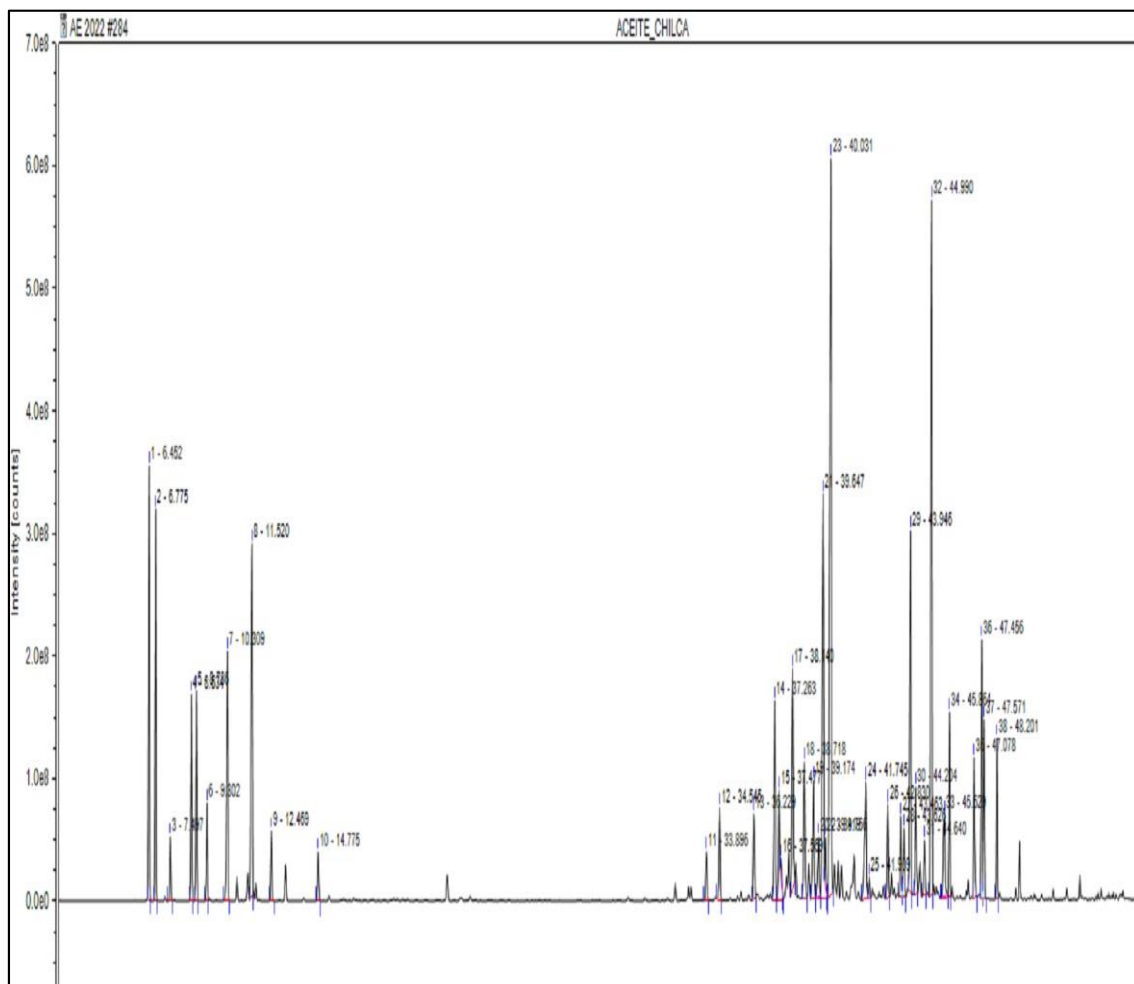
Anexo 1.

CG/MS del aceite esencial de cannabis.



