



**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL
DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

Evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico
de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' en cerebros
y cerebelos de ratas albinas cepa Holtzman

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Presentada por

Br. Fortuna García, Edgar Fernando

Asesora

Dra. Juana Elvira Chávez Flores

Lima-Perú

2013



DEDICATORIA

Esta tesis la dedico con gran amor en memoria de mi amada madre Estelita, por el inmenso cariño que me dio.

Madre, siempre te recuerdo, nunca te olvidaré.

A mi querido padre Emiliano, por lo maravilloso que es y por ser mi ejemplo de vida.

A mis queridos hermanos Marcial, Nelly, Olga, Norma y Amanda, y a mis sobrinos, por formar parte importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, por haberme protegido en todo instante y por proveerme de ricas bendiciones. Frente a las adversidades, nunca me abandonó.

A mis padres, por la buena educación que me dieron gracias a sus principios cristianos; y a mis hermanos, por su apoyo incondicional desde mis inicios, sus palabras de vida a lo largo de mi formación profesional y el inmenso cariño que me tienen.

A la doctora Juana Chávez Flores, una dama que ama enseñar, quien con su amplia experiencia en la investigación y, con la sencillez que le caracteriza, me brindó el asesoramiento de la presente publicación.

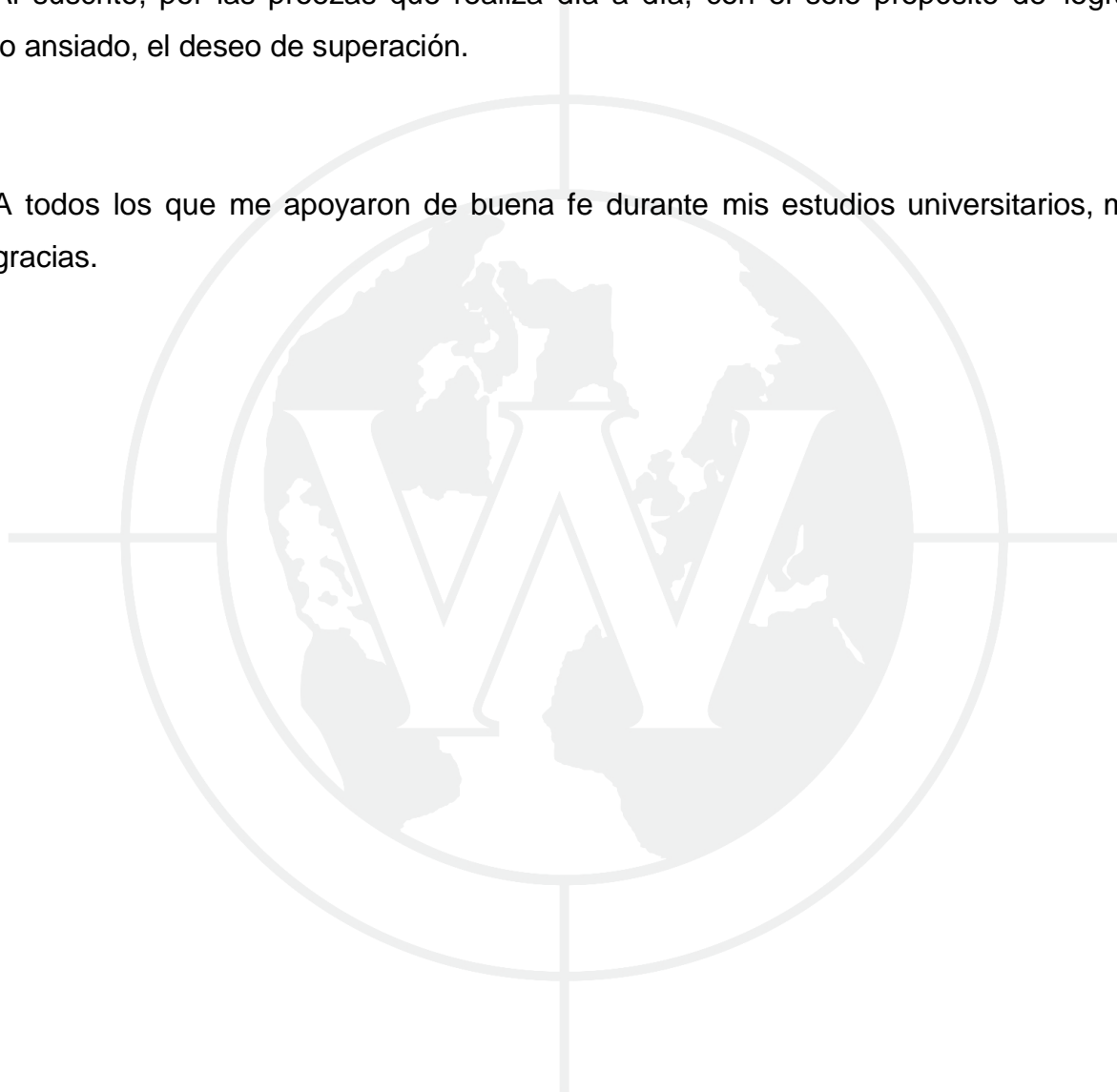
Al doctor anatomopatólogo Ernesto Raez Gonzales, por su valiosa participación y por ayudarme de buena voluntad con los análisis anatomopatológicos y con la interpretación de los resultados de las muestras.

Al ingeniero José Luis Vásquez Huaytalla, por su aporte en el análisis y en la interpretación de los resultados estadísticos.

A la gloriosa Marina de Guerra del Perú, por ser el pilar para culminar mi carrera profesional y fortalecer mi experiencia laboral.

Al suscrito, por las proezas que realiza día a día, con el solo propósito de lograr lo ansiado, el deseo de superación.

A todos los que me apoyaron de buena fe durante mis estudios universitarios, mil gracias.



ÍNDICE

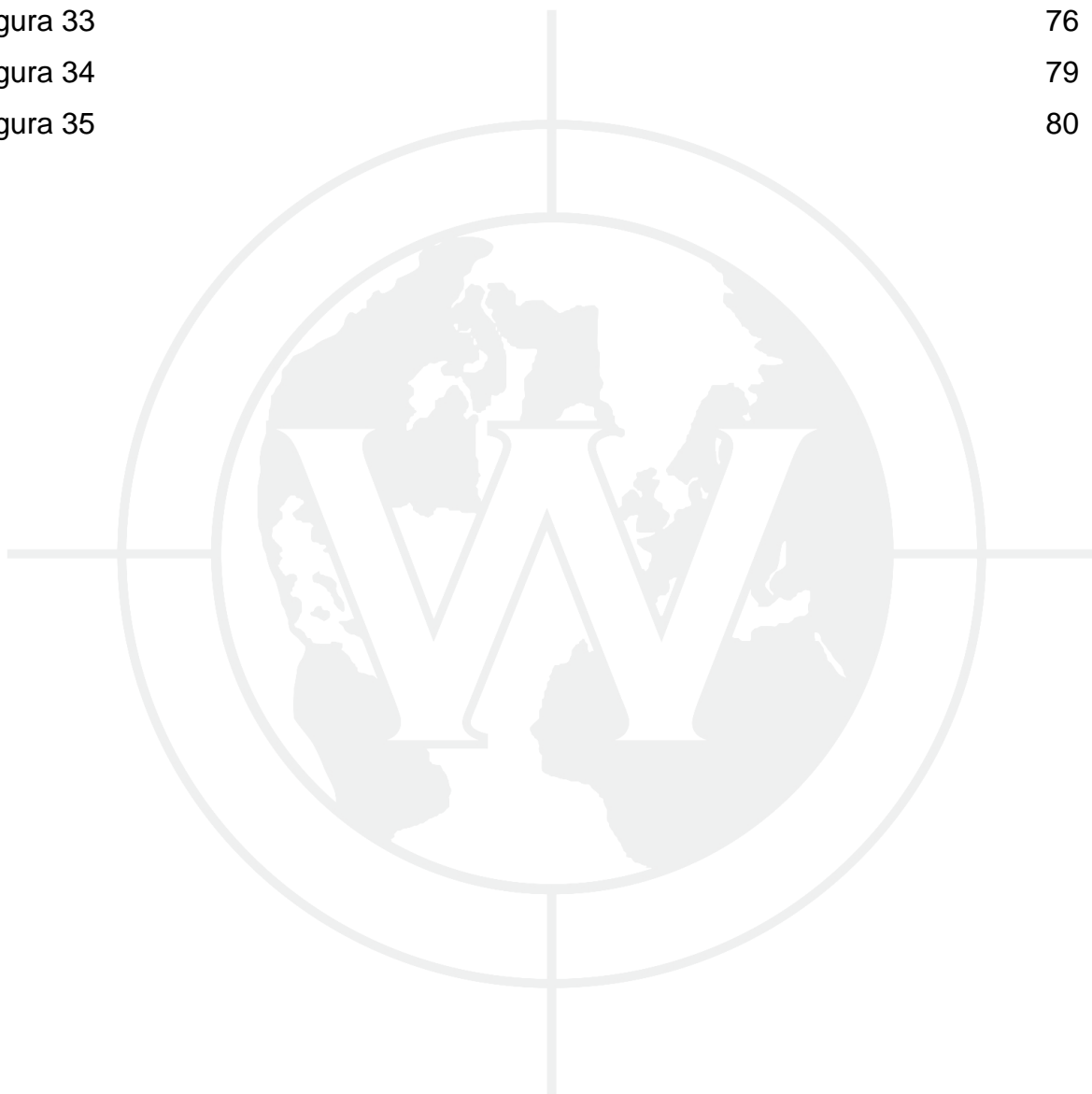
Pág.		
	I. Introducción	16
	II. Generalidades	17
	2.1. Antecedentes	17
	2.2. Estudio botánico de la especie vegetal <i>Mutisia acuminata</i> R. & P. 'chinchilcuma'	18
	2.2.1. Familia <i>Asteraceae</i>	18
	2.2.2. Género <i>Mutisia</i>	18
	2.2.3. Especie vegetal <i>Mutisia acuminata</i> R. & P.	20
	2.2.4. Nombre común, vulgar, vernacular, trivial o popular	20
	2.2.5. Descripción botánica	21
	2.2.6. Ubicación sistemática de la especie vegetal en estudio	22
	2.2.7. Hábitat y distribución	22
	2.3. Etnofarmacología	23
	2.4. Aspectos farmacológicos	25
	2.5. Aspectos toxicológicos	25
	2.6. Toxicidad	25
	2.6.1. Parámetros que se utilizan para determinar la toxicidad	26
	2.6.2. Neurotoxicidad	28
	2.7. Aspectos relacionados con la anatomía del cerebro de ratas	28
	2.8. Análisis histopatológico	29
	III. Materiales y métodos	30
	3.1. Materiales utilizados	30
	3.2. Métodos	32

IV. Parte experimental	33
4.1. Información etnofarmacológica (recopilación de datos existentes)	33
4.2. Estudio fitoquímico	33
4.3. Estudio toxicológico	35
V. Resultados	51
5.1. Análisis fitoquímico	51
5.2. Estudio toxicológico	53
VI. Discusión	84
VII. Conclusiones y recomendaciones	87
7.1. Conclusiones	87
7.2. Recomendaciones	88
Referencias bibliográficas	89
Anexos	94

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	21
Figura 2	29
Figura 3	34
Figura 4	36
Figura 5	37
Figura 6	40
Figura 7	41
Figura 8	43
Figura 9	44
Figura 10	45
Figura 11	46
Figura 12	51
Figura 13	54
Figura 14	57
Figura 15	59
Figura 16	62
Figura 17	64
Figura 18	65
Figura 19	66
Figura 20	66
Figura 21	67
Figura 22	67
Figura 23	68
Figura 24	68
Figura 25	71
Figura 26	72
Figura 27	73

Figura 28	74
Figura 29	74
Figura 30	75
Figura 31	75
Figura 32	76
Figura 33	76
Figura 34	79
Figura 35	80



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	19
Tabla 2	20
Tabla 3	22
Tabla 4	24
Tabla 5	26
Tabla 6	38
Tabla 7	39
Tabla 8	42
Tabla 9	52
Tabla 10	53
Tabla 11	55
Tabla 12	56
Tabla 13	58
Tabla 14	60
Tabla 15	61
Tabla 16	62
Tabla 17	63
Tabla 18	64
Tabla 19	69
Tabla 20	70
Tabla 21	77
Tabla 22	78
Tabla 23	82
Tabla 24	83

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1.	94
Anexo 2.	95
Anexo 3.	96
Anexo 4.	97

RESUMEN

La especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma', recolectada en la comunidad de Huaruccña (ubicada a 3200 m.s.n.m.), distrito de Coracora, provincia de Parinacochas, departamento de Ayacucho (Perú), fue llevada al Laboratorio de Farmacología de la Universidad Privada Norbert Wiener en el mes de junio de 2011, para la evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas frescas en ratas albinas cepa Holtzman. En el análisis fitoquímico se determinó la presencia de ocho metabolitos. Para la prueba de letalidad (5000 mg/kg, DL₅₀) se administró a 20 ratas vía intragástrica y, en dosis única, diferentes volúmenes del extracto, según su peso corporal. A cuatro ratas solo se les administró agua destilada. Los animales de experimentación permanecieron en observación por 14 días, al término de los cuales no se detectó signos de toxicidad ni alteración de la curva de crecimiento de la especie ni muerte de ningún animal. El día 15 se realizó la eutanasia y se extirpó los órganos encefálicos para realizar los análisis anatomopatológicos de los tejidos de cerebros y cerebelos. No se hallaron lesiones macroscópicas. En las observaciones microscópicas se encontraron edemas leves, moderados y severos; congestiones, leve en una rata hembra y fuerte en una rata macho. Según el sistema global armonizado (SGA), el extracto hidroalcohólico de la especie botánica evaluada a 5000 mg/kg es "prácticamente no tóxica".

Palabras claves: *Mutisia acuminata* R. & P.; toxicidad aguda; dosis letal media (DL₅₀); análisis anatomopatológico.

ABSTRACT

The plant species *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' collected in Huaruccña community (situated in Coracora city, the capital of the province Parinacochas in the region Ayacucho-Peru), located at 3200 m.a.s.l was brought to the pharmacology laboratory of the Norbert Wiener University in June 2011, to evaluate the high toxicity of the hydroalcoholic extract from fresh leaves at the Holtzman strain albino rats. The phytochemical analysis indicated the presence of eight metabolites. To lethality test (5000 mg/Kg, LD50), 20 rats were given, via intragastric and in a single dose, different volumes of the extract according to body weight, and 4 rats were only given distilled water; these experimental animals, remained for 14 days for observation, at the end of which, no toxicity signs were detected, neither altering the growth curve of the species nor the death of any animal. The 15th day, the euthanasia was practiced and the encephalic organs were removed to analyze the brain and cerebellum tissues anatomopathologically. No macroscopic lesions were found. In microscopic observations mild, moderate and severe edema were found; mild congestion in a female rat and severe in a male one. According to the Globally Harmonized System (GHS), the hydroalcoholic extract of the botanical species tested at 5000 mg/Kg is "practically non-toxic".