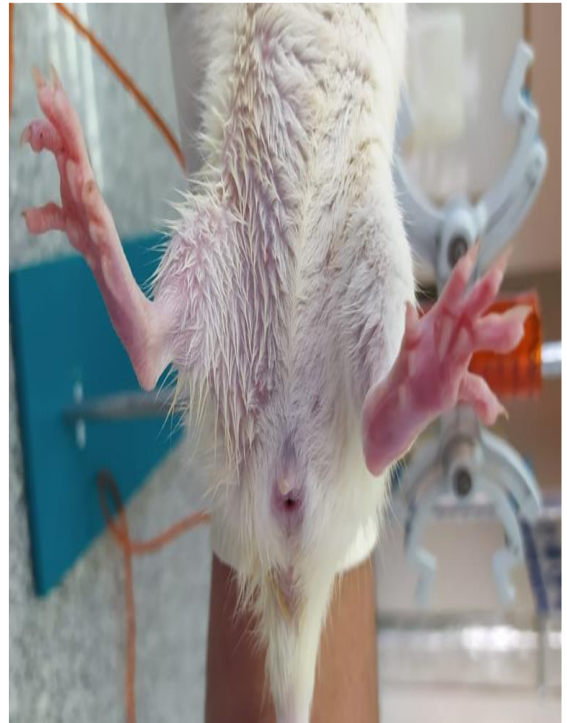
Anexo 2

CG/MS del aceite esencial de chilca



Anexo 3

Procedimiento de evaluación de inflamación in vivo



Anexo 4

Test de normalidad

TEST:		Lilliefors (Kolmogorov-Smirnov) normality test		
Supuesto:		p>0.05		
		Valores de p estadístico		
Grupos		Tiempo 1 (1 hora)	Tiempo 2 (3 horas)	Tiempo 3 (5 horas)
Blanco		0.10561	0.19693	0.6619763
Cannabis 100%		0.89062	0.81558	0.096557
Cannabis 25% chilca 75%		0.56364	0.40133	0.67015
Cannabis 50% chilca 50%		0.83605	0.42308	0.774245
Cannabis 75% chilca 25%		0.25202	0.10117	0.09332
Chilca 100%		0.29583	0.69053	0.52198
Control positivo (diclofenaco)		0.62111	0.30257	0.00884

Anexo 5

Test de homogeneidad

TEST		Levene Test		
Supuesto				
		Valores de p estadístico		
		Tiempo 1 (1 hora)	Tiempo 2 (3 horas)	Tiempo 3 (5 horas)
		0.7555	0.9077	0.9544

Anexo 6

Test de Anova tiempo 1

TEST		Anova			
Supuesto					
		Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr>F
Tiempo 1 (1hora)		15108	2518.1	7.817	0.000053 ***

Codificación de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

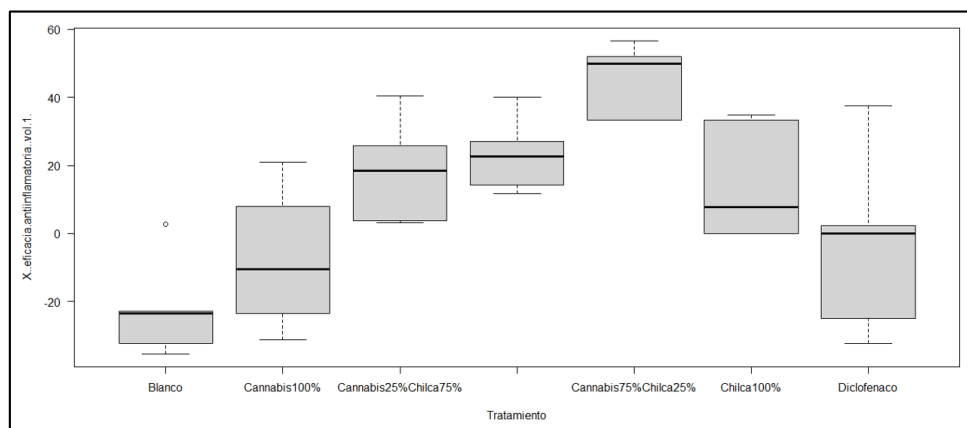


Gráfico de test de Anova en el tiempo 1 – una hora después de administrado el tratamiento. El tipo de tratamiento aplicado vs el volumen en porcentaje de inflamación de la pata de la rata.