Keywords: *Mutisia acuminata* R. & P., high toxicity, median lethal dose (LD50), anatomopathologic analysis.

ABREVIATURAS

Am	Amazonas.
An	Áncash.
a. C.	Antes de Cristo.
Ap	Apurímac.
Ar	Arequipa.
Ay	Ayacucho.
Ca	Cajamarca.
cm	Centímetros.
NaCl	Cloruro de sodio.
CL₅₀	Concentración letal media.
Cu	Cusco.
C₆H₄(CH₃)₂	Dimetilbenceno o xileno.
DL₅₀	Dosis letal media.
ETA	Estimaciones de toxicidad aguda.
HCHO	Formaldehído.
Na₂HPO₄	Fosfato dibásico de sodio.
NaH₂PO₄·H₂O	Fosfato monobásico de sodio.
°C	Grados centígrados.
g	Gramos.
GE	Grupo experimental.
GC	Grupo control.
G1	Grupo 1 (ratas hembras del grupo experimental).
G2	Grupo 2 (ratas machos del grupo experimental).
G3	Grupo 3 (ratas hembras del grupo control).

G4	Grupo 4 (ratas machos del grupo control).
H&E	Hematoxilina y eosina.
H₀	Hipótesis nula.
H₁	Hipótesis alterna.
Hv	Huancavelica.
Hu	Huánuco.
Ju	Junín.
Kg	Kilogramos.
LL	La Libertad.
Li	Lima.
®	Marca registrada.
±	Más, menos.
m	Metros.
m.s. n. m.	Metros sobre el nivel del mar.
μ	Micras.
μm	Micrómetros.
mg/Kg	Miligramos por kilogramo.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros.
'	Minutos.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
OCDE/OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, sede en París.
Pa	Pasco.
w_i	Peso inicial.
w_s	Peso en el 7.º día.
w_f	Peso final.
p/v	Peso/volumen.
PVC	Pico de velocidad de crecimiento.

%	Porcentaje.
”	Pulgadas.
Pu	Puno.
RH_n	Rata hembra número.
RM_n	Rata macho número.
R. & P.	Hipólito Ruiz López y José Antonio Pavón y Jiménez.
Sin.	Sinonimia.
Ta	Tacna.
□	Variación.
var.	Variedad.
V.15	Versión 15.
v/v	Volumen/volume.
Et al	Y otros.

I. INTRODUCCIÓN

Los principios activos de las plantas medicinales usadas con fines terapéuticos pueden resultar nocivos para el organismo cuando se incrementa su concentración, ya sea bajo la creencia popular de mejorar la eficacia, por exceso de confianza, por desconocimiento o por descuido¹.

En la fase preclínica se estudian los efectos farmacológicos (eficacia) y la toxicidad de una sustancia en animales de experimentación, estableciéndose un índice terapéutico previo al estudio clínico².

La *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma', usada para diversas actividades terapéuticas por los pobladores de las zonas andinas del Perú, Bolivia, norte de Argentina y norte de Chile³, no cuenta con información científica que anticipe su riesgo ni garantice su seguridad. Basado en el numeral 22 y 23 de la directriz para los ensayos de productos químicos OCDE/OECD 423, método de clasificación de toxicidad aguda (ensayo límite, situaciones donde hay poca o ninguna información acerca de la toxicidad)⁴, se evaluó la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de dicha especie vegetal, administrando a ratas albinas cepa Holtzman una dosis oral de 5000 mg de extracto por kilogramo de peso corporal, por ser una de las pruebas preclínicas⁵.

Las manifestaciones clínicas agudas se muestran básicamente en tres ámbitos: irritación gastrointestinal, injuria hepática renal y trastornos neurológicos centrales¹; así, los órganos seleccionados para el análisis anatomopatológico fueron cerebros y cerebelos de ratas, porque son órganos vulnerables a lesiones frente exposición de sustancias (encefalopatías tóxicas)⁶; además, son los únicos órganos que controlan las capacidades cognitivas, ya que, si sufren daños, no existe dispositivo alguno que pueda suplir sus funciones⁷.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de la referida especie vegetal. Para ello se usó el método diseñado por John William Trevan: estimaciones de toxicidad aguda (ETA), en función de la dosis límite o prueba de letalidad de la sustancia (DL₅₀)⁸.

II. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes

A continuación se detallan algunos antecedentes de toxicidad por el mal uso de las plantas medicinales:

En Trujillo (Perú), entre enero y mayo de 1995, tres personas acudieron por emergencia al hospital Belén al habers intoxicado con agua de *Lupinus mutabilis* 'chocho'. Los pacientes refirieron haber ingerido 250 cc para afecciones hepáticas, 150 cc sin precisión del motivo del uso y 2 litros de enema para curar la vergüenza, y presentaban visión borrosa, midriasis, sequedad de boca e intranquilidad en el primer y en el segundo caso, y cuadro de íleo paralítico en el tercero⁹.

En La Paz (Bolivia), en el mes de junio de 2007, se reportó el caso de un lactante de nueve meses que había sido internado en el Hospital Materno Infantil, al habersele dado de beber durante el día cerca de 2 litros de infusión de *Illicium verum* 'anís estrellado', con el fin de aliviar un cuadro característico de cólico intestinal. En pocas horas presentó rechazo de alimentos, hemorragia digestiva alta, irritabilidad, disnea, oliguria y crisis convulsiva tonicoclónica generalizada (epilepsia)¹⁰.

En Chile, el *Cestrun parqui* 'parqui', usado en especial como febrífugo, produce lesiones hepáticas y renales, según estudios de toxicidad con extractos crudos. Posee una DL₅₀ de 4,3 mg/kg en ratas. Los extractos metanólicos causan lesiones pulmonares en ovejas. A pesar de su alta toxicidad, se sigue usando¹¹. Pese a su amplio uso como planta medicinal, los antecedentes de toxicidad de la *Mutisia acuminata* R. & P. son muy escasos. El texto *Ciencia indígena de los Andes del norte de Chile* refiere que la chinchirkoma de quebrada es medicinal, mientras que la del cerro no lo es¹².

2.2. Estudio botánico de la especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma'

2.2.1. Familia *Asteraceae* (asteráceas)

Reconocidas por Teofrasto 300 años a. C., y nombrada como *Compositae* (compuestas) por Giseke en 1792, comprenden más de 1700 géneros y 24 000-30 000 especies, desde hierbas de 1 centímetro hasta árboles de más de 30 metros. Se distribuyen desde las regiones polares hasta los trópicos. Integran hasta el 10 % de la flora. Se reconocen por su estructura reproductiva (angiospermas). Su nombre deriva de *aster* (estrella), por su inflorescencia¹³.

2.2.2. Género *Mutisia*

En el año 1773, el líder de la Real Expedición Botánica de la Nueva Granada, médico, botánico, sacerdote, matemático y astrónomo español, José Celestino Mutis Bassio, envió al célebre sueco, científico, naturalista, botánico y zoólogo Carlos Linneo una riqueza de plantas raras para su estudio; este, encandilado de tanta belleza, cogió un ejemplar de la familia *Compositae*, completamente atípica y, con el objeto de perpetuar al sabio Mutis, nombró al género *Mutisia* (se trataba de la especie *Mutisia clematis* 'clavellino', planta ícono de dicha expedición)¹⁴.

El género *Mutisia* apareció mencionado en la sexta edición de *Genera plantarum* de Linneo, edición de 1781; descrito por Carlos Linneo “el Joven” en su libro *Supplementum Plantarum Systematis Vegetabilium* en 1782¹⁵. Es un género de plantas con flores perteneciente a la familia *Asteraceae*. Comprende 155 especies descritas y 55 aceptadas. Cuenta con más de 60 especies andinas, la mayoría se encuentra en el Perú, Bolivia, Chile y Argentina. La flora peruana posee 15 especies, seis de las cuales son endémicas (tabla 1)¹⁶.

Tabla 1. Especies vegetales y variedades peruanas del género <i>Mutisia</i> ^{3,17} .	
1)	– <i>Mutisia acuminata</i> R. & P. var. <i>acuminata</i> Cabrera. Sin. <i>Mutisia peduncularis</i> Cavanilles, <i>Mutisia viciaefolia</i> Cavanilles (An, Hu, Ju, Li) – <i>Mutisia acuminata</i> var. <i>bicolor</i> Cabrera (Ap, Ar, Ay, Ta) – <i>Mutisia acuminata</i> var. <i>hirsuta</i> (Meyen) Cabrera. Sin. <i>Mutisia hirsuta</i> Meyen (Ap, Ar, Ay, Ca, Hv, Cu, Ju)
2)	<i>Mutisia alata</i> Hieronymus (Ca)
3)	<i>Mutisia andersonii</i> Sodiro ex Hieronymus (Hv, Li)
4)	<i>Mutisia arequipensis</i> Cabrera (Ar, Hv) *
5)	<i>Mutisia cochabambensis</i> Hieronymus (Ap, Cu, Ta)
6)	<i>Mutisia hastata</i> Cavanilles (An, Hu, Hv, Li)
7)	<i>Mutisia lanata</i> R. & P. (Cu, Hu, Hv, Ju, Pa, Pu)
8)	<i>Mutisia lanigera</i> Weddell (Ar, Pu)
9)	<i>Mutisia ledifolia</i> Decaisne ex Weddell (Pu)
10)	– <i>Mutisia mathewsii</i> Hooker & Arnott var. <i>anomala</i> Cabrera (Ay, Li) * – <i>Mutisia mathewsii</i> Hooker & Arnott var. <i>mathewsii</i> . Sin. <i>Mutisia weberbaueri</i> Hieronymus (An, Ay, Ju, Li)
11)	<i>Mutisia orbignyana</i> Weddell (Ar, Pu)
12)	<i>Mutisia pulcherrima</i> Muschler. Sin. <i>Mutisia macrantha</i> Muschler (Am, Ca, Pa) *
13)	<i>Mutisia rauhii</i> Ferreyra (Cu) *
14)	<i>Mutisia venusta</i> S. F. Blake (Am, Ap, Cu) *
15)	<i>Mutisia wurdackii</i> Cabrera (Am) *.

* Endémicas.

2.2.3. Especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P.

La *Mutisia acuminata* R. & P. es una especie vegetal descrita y nombrada por los miembros de la Real Expedición Botánica a los territorios del Perú y Chile, Hipólito Ruiz López y José Antonio Pavón y Jiménez. La descripción se encuentra en la publicación *Flora Peruviana et Chilensis*, tomo I, 1798¹⁸. Actualmente, está registrada y aceptada en el *The plant list*, con la colaboración del Royal Botanic Gardens, Kew y del Missouri Botanical Garden, Estados Unidos¹⁹.

2.2.4. Nombre común, vulgar, vernacular, trivial o popular

La especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma', según la ubicación geográfica donde se desarrolle, es conocida por los pobladores con diversos nombres (tabla 2).

Tabla 2. Nombres comunes de la especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. "chinchilcuma".

"Chinchilpu", Lucana (Ayacucho); "chinchir", "chinchirku" (Arequipa)²⁰; "chinchimarqui", "chinchelmano", Ocos, "tinterma", Chiquián, "tintilma" Huasta, Bolognesi, (Ancash); "chechecta", Yauyos, "chinchimani", Escomarca, "cinchis", "huariruma", Huarochirí (Lima)²¹; "chinchilcuma", "chincumpa", "chinchircuma"^{3,22}, "chiucumpa", "huincus", Tarma²³, "chinchilcoma", "mancapaqui", Valle del Mantaro (Junín)²⁴; "bejuco" (La Libertad, Cajamarca)²⁵, Perú; "chinchilkuma", "chin-chin puma"²⁶, "chinchircoma" (Cochabamba)²⁷, "chirchicoma" (Chuquisaca), Bolivia²⁸.

2.2.5. Descripción botánica

Mutisia acuminata R. & P. var. *acuminata* 'chinchilcuma' es un arbusto perenne²⁶, mide aproximadamente 1,5 metros de alto, ramificado, glabro. Hojas pinnaticompuestas de contorno oblongo de 6-7 centímetros de largo por 2-3 de ancho; foliolos de 12-15 pares, ápice agudo, base atenuada, borde entero, ambas superficies glabras. Capítulos solitarios terminales, pedunculados, radiados; corola rojiza, tubo de 5 centímetros de largo, flores del disco 15, corola tubulosa de 5 centímetros de largo, ápice pentadentado, estambres exertos. Fruto en aquenio cilíndrico de 18-20 milímetros de largo, papus cerdoso amarillento²⁰. Cromosoma N.º 27 (figura 1)³.



Figura 1. Especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. "chinchilcuma".

2.2.6. Ubicación sistemática de la especie vegetal en estudio

La especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' en estudio, recolectada de la comunidad de Huaruccña el 25 de junio de 2011, es un grupo de muestras que ya fueron identificadas, clasificadas y certificadas por el biólogo botánico Hamilton Wilmer Beltrán Santiago el 15 de agosto de 2006, proporcionadas desde mismo lugar de origen por la doctora Juana Elvira Chávez Flores (tabla 3, anexo 1)²⁹.

Tabla 3. Taxonomía o sistemática de la especie vegetal <i>Mutisia acuminata</i> R. & P. "chinchilcuma" ²⁹ .	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales o Campanuales
Familia	Asteraceae (asteráceas)
Género	<i>Mutisia</i>
Especie	<i>Mutisia acuminata</i> R. & P. ^{13,20}
Sinonimia	<i>Mutisia peduncularis</i> Cavanilles, <i>Mutisia viciaefolia</i> Cavanilles ^{3,17}

2.2.7. Hábitat y distribución

Mutisia acuminata R. & P. es una planta originaria del Perú, propia de la región Quechua. Crece en estado silvestre, en zonas frías y templadas³⁰, en laderas de cerros, suelos arenosos, pedregosos o arcillosos, en cauces secos, en bordes de caminos o de carreteras²⁰. Florece de mayo a agosto.

Los diversos nombres vernaculares que recibe indican que es una planta empleada en muchos lugares. Se distribuye en las zonas andinas, en los valles interandinos y occidentales del sur y del centro del Perú (Arequipa, Áncash, Cajamarca, Huánuco, Junín, La Libertad y Lima). Es conocida en toda la cordillera de los Andes, desde el norte del Perú y de Bolivia hasta el norte de Argentina y Chile. Se encuentra entre 1000-4000 m.s.n.m.^{3,20,21,25,26}.

2.3. Etnofarmacología

La especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. es utilizada con diferentes fines terapéuticos (tabla 4).

Tabla 4. Etnofarmacología de la especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. "chinchilcuma".

ACTIVIDAD TERAPÉUTICA	PARTE UTILIZADA	MODO DE APLICACIÓN Y USO MEDICINAL
Antiinflamatorio	Hojas y flores	Tomar infusión de hojas y darse un baño ²⁰ . Hacer cataplasma de flores y hojas previamente calentados.
Antirreumático	Hojas y ramas	El agua de la cocción se bebe para curar o aliviar los dolores reumáticos ²⁵ .
Analgésico	Hojas, ramas y terminal de la planta (cogollo)	En cefaleas lavarse la cabeza con el cocimiento ²⁶ , frotar las hojas, oler y colocar una rama en la cabeza; para el dolor de muelas, colocar el cogollo en la muela adolorida.
Antiinflamatorio tópico	Hojas	Aplicación externa y local bajo la forma de hidrogel (elaborado del extracto etanólico de hojas deshidratadas) ³¹ .
Bronquitis, tos y resfríos	Hojas y flores	Tomar el cocimiento de las hojas y flores ²⁶ . Es una planta cálida porque hace transpirar y sirve para curar resfriados. ²⁷
Puerperio	Hojas	En infusión para expulsar los restos en complicaciones post parto (sobrepartos) ^{27,32} .
Antiespasmódico abdominal	Ramas	Para el dolor de estómago beber en infusión y también frotarse con estas el vientre.
Neumonía	Flores	Hervir las flores con cerveza negra y jugo de naranja. Tomar 3 veces al día.
Mal aire	Hojas	Para el mal aire (cefaleas e irritación ocular), calentar las hojas y frotarse el cuerpo.
Mal de corazón	Hojas	Para el mal de corazón ²⁰ (dolor insoportable y muerte), tomar en infusión.
Cicatrizante:	Hojas y ramas tiemas	Moler formando una pasta suave. Lavar las heridas con el cocimiento ²⁶ . Aplicar en las heridas en forma de emplasto y vendarla.
Antiulceroso	Hojas	El jugo fresco de las hojas es usado en úlceras gástricas.
Antitumoral	Hojas y ramas	Para tumores internos, se bebe en ayunas por las mañanas, 2 cucharadas de zumo fresco (sustancia que se saca mojando y exprimiendo las hojas).
Antipirético	Hojas frescas	Para la fiebre aftosa de las vacas, molerla y dar de beber el zumo ²⁰ .
Bebida	Hojas frescas	Se toma como emoliente ²¹ .

2.4. Aspectos farmacológicos

Las sustancias folclóricas son definidas por la OMS como “sustancias terapéuticas complementarias a la medicina tradicional (sometidas a controles sanitarios), útiles para aliviar dolencias”. Cerca de dos tercios de la población las utiliza, lo que puede conducir a graves intoxicaciones³³.

En la farmacología preclínica se realizan estudios *in vitro* o *in vivo* con animales de experimentación, con el fin de obtener información farmacológica y toxicológica de sustancias⁸. En la investigación experimental realizada se buscó, principalmente, determinar los posibles efectos tóxicos de la especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. ‘chinchilcuma’.

2.5. Aspectos toxicológicos

Ciertos componentes de hongos, plantas y hierbas medicinales pueden lograr consecuencias nocivas o tóxicas sobre el organismo¹. Una sustancia terapéutica causa mejoría del estado patológico, hasta cierta concentración, pero, pasado ese límite, se convierte en tóxico³⁴.

2.6. Toxicidad

Grado en el que una sustancia exógena interactúa con moléculas endógenas del organismo, causando síntomas derivados de un tratamiento o cambios temporales o permanentes de los tejidos. La potencialidad tóxica de una sustancia es mayor cuanto menor sea la dosis para producir un efecto nocivo³⁵. Para estimar el peligro potencial de un agente químico, se emplean animales de experimentación expuestos a dosis únicas (toxicidad aguda) o a dosis repetidas (toxicidad subaguda, subcrónica y crónica)⁸.

Los datos toxicológicos pueden ser los siguientes: mortalidad, incidencia de signos tóxicos, peso corporal y consumo de alimento. Los daños fisiológicos pueden ser reversibles o irreversibles³⁶.

2.6.1. Parámetros que se utilizan para determinar la toxicidad

Toxicidad aguda

Aparición de severos efectos adversos, signos, síntomas y efectos tóxicos que se manifiestan en segundos, minutos, horas o días (14 días máximo), tras la administración por vía oral o cutánea de una dosis elevada de sustancia, dosis múltiples administradas a lo largo de 24 horas (DL_{50}) o inhalación durante cuatro horas (CL_{50}). Se expresa en función a la DL_{50} y puede manifestarse como desde una simple irritación o causar la muerte (ver tabla 5)^{8,34,35}.

Tabla 5. Escala de rangos, potencias o estimaciones de toxicidad aguda (ETA) en función a la DL_{50} de la sustancia diseñado por John William Trevan^{8,34,35,37}.

RANGO	DENOMINACIÓN DE LA TOXICIDAD	DL_{50} RATA, VÍA ORAL, DOSIS ÚNICA	
		mg/Kg	g/Kg
1.	Extremadamente tóxico	< 1	
2.	Altamente tóxico	1 – 50	
3.	Moderadamente tóxico	50 – 500	
4.	Ligeramente tóxico	500 – 5000	0,5 – 5
5.	Prácticamente no tóxico	5000 – 15 000	5 – 15
6.	Relativamente inocuo	> 15 000	> 15

Toxicidad crónica

Presencia de síntomas clínicos, durante largo tiempo, que pueden durar unos días o un año o más, tras exposiciones repetidas a una sustancia potencialmente tóxica^{8,34,37}.

Dosis mortal media o dosis letal media (DL₅₀)

Dosis de sustancia que produce la muerte al 50 % de animales de experimentación. Una población mínima de 10 ejemplares permite determinar su potencial tóxico. En la DL₅₀ se consideran siempre los efectos observados (signos, síntomas de toxicidad, efectos tóxicos y hallazgos patológicos). Los animales son observados por 14 días después de la administración de la sustancia, y son sacrificados y autopsiados al término de este período, para verificar efectos locales de órganos, por examen macro- y microscópico. Se expresa en miligramos de tóxico por kilogramos de peso corporal del animal (mg/kg). También se le llama dosis media aguda oral (DL₅₀ aguda oral)^{8,34,35}.

Efectos adversos

Disminución de los niveles normales de las funciones anatómicas (fisiología) del individuo.

Efectos tóxicos

Alteración del equilibrio fisiológico como una “exageración del efecto terapéutico” (los cardiotónicos digitálicos pueden producir un paro cardíaco) o un “efecto distinto del terapéutico” (los antibióticos aminoglucósidos tienen efectos neurotóxicos y nefrotóxicos por mecanismos distintos a los de su actividad). Los efectos tóxicos solo deben aparecer en el ámbito experimental y nunca en el uso clínico normal³⁸. Pueden ser de los siguientes tipos:

Reversible.

Aquel cuyo efecto inicial desaparece después de un corto tiempo, luego de la eliminación del tóxico.

Irreversible

No desaparece con el tiempo. El daño persiste aun cuando el tóxico desaparezca^{34,36}.

Dosis o nivel sin efecto observable (NISEO)

Máxima cantidad de sustancia administrada³⁴, en la que las consecuencias de una o de repetidas exposiciones no se manifiestan o solo lo hacen después de cierto tiempo³⁵.

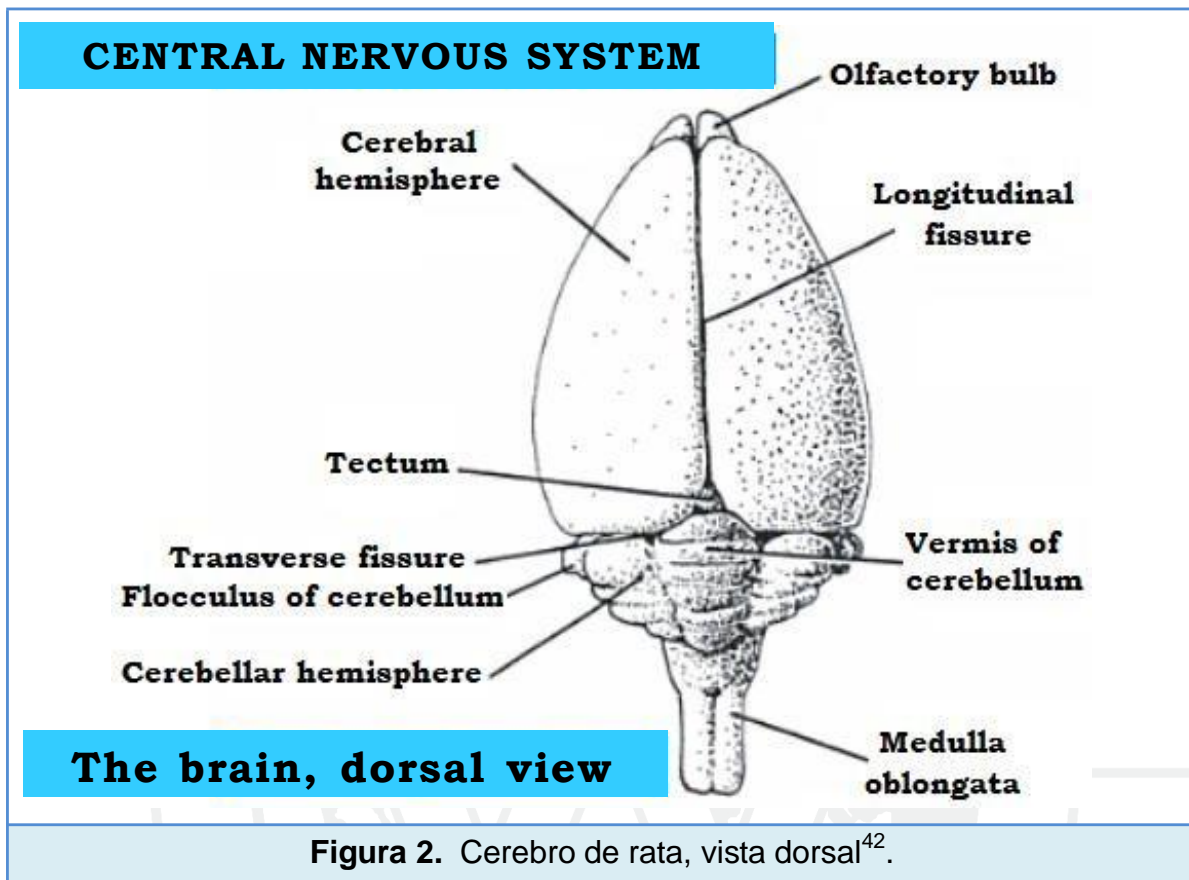
2.6.2. Neurotoxicidad

La neurotoxicología estudia los procesos tóxicos (neurotoxicidad) sobre el sistema nervioso, según su localización. Estos pueden afectar al cerebro o a la médula espinal (neurotoxicidad central), además de a raíces nerviosas, plexos o nervios (neurotoxicidad periférica).

Las neuronas pueden ser destruidas por lesión o por enfermedad, debido a la presencia de agentes tóxicos. La afectación puede ser reversible o irreversible, y las lesiones se pueden localizar en cuerpo neuronal, axón, neuroglia, sinapsis, músculo y vasos sanguíneos^{35,39}.

2.7. Aspectos relacionados con la anatomía del cerebro de ratas

Los cerebros y el comportamiento de los vertebrados no humanos se parecen a los de humanos en muchos aspectos de su química y anatomía; aunque el tamaño del cerebro varía entre especies, incluso los nervios de los invertebrados siguen los mismos principios básicos que los nuestros⁴⁰. La rata blanca es el mamífero más empleado en experimentos⁴¹, y es la especie de elección para los estudios de toxicidad aguda³⁵. El cerebro de la rata es similar al de otros vertebrados. Consta de tres regiones principales: el cerebro anterior o prosencéfalo, el cerebro medio o mesencéfalo y el cerebro posterior o rombencéfalo. Su peso aproximado es 2 gramos, y representa el 2 % de su peso corporal (ver figura 2)⁴².



2.8. Análisis histopatológico

Al producirse una lesión cerebral o al ser estimulada una región del cerebro, se debe verificar la localización precisa del daño cerebral. Para esto, es preciso observar con el microscopio, aplicando métodos histológicos^{43,44,45}.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales utilizados

3.1.1. Material botánico o especie vegetal

Hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma'.

3.1.2. Material biológico⁸, sustrato biológico o especie animal³⁵

Especie de elección: 24 ratas albinas cepa Holtzman.
 Sexo: 12 ratas hembras y 12 ratas machos.
 Edad: 90 días de vida, aproximadamente.

3.1.3. Materiales básicos de laboratorio químico (materiales de vidrio)

Frasco de vidrio 5 L	01 unid.
Vasos de precipitados de vidrio marca Pirex® de 100 mL	02 unid.
Vasos de precipitados de vidrio marca Pirex® de 250 mL	02 unid.
Vaso de precipitados de vidrio marca Pirex® de 1000 mL	01 unid.
Pipetas de 5 mL marca Pirex®	02 unid.
Embudo de vidrio marca Pirex®	01 unid.
Agitador de vidrio	01 unid.
Tubos de ensayo Pirex®	15 unid.
Láminas portaobjetos 25 mm x 75 mm con sus respectivas laminillas cubreobjetos 22 mm x 30 mm marca TB	25 unid.

3.1.4. Equipos e instrumentos

Rotavapor marca Buchi ® modelo R-210	01 unid.
Estufa marca Memmert ®	01 unid.
Campana extractora marca Brema ®	01 unid.
Lámpara de luz UV 365 nm	01 unid.
Jaulas metálicas	02 unid.
Mesa de soporte para ratas	01 unid.
Balanza analítica digital marca Sartorius ®	01 unid.
Balanza para ratas marca Ohaus ®	01 unid.
Mesa de disección	01 unid.
Equipo de disección marca Stainless Steel ®	02 juegos
Micrótopo Leyca ®	01 unid.
Microscopio Nikon ®	01 unid.

3.1.5. Biomateriales médicos

Guantes de látex para examen talla M marca Alcimar Plus ®	50 pares
Mascarillas nasales descartables marca Steel Pro ®	25 unid.
Gorros descartables marca Novomed ®	25 unid.
Papel filtro	20 unid.
Gasas estéril marca Sandy ®	20 unid.
Sonda orogástrica N.º 18 estéril marca Medical ®	01 unid.
Contenedores pequeños descartables	30 unid.
Jeringas descartables de 5 mL	10 unid.
Agujas descartables N.º 23 x 1”	10 unid.
Hojas de bisturí descartable N.º 15	10 unid.
Papel toalla	02 rollos
Viruta esterilizada	01 saco
Cassette de inclusión con tapa	24 unid.