Anexo 7

Test de Anova tiempo 2

TEST	Anova			
Supuesto				
	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr>F
Tiempo 2 (3 horas)	19839	3307	17.31	0.0000000293 ***

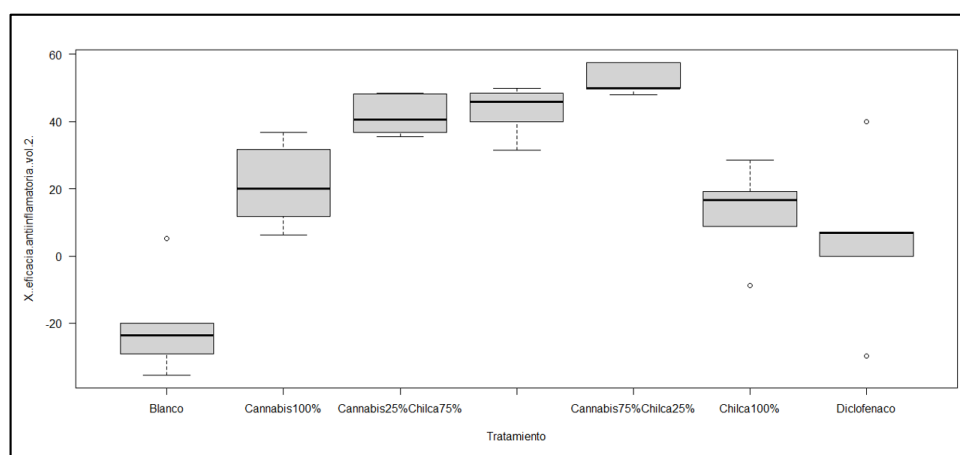


Gráfico de test de Anova en el tiempo 2 – tres horas después de administrado el tratamiento. El tipo de tratamiento aplicado vs el volumen en porcentaje de inflamación de la pata de la rata.

Anexo 8

Test de Anova tiempo 3

TEST	Anova			
Supuesto				
	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr>F
Tiempo 3 (5 horas)	7202	1200	7.275	0.000094 ***

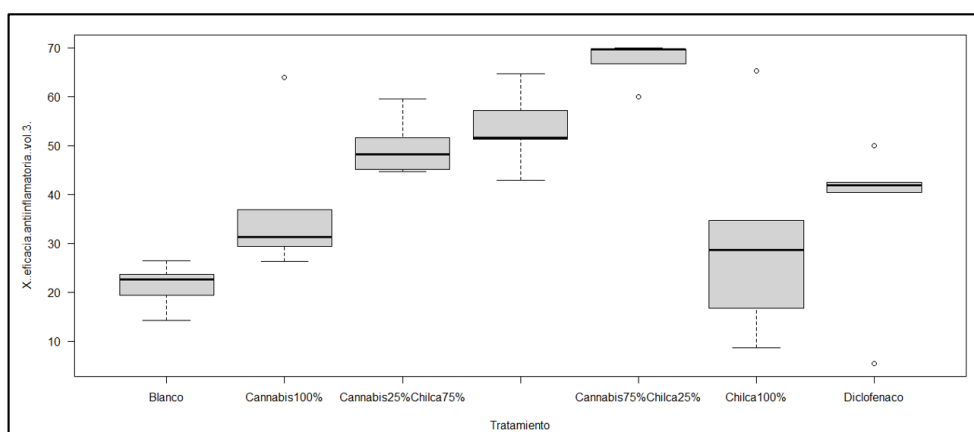


Gráfico de test de Anova en el tiempo 3 – cinco horas después de administrado el tratamiento. El tipo de tratamiento aplicado vs el volumen en porcentaje de inflamación de la pata de la rata.