3.1.6. Compuestos químicos (solventes, reactivos, fijadores y tampones)

Etanol 70°	1 L
Etanol 96°	5 L
Formol-HCHO 40 % marca Erza®	1 L
Pentobarbital sódico 1 g, Halatal 50 mL, Sanivet ®	01 vial
Fosfato sódico monobásico- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100 g
Fosfato sódico dibásico- Na_2HPO_4	100 g
Cloruro de sodio- NaCl 0,9 % marca B. Braun ®	2 L
Colorante hematoxilina para histología	100 mL
Colorante eosina para histología	100 mL
Xilol (xileno o dimetilbenceno)- $\text{C}_6\text{H}_4(\text{CH}_3)_2$	1 L
Parafina	1 Kg
Adherente traslúcido marca Entellan ®	10 mL

3.2. Métodos

Bioensayo experimental⁸.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Información etnofarmacológica (recopilación de datos existentes)

La información etnofarmacológica de la *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' se efectuó mediante la recopilación de datos existentes, suministrados a través de las publicaciones y de los libros correspondientes a dicha especie vegetal (fuentes secundarias).

Las personas que habitan en los lugares donde se distribuye la *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' y que practican la medicina tradicional manifiestan haber aprendido de sus ancestros, y, por experiencia, refieren los usos con fines terapéuticos (tabla 4).

4.2. Estudio fitoquímico

4.2.1. Recolección y transporte de la especie vegetal

Se recolectaron 10 kilogramos de la especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' en el mes de junio de 2011, durante la época de invierno, en la comunidad altoandina de Huaruccña, ubicada a 3200 m s.n.m. en el distrito de Coracora, provincia Parinacochas, departamento de Ayacucho, Perú (figura 3). A la muestra recolectada se le roció alcohol de 96° para su conservación, y se envolvió con papel kraft, para que sean embaladas en cajas de cartón de 16" x 12" x 10" (largo x ancho x alto) debidamente rotuladas, y transportadas al Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener.

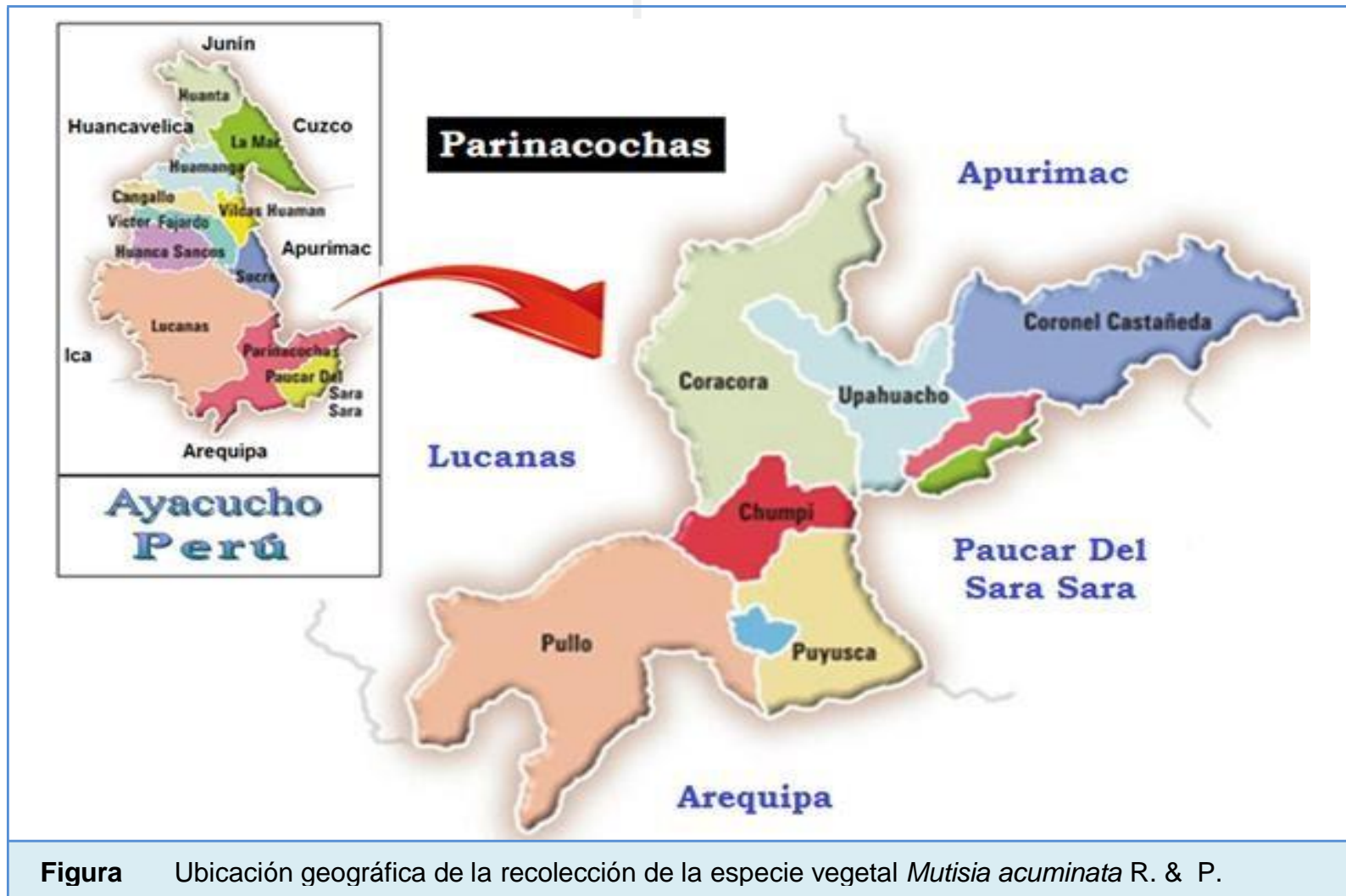


Figura Ubicación geográfica de la recolección de la especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P.

4.2.2. Preparación del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. ‘chinchilcuma’

Se pesaron 500 gramos de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. ‘chinchilcuma’ y se licuaron con 2 litros de solución hidroalcohólica (agua destilada-etanol 96°, 2:8 v/v), obteniéndose una masa verde, la cual fue introducida en un frasco de vidrio color ámbar con capacidad de 3 litros, que fue cerrado herméticamente, para su respectiva maceración por siete días⁴⁶, agitándola diariamente. Al término de este período, se filtró tres veces, con la finalidad de eliminar las impurezas, con lo que se obtuvo el extracto hidroalcohólico. Con la ayuda del rotavapor, se eliminó el disolvente (etanol) por evaporación a 1/4 de volumen (0,5 L); este extracto se llevó a la estufa, para su respectivo secado por siete días, a una temperatura de 40 a 36 °C. Finalmente, se obtuvo el extracto seco.

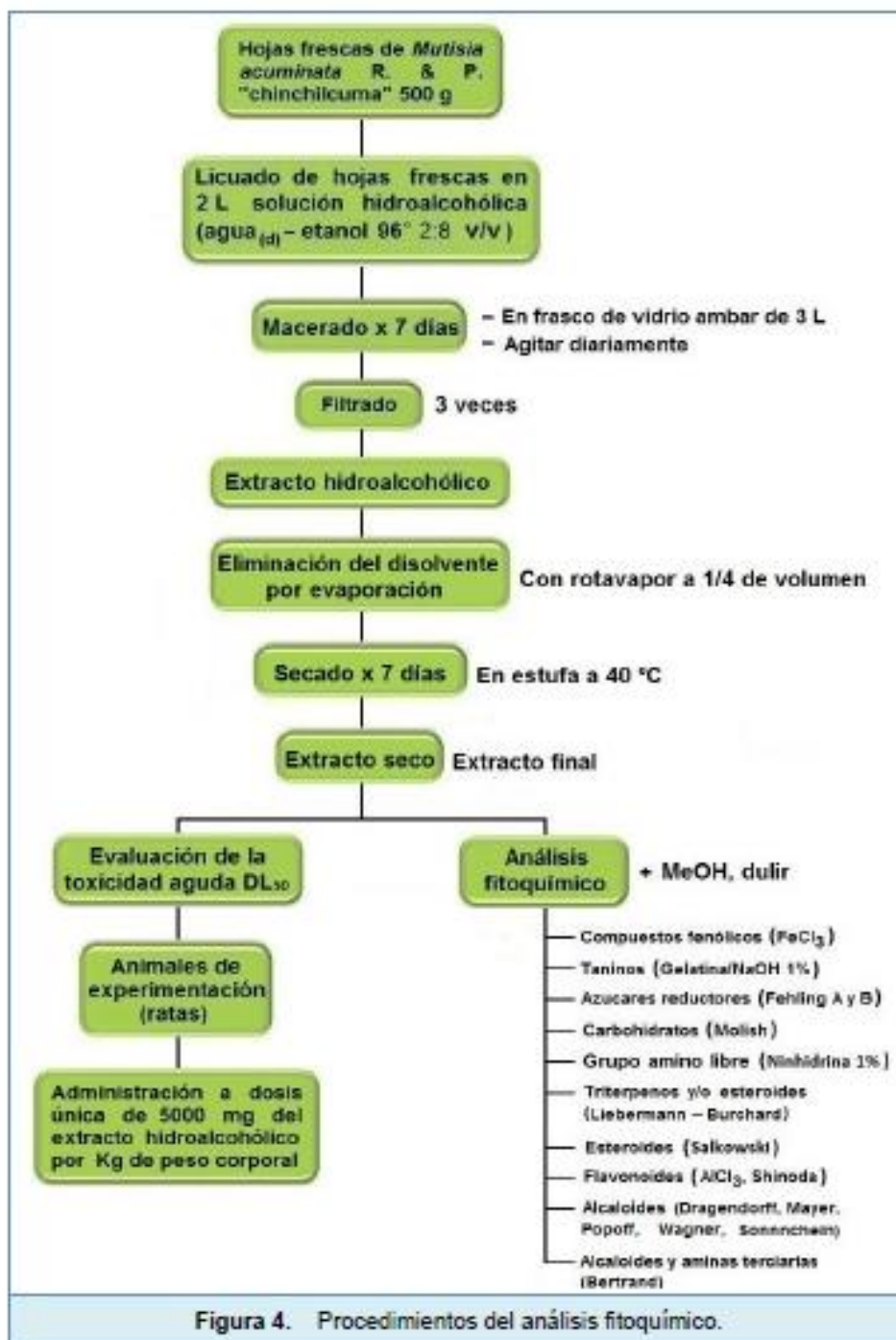
4.2.3. Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. ‘chinchilcuma’

Para la detección preliminar de los constituyentes químicos de la especie vegetal, se efectuó el análisis fitoquímico, basado en las pruebas de coloración y de precipitación^{47,48}. Se solubilizaron 20 mg de extracto seco en metanol, y se realizaron los ensayos para detectar los metabolitos primarios y secundarios (figura 4).

4.3. Estudio toxicológico

Los bioensayos experimentales para la evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. ‘chinchilcuma’ en cerebros y cerebelos de ratas se efectuaron siguiendo los procedimientos y las recomendaciones internacionales establecidas en el Manual de Técnicas y Métodos de Investigación en Nutrición Humana, Normas Éticas de la Unión Europea para la Experimentación del Animal⁴⁹, Guía para el Cuidado

y Uso de Animales de Laboratorio (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*)⁵⁰ y Directriz para los Ensayos de Productos Químicos OCDE/OECD 423, método de clasificación de toxicidad aguda - toxicidad oral (figura 5)⁴.



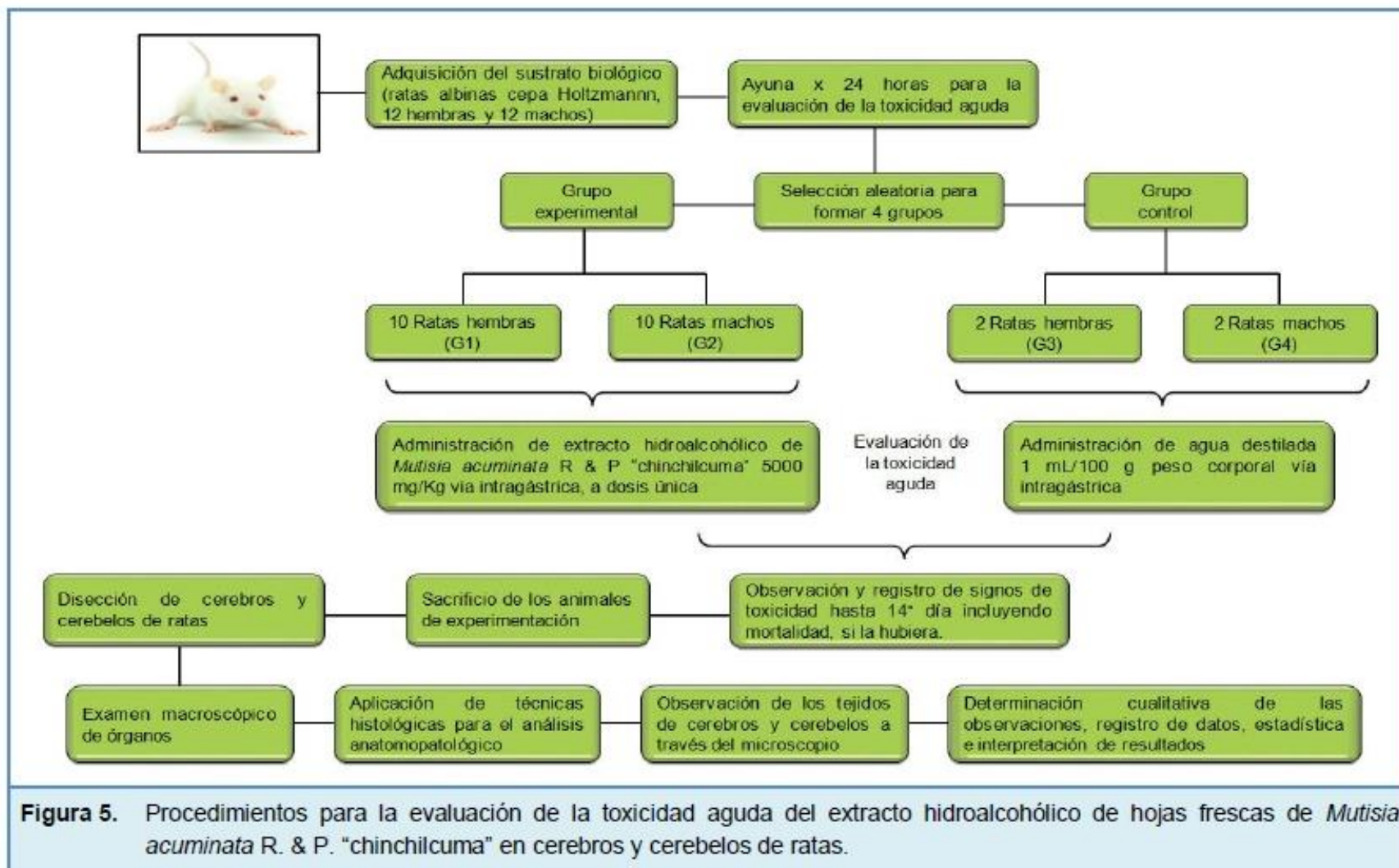


Figura 5. Procedimientos para la evaluación de la toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. "chinchilcuma" en cerebros y cerebelos de ratas.

4.3.1. Modelo del estudio toxicológico

Diseñado por John William Trevan (tabla 6)^{8,38,39,41}.

Tabla 6. Estimaciones de toxicidad aguda (ETA) en función a la dosis letal media (DL ₅₀) de la sustancia ^{8,34,35,37}				
TOXICIDAD	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	Nº ESPECIES ANIMALES	FRECUENCIA	DOSIS (DL ₅₀ mg/Kg)
Aguda	Intragástrica	24 ratas	Dosis única	5000

4.3.2. Acondicionamiento del material biológico

Las ratas albinas cepa Holtzman, con peso corporal promedio de 189,75 ± 24,95 gramos (ratas hembras) y 272,45 ± 36,05 gramos (ratas machos), con 90 días de vida, provenientes del bioterio del Centro de Control de Calidad del Medicamento del Ministerio de Salud de Chorrillos fueron albergadas y mantenidas, durante el período de estudio, en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener, en amplias jaulas metálicas de acero inoxidable, con 22 °C (± 3 °C) de temperatura ambiental. Las camas estuvieron preparadas con viruta esterilizada y cambiada cada 24 horas. Se mantuvieron a condiciones normales de fotoperiodicidad (cada 12 horas de luz/oscuridad), y con humedad relativa de 65 %^{49,50,51}.

4.3.3. Preparación de los sustratos biológicos para la evaluación

El total de ratas que se tomaron para la evaluación de la toxicidad aguda fue de 24, y estuvieron albergadas por sexo, una jaula para las ratas hembras y otra para las ratas machos, seleccionados en cuatro grupos: G1, G2, G3 y G4 (tabla 7).

Tabla 7. Selección aleatoria de los animales de experimentación para la evaluación de la toxicidad aguda.

GRUPO	JAULA 1 RATAS HEMBRAS	JAULA 2 RATAS MACHOS
a) Grupo experimental (GE)	10 ratas hembras (G1)	10 ratas machos (G2)
b) Grupo control (GC, sin tratamiento)	2 ratas hembras (G3)	2 ratas machos (G4)

Las ratas fueron pesadas y albergadas en sus respectivas jaulas, según el grupo correspondiente.

La ingesta alimenticia que se utilizó fue comida estándar para ratas (preparado Purina ®); y la bebida que se les proporcionó fue el líquido elemental básico (agua) a libre albedrío.

El aseo de las jaulas se efectuó diariamente, según las normas internacionales para los animales de experimentación^{49,50,51}.

Se mantuvo en observación a los animales por siete, días para su aclimatación, en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener.

Un día antes del experimento se las dejó en ayunas por 24 horas.

Con la ayuda de la sonda orogástrica N.º 18 estéril, se administraron vía intragástrica los volúmenes correspondientes a cada animal de experimentación. Ellos contenían el extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' (5000 mg/kg, dosificación considerada como dosis límite o prueba de letalidad^{8,35}), según su peso corporal, a razón de 300 mg/mL de concentración y en dosis única (figura 6, tabla 8).



Figura 6. Administración del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. “chinchilcuma” vía intragástrica a rata albina cepa Holtzman.

Después de la administración de la dosis única, los animales permanecieron en observación por 14 días, para la detección de señales clínicas de toxicidad, las cuales fueron anotadas en el formato de control para cada animal (anexo 2).

El primer, el séptimo y el día número 14 se efectuó el control de pesos corporales. Los datos fueron registrados en el respectivo formato de control (anexo 3).

El día 15 se trasladó a las ratas al Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Privada Norbert Wiener, para realizar la eutanasia (muerte sin sufrimiento físico), administrándoles pentobarbital sódico (Halatal ® 50 mL, Sanivet) a una dosis de 40 mg/Kg, por vía intraperitoneal.

4.3.4. Disección de órganos encefálicos

Se usó la técnica de disección del cerebro y del cerebelo descrita en el manual de clases prácticas de fisiología animal⁴¹. Para ello, se ubicó a las ratas una a una en la mesa de disección, con la cara dorsal hacia arriba, a fin de abrir la piel que cubre el cráneo.

Con el bisturí N.º 15 se efectuó una incisión transversal a la altura del occipucio, entre los pabellones auditivos, seguida de otra incisión longitudinal, desde el hocico hacia la parte occipital (figuras 7 y 8).



Tabla 8: Volúmenes de administración del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de Mutisia acuminata R. & P. "chinchilcuma" para cada rata albina cepa Holtzmann.

a) Volúmenes de administración para ratas hembras:

GRUPO	RH _n	(g)	$W_{I(RH)}$ (Kg)	x (mg)	v (mL)
GE (G1) (solución acuosa del extracto)	RH ₁	193,90	0,1939	969,50	3,2
	RH ₂	188,60	0,1886	943,00	3,1
	RH ₃	214,70	0,2147	1073,50	3,6
	RH ₄	164,80	0,1648	824,00	2,7
	RH ₅	179,30	0,1793	896,50	3,0
	RH ₆	183,80	0,1838	919,00	3,1
	RH ₇	196,00	0,1960	980,00	3,3
	RH ₈	194,30	0,1943	971,50	3,2
	RH ₉	214,60	0,2146	1073,00	3,6
	RH ₁₀	190,70	0,1907	953,50	3,2
TOTAL _{RHGE} :				9603,50	32,0
GC (G3) (agua destilada)	RH _{11GC}	193,30	0,1933	966,50	3,2
	RH _{12GC}	198,50	0,1985	992,50	3,3
TOTAL _{RHGC} :				1959,00	6,53

b) Volúmenes de administración para ratas machos:

GRUPO	RH _n	(g)	$W_{I(RM)}$ (Kg)	x (mg)	v (mL)
GE (G2) (solución acuosa del extracto)	RM ₁	279,40	0,2794	1397,00	4,7
	RM ₂	308,50	0,3085	1542,50	5,1
	RM ₃	242,10	0,2421	1210,50	4,0
	RM ₄	273,00	0,2730	1365,00	4,6
	RM ₅	262,10	0,2621	1310,50	4,4
	RM ₆	303,70	0,3037	1518,50	5,1
	RM ₇	306,50	0,3065	1532,50	5,1
	RM ₈	301,40	0,3014	1507,00	5,0
	RM ₉	251,30	0,2513	1256,50	4,2
	RM ₁₀	236,40	0,2364	1182,00	3,9
TOTAL _{RMGE} :				13 822,00	46,1
GC (G4) (agua destilada)	RM _{11GC}	294,80	0,2948	1474,00	4,9
	RM _{12GC}	303,40	0,3034	1517,00	5,1
TOTAL _{RMGC} :				2,991.00	9.97

Donde: x: Cantidad de extracto hidroalcohólico
v: Volumen administrado

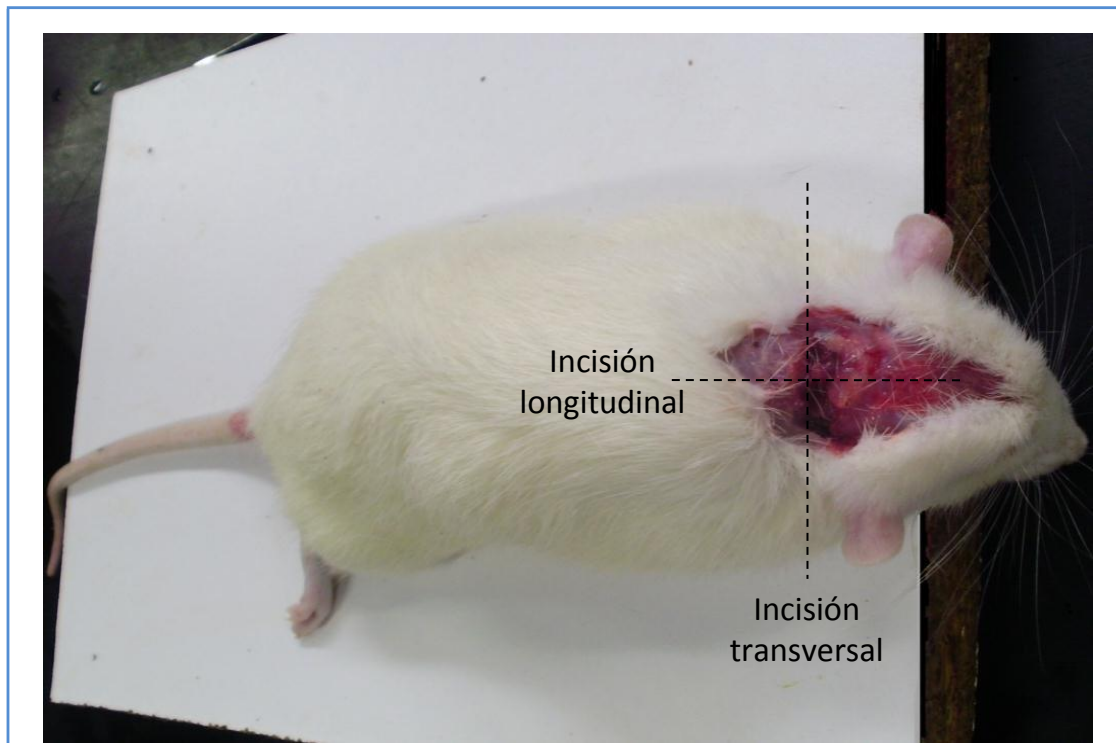


Figura 8. Incisión transversal y longitudinal de la caja craneal de rata albina cepa Holtzman.

Se introdujo la tijera en el hueso interparietal para cortar la calota (bóveda craneal), y, quebrándola para los costados con una pinza, se dejó al descubierto el cráneo, para extirpar el cerebro y cerebelo (figura 9).



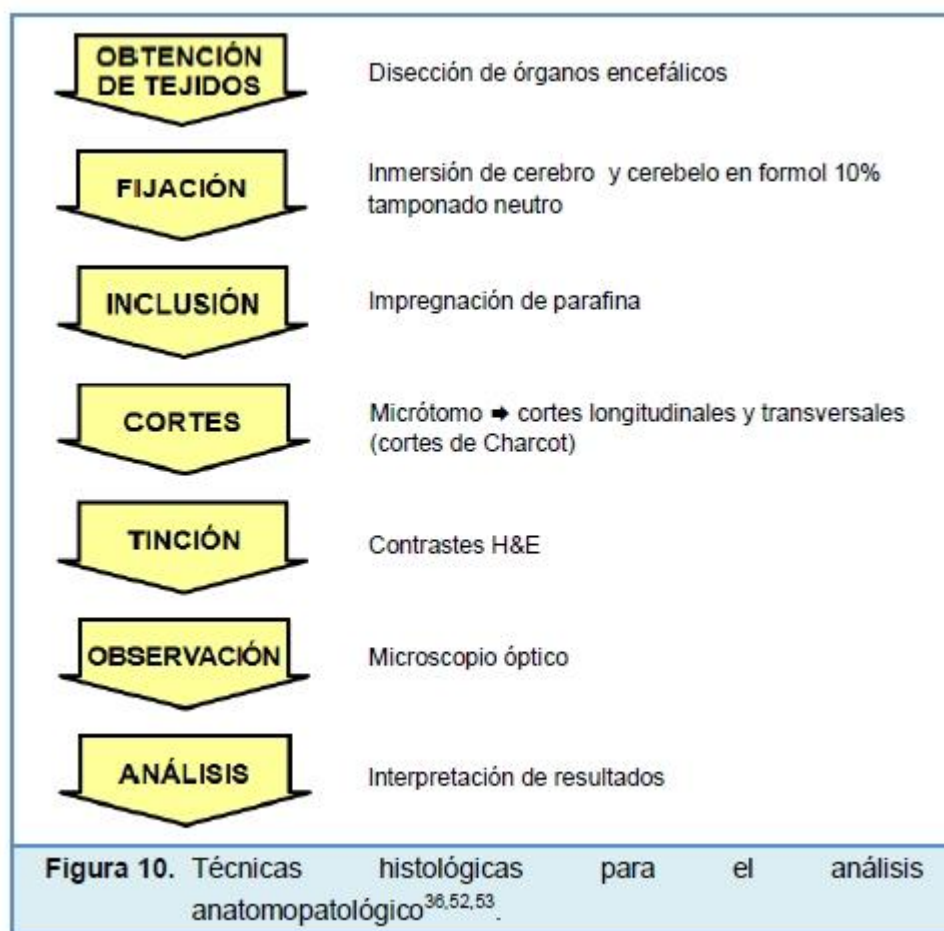
Figura 9. Extirpación de encéfalo de rata albina cepa Holtzman.

Este procedimiento se efectuó con sumo cuidado, ya que si se ejercía mucha presión con los instrumentos, los órganos del encéfalo podían haber sido punzados, y la técnica operatoria habría podido fracasar.

Los cerebros y cerebelos, conforme iban siendo extirpados, fueron lavados con agua destilada. Antes de ser introducidos en la solución de formol 10 % tamponado neutro, fueron analizados macroscópicamente sobre la mesa de trabajo.

4.3.5. Análisis anatomopatológico

Para la observación microscópica de las muestras, previamente se prepararon los tejidos de cerebros y cerebelos, aplicando diversas técnicas histológicas (figura 10)⁵².



Preparación de los tejidos

Fijación

Este proceso no debe exceder las 24 horas. Mediante la técnica de inmersión de órganos en fijador⁵³, los cerebros y cerebelos extirpados fueron depositados en contenedores pequeños, los cuales contenían formol 10 % tamponado neutro (figura 11).