Anexo 9

Test de Anova comparación múltiple tiempo 1

TEST	Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts			
Supuesto	Pr(> t) en tiempo 1 (1 hora despues de aplicado el tratamiento)			
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
<i>Cannabis100% - Blanco</i>	15.049	11.352	1.326	0.83428
<i>Cannabis25%Chilca75%-Blanco</i>	40.639	11.352	3.580	0.01912 *
<i>Cannabis50%Chilca50% - Blanco</i>	45.431	11.352	4.002	0.00668 **
<i>Cannabis75%Chilca25% - Blanco</i>	67.366	11.352	5.935	0.001 ***
<i>Chilca100% - Blanco</i>	37.461	11.352	3.300	0.03748 *
<i>Diclofenaco - Blanco</i>	18.778	11.352	1.654	0.65010
<i>Cannabis25%Chilca75% - Cannabis100%</i>	25.590	11.352	2.254	0.30047
<i>Cannabis50%Chilca50% - Cannabis100%</i>	30.382	11.352	2.676	0.14165
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis100%</i>	52.317	11.352	4.609	0.00141 **
<i>Chilca100% - Cannabis100%</i>	22.412	11.352	1.974	0.45197
<i>Diclofenaco - Cannabis100%</i>	3.729	11.352	0.329	0.99988
<i>Cannabis50%Chilca50% - Cannabis25%Chilca75%</i>	4.792	11.352	0.422	0.99949
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis25%Chilca75%</i>	26.727	11.352	2.354	0.25496
<i>Chilca100% - Cannabis25%Chilca75%</i>	-3.178	11.352	-0.280	0.99995
<i>Diclofenaco - Cannabis25%Chilca75%</i>	-21.861	11.352	-1.926	0.48120
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis50%Chilca50%</i>	21.935	11.352	1.932	0.47695
<i>Chilca100% - Cannabis50%Chilca50%</i>	-7.970	11.352	-0.702	0.99139
<i>Diclofenaco - Cannabis50%Chilca50%</i>	-26.653	11.352	-2.348	0.25738
<i>Chilca100% - Cannabis75%Chilca25%</i>	-29.905	11.352	-2.634	0.15407
<i>Diclofenaco - Cannabis75%Chilca25%</i>	-48.588	11.352	-4.280	0.00343 **
<i>Diclofenaco - Chilca100%</i>	-18.683	11.352	-1.646	0.65519

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anexo 10

Test de Anova comparación múltiple tiempo 2

TEST	Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts			
Supuesto	Pr(> t) en tiempo 2 (3 horas despues de aplicado el tratamiento)			
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
<i>Cannabis100% - Blanco</i>	41.844	8.741	4.787	< 0.001 ***
<i>Cannabis25%Chilca75%-Blanco</i>	62.437	8.741	7.143	< 0.001 ***
<i>Cannabis50%Chilca50% - Blanco</i>	63.709	8.741	7.288	< 0.001 ***
<i>Cannabis75%Chilca25% - Blanco</i>	73.187	8.741	8.373	< 0.001 ***
<i>Chilca100% - Blanco</i>	33.450	8.741	3.827	0.01056 *
<i>Diclofenaco – Blanco</i>	25.434	8.741	2.910	0.08829
<i>Cannabis25%Chilca75% - Cannabis100%</i>	20.593	8.741	2.356	0.25422
<i>Cannabis50%Chilca50% - Cannabis100%</i>	21.865	8.741	2.501	0.19659
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis100%</i>	31.343	8.741	3.586	0.01844 *
<i>Chilca100% - Cannabis100%</i>	-8.393	8.741	-0.960	0.95844
<i>Diclofenaco - Cannabis100%</i>	-16.409	8.741	-1.877	0.51102
<i>Cannabis50%Chilca50% - Cannabis25%Chilca75%</i>	1.272	8.741	0.146	1.00000
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis25%Chilca75%</i>	10.750	8.741	1.230	0.87660
<i>Chilca100% - Cannabis25%Chilca75%</i>	-28.987	8.741	-3.316	0.03576 *
<i>Diclofenaco - Cannabis25%Chilca75%</i>	-37.002	8.741	-4.233	0.00370 **
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis50%Chilca50%</i>	9.478	8.741	1.084	0.92758
<i>Chilca100% - Cannabis50%Chilca50%</i>	-30.259	8.741 -	3.462	0.02569 *
<i>Diclofenaco - Cannabis50%Chilca50%</i>	-38.274	8.741 -	4.379	0.00251 **
<i>Chilca100% - Cannabis75%Chilca25%</i>	-39.737	8.741	-4.546	0.00164 **
<i>Diclofenaco - Cannabis75%Chilca25%</i>	-47.752	8.741	-5.463	< 0.001 ***
<i>Diclofenaco - Chilca100%</i>	-8.016	8.741 -	0.917	0.96664