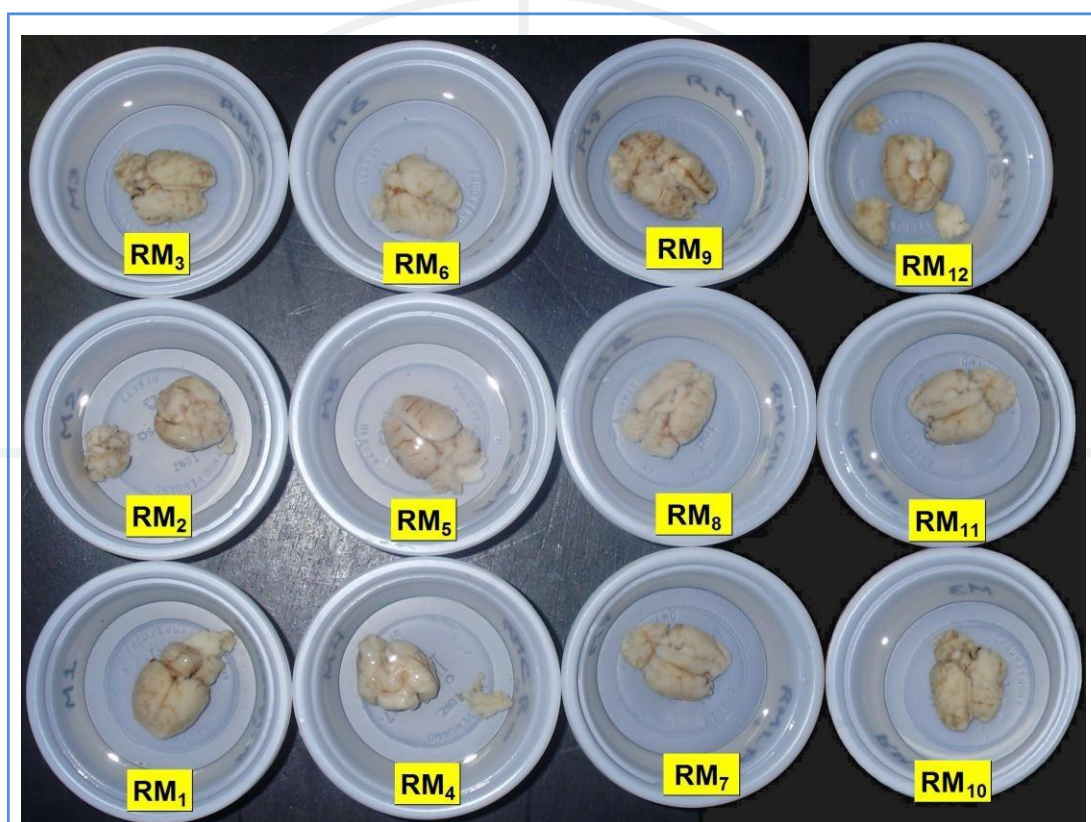


Figura 11. Inmersión de cerebros y cerebelos extirpados a ratas albinas cepa Holtzman en solución de formol 10 % tamponado neutro (fijador) para el análisis histopatológico⁵³.

Los órganos se llevaron al Laboratorio Central de Patología Clínica del Hospital Nacional Arzobispo Loayza para su análisis anatomopatológico.

Inclusión

a) Selección del tejido

- Se seleccionó la zona del órgano patológico que se iba a incluir y procesar.
 - Los tejidos lavados con agua destilada, fueron colocados en los *cassettes* de inclusión 4 x 3 cm, los cuales fueron debidamente rotulados.

b) Deshidratación

Como la parafina es inmisible en agua, para que pueda penetrar completamente los tejidos se sustituyó el agua por un solvente orgánico, alcoholes de polaridad creciente; es decir, en alcohol de 70° → alcohol 96° → alcohol absoluto, 30 minutos por cada alcohol.

c) Aclaramiento

Se sustituyó el líquido deshidratante (alcoholes) por otra sustancia aclarante o líquido intermedio, miscible en el medio de inclusión (xilol). Para ello, se realizaron dos baños sucesivos con el agente clarificante; es decir, las muestras se sumergieron en xilol dos veces cada 30 minutos (una hora para seres humanos).

d) Impregnación en parafina

Se introdujo la muestra en un molde con parafina líquida, dos veces cada 30 minutos. La parafina ingresó a los tejidos con facilidad, gracias al xilol, cubriendo el lugar que ocupaba el agua, la misma que fue desplazada por el proceso de deshidratación con alcoholes. De esta manera, la muestra quedó totalmente incluida en parafina, formándose el denominado bloque o taco de parafina.

e) Enfriamiento

El bloque o taco fue dolidificado en el refrigerador durante 12 horas.

Cortes

Con la ayuda del micrótopo marca Leyca ® se realizaron cortes longitudinales y transversales (cortes de Charcot), seccionándolos a 4 μ y colocándolos en las láminas portaobjetos. Luego se procedió a la tinción, previa desparafinación.

Coloración o tinción de los tejidos

Se usó el método de la doble coloración con hematoxilina y eosina (H&E), según los siguientes pasos:

- 1 La parafina se desplaza con xilol a dos cambios de 5-10'.
- 2 Pasar por etanol absoluto a dos cambios de 5-10'.
- 3 Pasar por etanol alcohol 96° a dos cambios de 2-5'.
- 4 Pasar por etanol 70° a dos cambios de 2'.
- 5 Primera coloración: aplicar hematoxilina de Harris por 5'.
- 6 Diferenciación con etanol ácido (HCl 1 %) a dos pasos de 20'.
- 7 Lavado con agua corriente.
- 8 Lavar con agua alcalina (carbonato de litio) al 1 %.
- 9 Lavado con agua corriente.
- 10 Segunda coloración: aplicar eosina por 1' (dos veces).
- 11 Lavado con agua corriente.
- 12 Lavar con etanol 96° (dos veces).
- 13 Lavar con etanol absoluto (dos veces).
- 14 Pasar con xilol a dos pasos de 5' para proceder al montaje.

Observación de los tejidos

- Antes del montaje se facilita la microscopia utilizando una gota del adherente traslúcido bálsamo de Canadá o Entellan ®.
- Colocar la laminilla cubreobjetos.
- Enfocar con el lente de aumento 5x del microscopio, visualizar con el lente de aumento 10x, luego a 40x.
- Observar.
- Tomar datos del análisis y capturar imágenes digitales.

4.3.6. Análisis estadísticos

Una vez realizado el trabajo experimental, es necesario procesar los datos obtenidos. Para ello se trabajó con el número de animales de experimentación en comparación con los animales control. En el análisis estadístico cuantitativo y cualitativo, se usó el peso corporal versus el tiempo y los valores asignados a las observaciones del análisis anatomopatológico, respectivamente.

Recolección de datos

Todos los datos estadísticos fueron recolectados y registrados en hojas de cálculo, antes, durante y al término de la investigación.

Tabulación y procesamiento de datos

Con la finalidad de determinar la diferencia significativa de las variables intragrupos e intergrupos (error), la medición de las variables cuantitativas (pesos de las ratas hembras y machos) se efectuó mediante el análisis de varianza (ANOVA) y el de comparación múltiple (pruebas de significancia Tukey HSD y LSD), disponibles en el programa estadístico SPSS versión 15, Window 7, año 2009. Los niveles fijados fueron: nivel de significancia ($\alpha = 0,05$) y nivel de confianza ($1 - \alpha = 0.95$). Los resultados se expresaron con medias

aritméticas (promedios (\bar{X})), porcentajes, representaciones gráficas de barras, estadígrafos de dispersión, tablas de ANOVA y tablas de comparación múltiple.

La medición de las variables cualitativas se efectuó a través de la distribución de frecuencias. Los datos tabulados fueron los valores determinados para los tejidos de cerebros y cerebelos de las ratas, haciendo uso del programa informático Excel, Window 7, año 2009. Los resultados se expresaron mediante frecuencias absolutas, frecuencias relativas, frecuencias relativas porcentuales, tabla de distribución de frecuencias y representaciones gráficas de barras.

Los análisis de datos se efectuaron progresivamente, al término de cada resultado obtenido u observación efectuada.



V. RESULTADOS

5.1. Análisis fitoquímico

Basados en las pruebas generales de coloración y precipitación (figura 12), se determinó la presencia de los siguientes metabolitos (tabla 9):

- 1) Flavonoides.
- 2) Compuestos fenólicos.
- 3) Taninos.
- 4) Alcaloides.
- 5) Carbohidratos.
- 6) Triterpenos y/o esteroides.
- 7) Azúcares reductores.
- 8) Grupo amino libre.



Figura 12. Reacciones de coloración y precipitación del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. "chinchilcuma"/MeOH (20 mg/1 mL).

Tabla 9. Determinación cualitativa del análisis fitoquímico⁵⁴ del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. "chinchilcuma".

Nº	REACTIVOS	METABOLITOS PRIMARIOS Y SECUNDARIOS	RESULTADOS
1.	Tricloruro de aluminio	Flavonoides	+
2.	Shinoda	Flavonoides	+
3.	Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	+
4.	Gelatina/NaOH 1%	Taninos	+
5.	Dragendorff	Alcaloides	+
6.	Mayer	Alcaloides	+
7.	Popoff	Alcaloides	+
8.	Wagner	Alcaloides	+
9.	Sonnenchein	Alcaloides	+
10.	Bertrand	Alcaloides y aminas terciarias	+
11.	Fehling A y B	Azucares reductores	+
12.	Molish	Carbohidratos	+
13.	Ninhidrina 1%	Grupo amino libre	+
14.	Liebermann – Burchard	Triterpenos y/o Esteroides	+
15.	Salkowski	Esteroides	+

Leyenda: • Presencia (+)
• Ausencia (-)

5.2. Estudio toxicológico

5.2.1. Evaluación de los animales de ensayo en función al peso corporal y tiempo

Evolución biológica de pesos corporales de los animales del grupo G1 al G4 en los días 1, 7 y 14, a los que se les administró extracto hidroalcohólico a dosis única de 5000 mg/kg y agua destilada, respectivamente (tabla 10).

Tabla 10. Registro y control de la evolución biológica de los pesos corporales de las ratas de experimentación (variables cuantitativas).

GRUPO	PESO DE RATAS HEMBRAS				PESO DE RATAS MACHOS			
	RH _n	1 ^{er} día w _i (g)	7 ^{mo} día w _e (g)	14 ^o día w _r (g)	RM _n	1 ^{er} día w _i (g)	7 ^{mo} día w _e (g)	14 ^o día w _r (g)
EXPERIMENTAL	Grupo 1				Grupo 2			
	RH ₁	193,90	215,60	218,20	RM ₁	279,40	288,20	293,00
	RH ₂	188,60	203,50	205,50	RM ₂	308,50	318,20	324,00
	RH ₃	214,70	243,00	250,30	RM ₃	242,10	246,70	263,50
	RH ₄	164,80	183,40	189,60	RM ₄	273,00	286,50	289,30
	RH ₅	179,30	200,70	201,50	RM ₅	262,10	276,20	306,50
	RH ₆	183,80	222,70	224,50	RM ₆	303,70	322,30	349,00
	RH ₇	196,00	216,00	222,50	RM ₇	306,50	318,20	335,20
	RH ₈	194,30	209,80	207,40	RM ₈	301,40	311,90	343,00
	RH ₉	214,60	235,20	239,50	RM ₉	251,30	256,00	318,10
	RH ₁₀	190,70	217,80	223,10	RM ₁₀	236,40	253,80	280,60
	Peso \bar{X} RH _{0E}	192,07	214,77	218,21	Peso \bar{X} RM _{0E}	276,44	287,80	310,22
CONTROL	Grupo 3				Grupo 4			
	RH ₁₁	193,30	208,60	222,50	RM ₁₁	294,80	311,30	328,80
	RH ₁₂	198,50	211,20	225,70	RM ₁₂	303,40	317,40	334,90
	Peso \bar{X} RH _{0C}	195,90	209,90	224,10	Peso \bar{X} RM _{0C}	299,10	314,35	331,85

Donde \bar{X} peso promedio (g).

5.2.2. Análisis estadístico cuantitativo de los pesos corporales de los animales de ensayo en función al tiempo

Evolución biológica de los pesos corporales de las ratas hembras en el tiempo

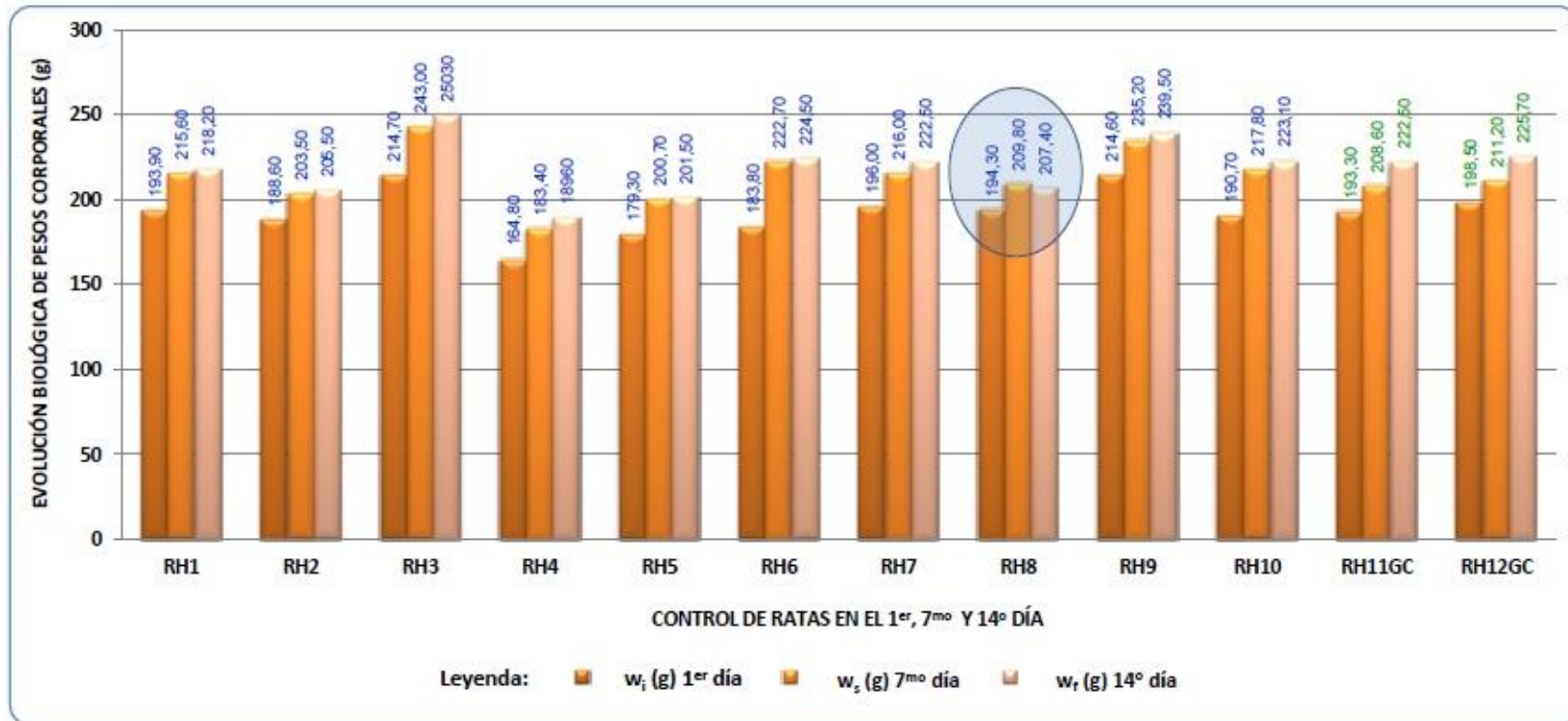


Figura 13. Representación gráfica mediante diagrama de barras, correspondiente a la evolución biológica de pesos corporales de las ratas hembras del GE (G1) y GC (G3) en un periodo de 14 días.

En la tabla 10 y en la figura 13 se puede observar que en el día 14, con respecto al sétimo día, se aprecia una pérdida de peso de 2,40 g en la rata RH₈, que equivale a un nivel de riesgo o significancia de 0,89100683 (Tabla 13, comparación múltiple, pruebas de significancia Tukey HSD). Esta baja de peso de un animal de experimentación no tiene mayor relevancia, porque se encuentra dentro del margen de error permisible (un caso de diez, 1:10).

Promedio de la evolución biológica de los pesos corporales de las ratas hembras en el tiempo

Tabla 11. Evolución biológica de los pesos corporales \bar{X} de las ratas hembras en función al tiempo.

GRUPO \ DÍA	PESO \bar{X} DE RATAS HEMBRAS			
	1 ^{er}	7 ^{mo}	14 ^o	Δ pesos \bar{X} 1 ^{er} – 14 ^o día
EXPERIMENTAL (G1)	192,07	214,77	218,21	26,14
CONTROL (G3)	195,90	209,90	224,10	28,20

Donde: \bar{X} : peso promedio (g)

Análisis de varianza de los pesos de las ratas hembras, según el sistema ANOVA SPSS V.15

Los pesos RHGE en los días 1, 7 y 14 fueron introducidos y procesados en el sistema ANOVA SPSS V.15, de los que se obtuvieron los resultados que se detallan en la tabla 12.

Tabla 12. Tabla ANOVA. Resumen del análisis de varianza de los pesos \bar{X} de las ratas hembras del GE.

Tratamientos (1 ^{er} , 7 ^{mo} y 14 ^o día)	SC	GI	CM	F	α
Peso \bar{X} RH _{GE}	4034,744	2	2017,372	7,17081869	0,00317817
Error	7595,931	27	281,330778		
Total	11 630,675	29			

Donde: **SC:** suma de cuadrados
gl: grados de libertad
CM: cuadrado de medios

F: Distribución de probabilidad
(F de Fisher)
 α : nivel de significancia

Al valor del test $F = 7,17081869$ le corresponde el nivel de significancia $\alpha = 0,00317817$, inferior a 0,05. Mediante esta tabla se aprecia que no existen diferencias significativas en el incremento de pesos de las ratas hembras del grupo experimental G1, tanto intergrupos como intragrupos.

Representación gráfica de los pesos de las ratas hembras

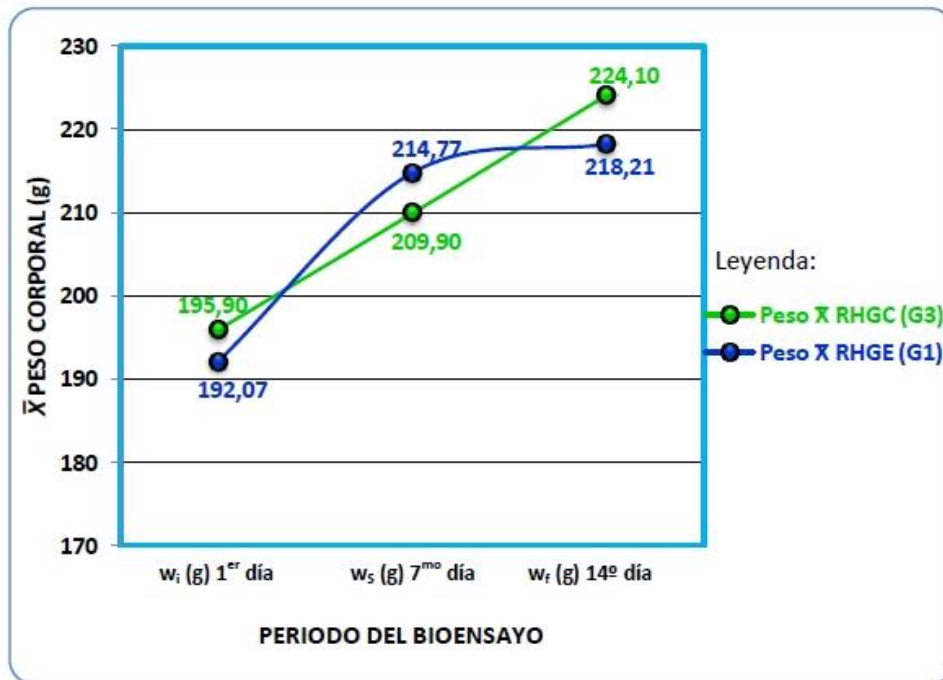


Figura 14. Estadígrafo de dispersión de la evolución biológica de los pesos \bar{X} de las ratas hembras del GE (G1), en comparación con el GC (G3), en diferentes días.

En la figura 14, en el séptimo día se aprecian dos puntos de inflexión en la línea de evolución biológica de pesos, que vienen a representar una ganancia de peso considerable para las ratas hembras del GE (G1); sin embargo, en el día 14 día, regresan a su normalidad.

Pruebas de comparación múltiple de los pesos de las ratas hembras

Comparación múltiple de los pesos de las ratas hembras del GE (G1) sometidas a la evaluación de la toxicidad del extracto hidroalcohólico de 'chinchilcuma' a dosis única de 5000 mg/kg, en los tres tratamientos (días 1, 7 y 14). En las pruebas de significancia Tukey HSD y LSD, se observan las distintas variaciones de los pesos, con diferentes valores de significancia (tabla 13).

Tabla 13. Cuadro estadístico de comparaciones múltiples de los pesos \bar{X} de la ratas hembras, efectuados en el software ANOVA SPSS V.15 mediante pruebas de significancia Tukey HSD y LSD.

Dependent variable: peso_ratamachos

Comparación múltiple	Tiempo (I)	Tiempo (J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	95% Intervalo de confianza		Significancia (*)	
					Límite inferior	Límite superior		
Tukey HSD	1 ^{er} día	7 ^{mo} día	-22,7	7,50107696	-41,29830291	-4,101697094	0,01442307	*
		14 ^o día	-26,14	7,50107696	-44,73830291	-7,541697094	0,00468195	*
	7 ^{mo} día	1 ^{er} día	22,7	7,50107696	4,101697094	41,29830291	0,01442307	*
		14 ^o día	-3,44	7,50107696	-22,03830291	15,15830291	0,89100683	NS
	14 ^o día	1 ^{er} día	26,14	7,50107696	7,541697094	44,73830291	0,00468195	*
		7 ^{mo} día	3,44	7,50107696	-15,15830291	22,03830291	0,89100683	NS
LSD	1 ^{er} día	7 ^{mo} día	-22,7	7,50107696	-38,09093861	-7,309061388	0,00538731	*
		14 ^o día	-26,14	7,50107696	-41,53093861	-10,74906139	0,00169841	*
	7 ^{mo} día	1 ^{er} día	22,7	7,50107696	7,309061388	38,09093861	0,00538731	*
		14 ^o día	-3,44	7,50107696	-18,83093861	11,95093861	0,65019111	NS
	14 ^o día	1 ^{er} día	26,14	7,50107696	10,74906139	41,53093861	0,00169841	*
		7 ^{mo} día	3,44	7,50107696	-11,95093861	18,83093861	0,65019111	NS

- NS: No significativo

- La diferencia entre las medias es significativa al nivel de 0,05 de error

Evolución biológica de los pesos corporales de las ratas machos en el tiempo

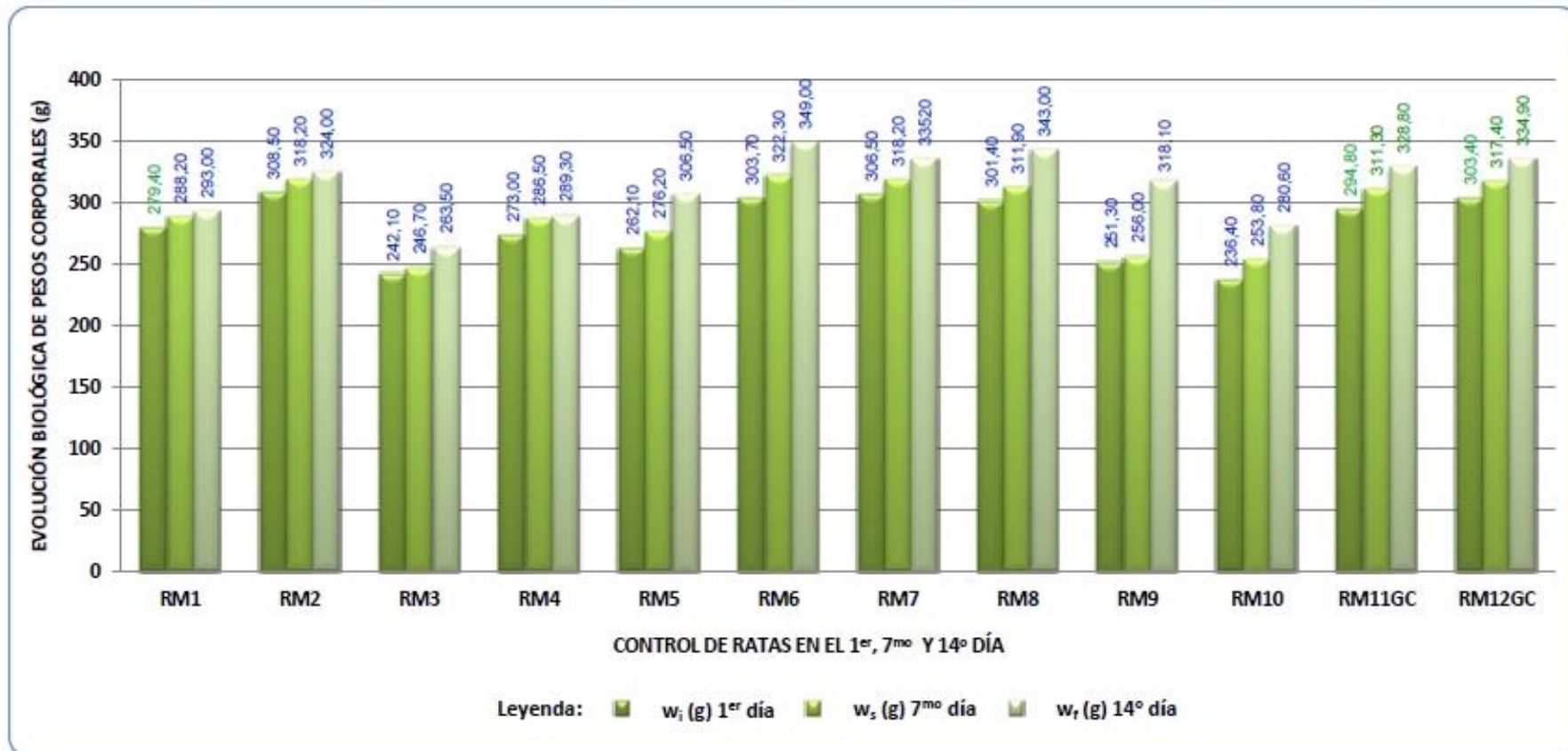


Figura 15. Representación gráfica mediante diagrama de barras, correspondiente a la evolución biológica de pesos corporales de las ratas machos del GE (G2) y GC (G4) en un periodo de 14 días.

Promedio de la evolución biológica de los pesos corporales de las ratas machos en el tiempo

Tabla 14. Evolución biológica de los pesos corporales \bar{X} de las ratas machos en función al tiempo.

GRUPO \ DÍA	PESO \bar{X} DE RATAS MACHOS			
	1 ^{er}	7 ^{mo}	14 ^o	Δ pesos \bar{X} 1 ^{er} → 14 ^o día
EXPERIMENTAL (G2)	276,44	287,80	310,22	33,78
CONTROL (G4)	299,10	314,35	331,85	32,75

Donde: \bar{X} : peso promedio (g)

Análisis de varianza de los pesos \bar{X} de las ratas machos, según el sistema ANOVA SPSS V.15

Los pesos \bar{X} RM_{GE} en los días 1, 7 y 14 fueron introducidos y procesados en el sistema ANOVA SPSS V.15, con el que se obtuvieron los resultados que se detallan en la tabla 15.

Tabla 15. Tabla ANOVA. Resumen del análisis de varianza de los pesos \bar{X} de las ratas machos del GE.

Tratamientos (1 ^{er} , 7 ^{mo} y 14 ^o día)	SC	gl	CM	F	α
Peso \bar{X} RM_{GE}	5909,31467	2	2954,65733	3,65725705	0,03930609
Error	21813	27	807,888889		
Total	27722,3147	29			

Donde: **SC:** suma de cuadrados
gl: grados de libertad
CM: cuadrado de medios
F: Distribución de probabilidad (F de Fisher)
 α : nivel de significancia

Al valor del test $F = 3,65725705$ le corresponde el nivel de significancia $\alpha = 0,03930609$, inferior a 0,05. Mediante esta tabla se aprecia que no existen diferencias significativas en el incremento de pesos \bar{X} de las ratas hembras del GE (G1), tanto intergrupos como intragrupos.