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anexo 11

Test de Anova comparación múltiple tiempo 3

TEST	Multiple Comparisons of Means: Tukey Contrasts			
Supuesto	Pr(> t) en tiempo 3 (5 horas después de aplicado el tratamiento)			
	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
<i>Cannabis100% - Blanco</i>	16.289	8.124	2.005	0.43355
<i>Cannabis25%Chilca75%-Blanco</i>	28.549	8.124	3.514	0.02273 *
<i>Cannabis50%Chilca50% - Blanco</i>	32.259	8.124	3.971	0.00738 **
<i>Cannabis75%Chilca25% - Blanco</i>	45.937	8.124	5.655	< 0.001 ***
<i>Chilca100% - Blanco</i>	9.478	8.124	1.167	0.90065
<i>Diclofenaco – Blanco</i>	14.773	8.124	1.819	0.54736
<i>Cannabis25%Chilca75% - Cannabis100%</i>	12.260	8.124	1.509	0.73730
<i>Cannabis50%Chilca50% - Cannabis100%</i>	15.970	8.124	1.966	0.45715
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis100%</i>	29.648	8.124	3.650	0.01619 *
<i>Chilca100% - Cannabis100%</i>	-6.811	8.124	-0.838	0.97850
<i>Diclofenaco - Cannabis100%</i>	-1.516	8.124	-0.187	1.00000
<i>Cannabis50%Chilca50% - Cannabis25%Chilca75%</i>	3.710	8.124	0.457	0.99919
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis25%Chilca75%</i>	17.388	8.124	2.140	0.35789
<i>Chilca100% - Cannabis25%Chilca75%</i>	-19.070	8.124	-2.348	0.25801
<i>Diclofenaco - Cannabis25%Chilca75%</i>	-13.775	8.124	-1.696	0.62434
<i>Cannabis75%Chilca25% - Cannabis50%Chilca50%</i>	13.678	8.124	1.684	0.63180
<i>Chilca100% - Cannabis50%Chilca50%</i>	-22.781	8.124	-2.804	0.10955
<i>Diclofenaco - Cannabis50%Chilca50%</i>	-17.486	8.124	-2.152	0.35148
<i>Chilca100% - Cannabis75%Chilca25%</i>	-36.459	8.124	-4.488	0.00176 **
<i>Diclofenaco - Cannabis75%Chilca25%</i>	-31.164	8.124	-3.836	0.01022 *
<i>Diclofenaco - Chilca100%</i>	5.295	8.124	0.652	0.99419

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Anexo 12

Regresión lineal tiempo 1

TEST	Regresión lineal	
Valores estimados del valor de desinflamación en el tiempo 1 – una hora después de aplicado el tratamiento.		
Tratamiento	Valor estimado	Pr(> t)
Cannabis 100%	15.049	0.195654
Cannabis25%Chilca75%	40.639	0.001279 **
Cannabis50%Chilca50%	45.431	0.000418 ***
Cannabis75%Chilca25%	67.366	0.00000218 ***
Chilca100%	37.461	0.002640 **
Diclofenaco	18.778	0.10925
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1		

Anexo 13

Regresión lineal tiempo 2

TEST	Regresión lineal	
Valores estimados del valor de desinflamación en el tiempo 2 – tres horas después de aplicado el tratamiento.		
	Valor estimado	Pr(> t)
<i>Cannabis 100%</i>	41.844	0.00004966145 ***
<i>Cannabis25%Chilca75%</i>	62.437	0.00000008991 ***
<i>Cannabis50%Chilca50%</i>	63.709	0.00000006188 ***
<i>Cannabis75%Chilca25%</i>	73.187	0.00000000416 ***
<i>Chilca100%</i>	33.450	0.000667 ***
<i>Diclofenaco</i>	25.434	0.007015 **
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1		

Anexo 14

Regresión lineal tiempo 3

TEST	Regresión lineal	
Valores estimados del valor de desinflamación en el tiempo 3 – cinco horas después de aplicado el tratamiento.		
	Valor estimado	Pr(> t)
<i>Cannabis 100%</i>	16.289	0.054705
<i>Cannabis25%Chilca75%</i>	28.549	0.001519 **
<i>Cannabis50%Chilca50%</i>	32.259	0.000454 ***
<i>Cannabis75%Chilca25%</i>	45.937	0.00000465 ***
<i>Chilca100%</i>	9.478	0.253159
<i>Diclofenaco</i>	14.773	0.079693
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1		