Representación gráfica de los pesos \bar{X} de las ratas machos

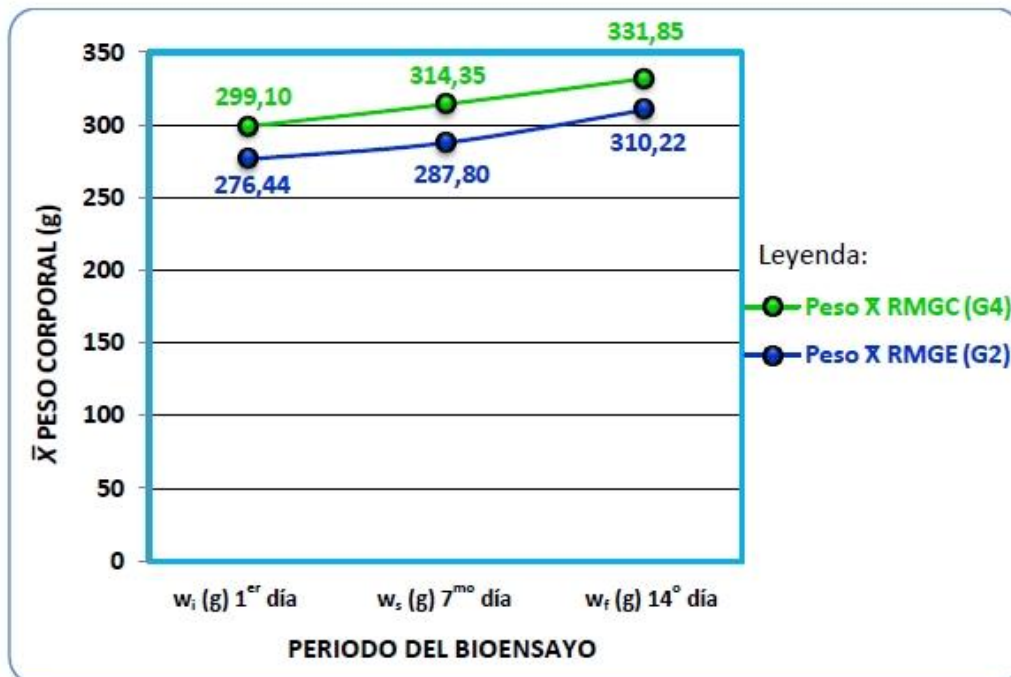


Figura 16. Estadígrafo de dispersión de la evolución biológica de los pesos \bar{X} de las ratas machos del GE (G2), en comparación con el GC (G4), en diferentes días.

La curva de crecimiento correspondiente al GE (G2) debajo de la curva de crecimiento correspondiente al GC (G4) se debe al promedio de pesos corporales que adoptó cada grupo de animales. Para los dos casos, se mantienen paralelas y constantes desde el inicio hasta el final del período de observación (figura 16 y tabla 16).

Tabla 16. Comparación de los pesos \bar{X} de las ratas machos del GE, respecto al GC en diferentes días.

DÍA	COMPARACIÓN	CURVA DE CRECIMIENTO
1 ^{er}	Pesos \bar{X} GC (G4) > Pesos \bar{X} GE (G2)	Paralelo y constante
7 ^{mo}	Pesos \bar{X} GC (G4) > Pesos \bar{X} GE (G2)	Paralelo y constante
14 ^o	Pesos \bar{X} GC (G4) > Pesos \bar{X} GE (G2)	Paralelo y constante

Pruebas de comparación múltiple de pesos de ratas machos

Comparación múltiple de los pesos \bar{X} de las ratas machos del GE (G2) sometidas a la evaluación de la toxicidad del extracto hidroalcohólico de 'chinchilcuma' a dosis única de 5000 mg/kg, en los tres tratamientos (días 1, 7 y 14). En las pruebas de significancia Tukey HSD y LSD se observan las distintas variaciones de los pesos, con diferentes valores de significancia (tabla 17).

Tabla 17. Cuadro estadístico de comparaciones múltiples de los pesos \bar{X} de la ratas machos, efectuados en el software ANOVA SPSS V.15 mediante pruebas de significancia Tukey HSD y LSD.

Dependent variable: peso_ratras_machos

Comparación múltiple	Tiempo (I)	Tiempo (J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	95% Intervalo de confianza		Significancia (*)	
					Límite inferior	Límite superior		
Tukey HSD	1 ^{er} día	7 ^{mo} día	-11,36	12,7113248	-42,87668353	20,15668353	0,64884059	ns
		14 ^o día	-33,78	12,7113248	-65,29668353	-2,26331647	0,03383280	**
	7 ^{mo} día	1 ^{er} día	11,36	12,7113248	-20,15668353	42,87668353	0,64884059	ns
		14 ^o día	-22,42	12,7113248	-53,93668353	9,09668353	0,20079786	ns
	14 ^o día	1 ^{er} día	33,78	12,7113248	2,26331647	65,29668353	0,03383280	**
		7 ^{mo} día	22,42	12,7113248	-9,09668353	53,93668353	0,20079786	ns
LSD	1 ^{er} día	7 ^{mo} día	-11,36	12,7113248	-37,4414841	14,7214841	0,37938432	ns
		14 ^o día	-33,78	12,7113248	-59,8614841	-7,698515902	0,01306252	**
	7 ^{mo} día	1 ^{er} día	11,36	12,7113248	-14,7214841	37,4414841	0,37938432	ns
		14 ^o día	-22,42	12,7113248	-48,5014841	3,661484098	0,08908303	ns
	14 ^o día	1 ^{er} día	33,78	12,7113248	7,698515902	59,8614841	0,01306252	**
		7 ^{mo} día	22,42	12,7113248	-3,661484098	48,5014841	0,08908303	ns

- NS: No significativo

- La diferencia entre las medias es significativa al nivel de 0,05 de error

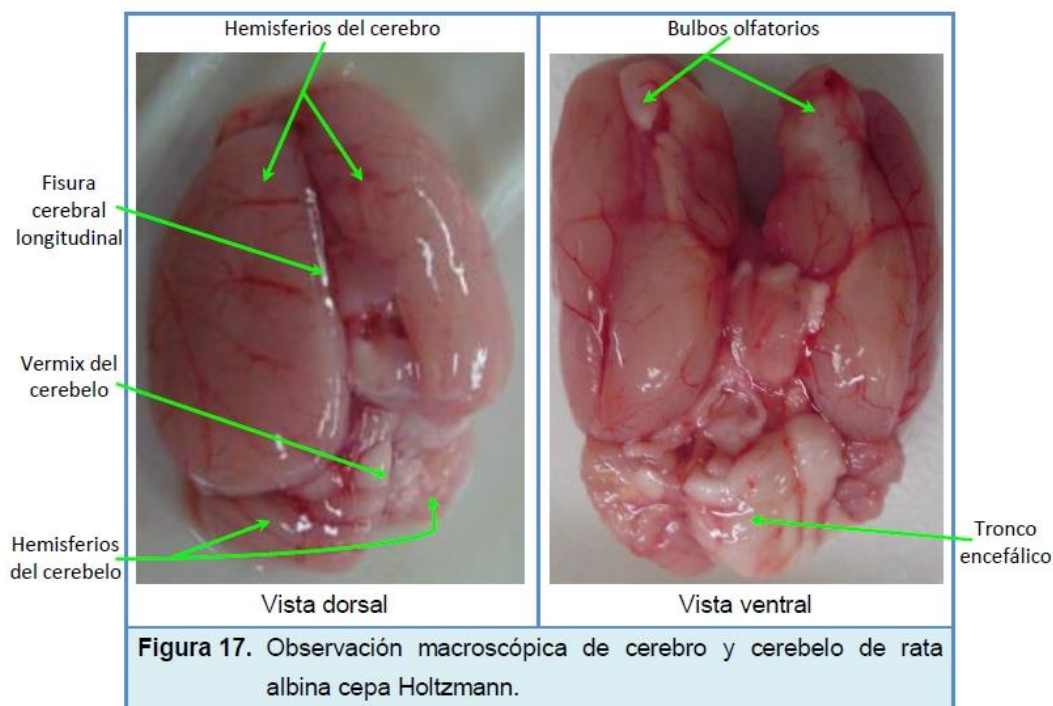
5.2.3. Dosis letal media (DL₅₀)

No se detectaron evidencias de toxicidad aguda, pérdida de funciones vitales, signos o síntomas de toxicidad observable. No se produjo la muerte de ningún sustrato biológico (tabla 18).

Tabla 18. Rangos o potencias de toxicidad aguda según la dosis letal media (DL₅₀) en los animales de experimentación.

GRUPO	CANT. RATAS	DL ₅₀ MG/KG (DOSIS LÍMITE)	CLASIFICACIÓN TOXICIDAD	RATAS VIVAS	RATAS MUERTAS	SIGNOS DE TOXICIDAD
G1	10	5000	Prácticamente no tóxico	10	00	Ninguna
G2	10	5000	Prácticamente no tóxico	10	00	Ninguna
Total	20	—	—	20	00	—

5.2.4. Análisis macroscópico

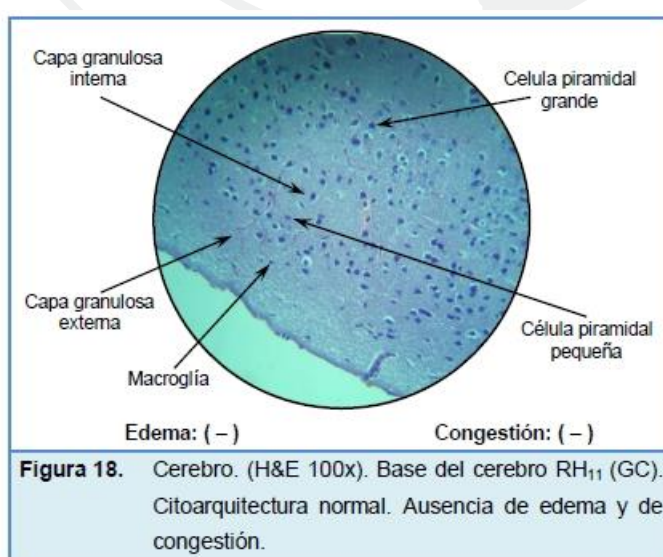


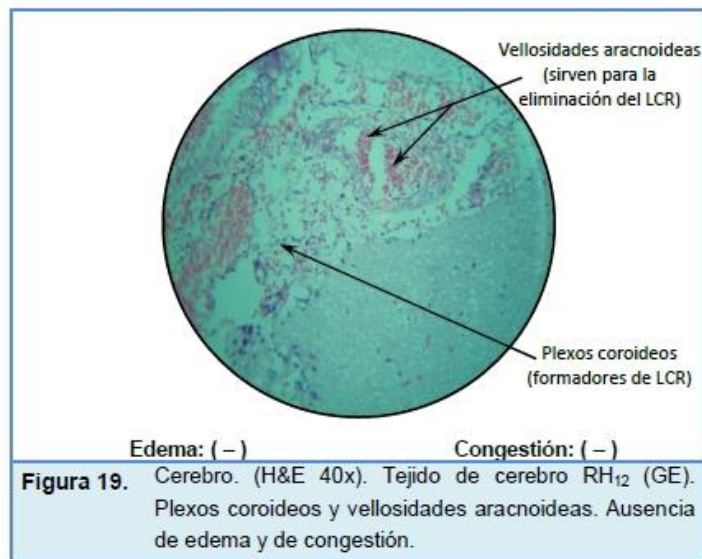
En la observación macroscópica de los cerebros y cerebelos de las ratas albinas cepa Holtzman no se encontraron lesiones celulares, daños vasculares, inflamaciones, encefalopatías necrotizantes, hemorrágicas agudas, congestiones ni edemas graves generalizados que haya causado la destrucción de los tejidos por acción del extracto hidroalcohólico de hojas frescas de 'chinchilcuma'.

5.2.5. Análisis anatomopatológico de los tejidos nerviosos de los cerebros y cerebelos de las ratas hembras

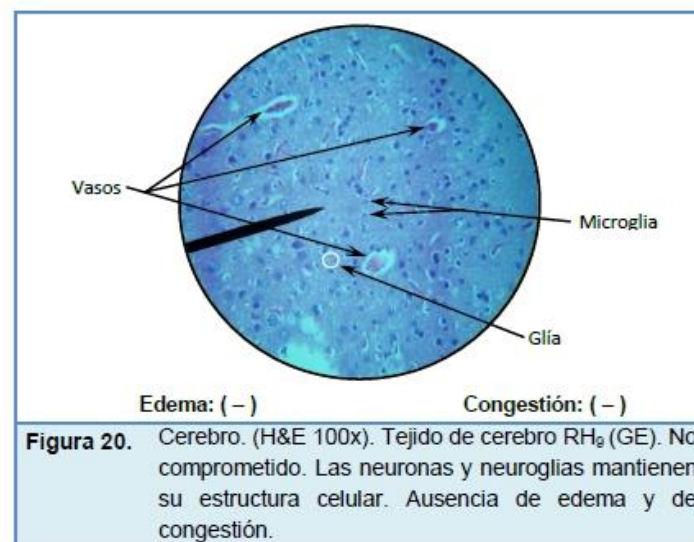
Microfotografías de los tejidos del cerebro y del cerebelo de las ratas hembras del grupo control a los cuales se les administró solo agua destilada 1 mL/100 g de peso corporal, comparado con las microfotografías de los tejidos del grupo experimental, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' a dosis única de 5000 mg/kg luego del día 14 de administración de la sustancia.

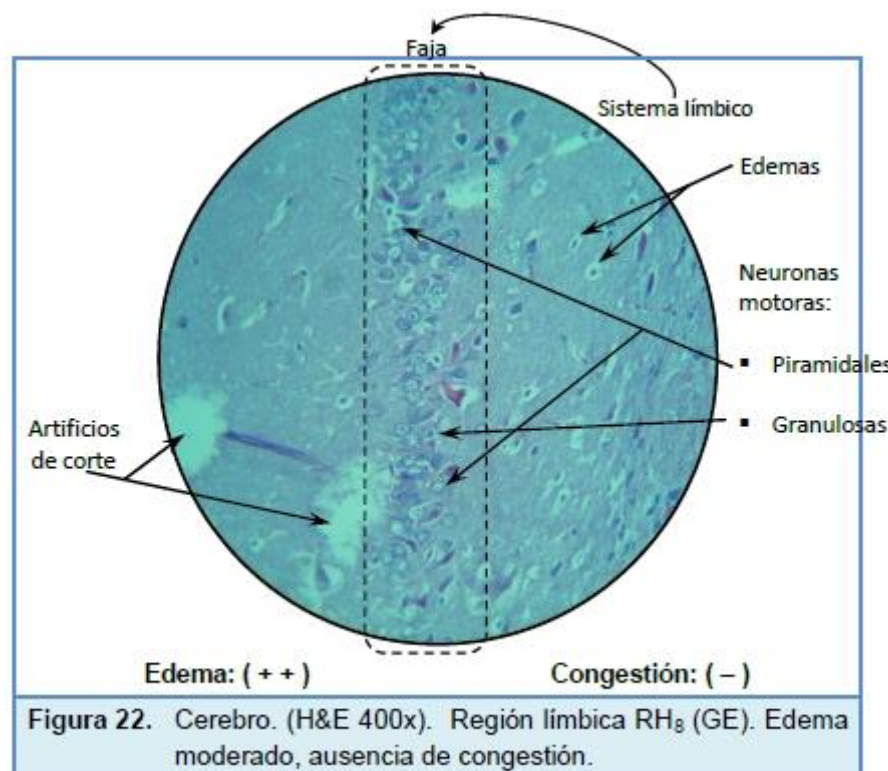
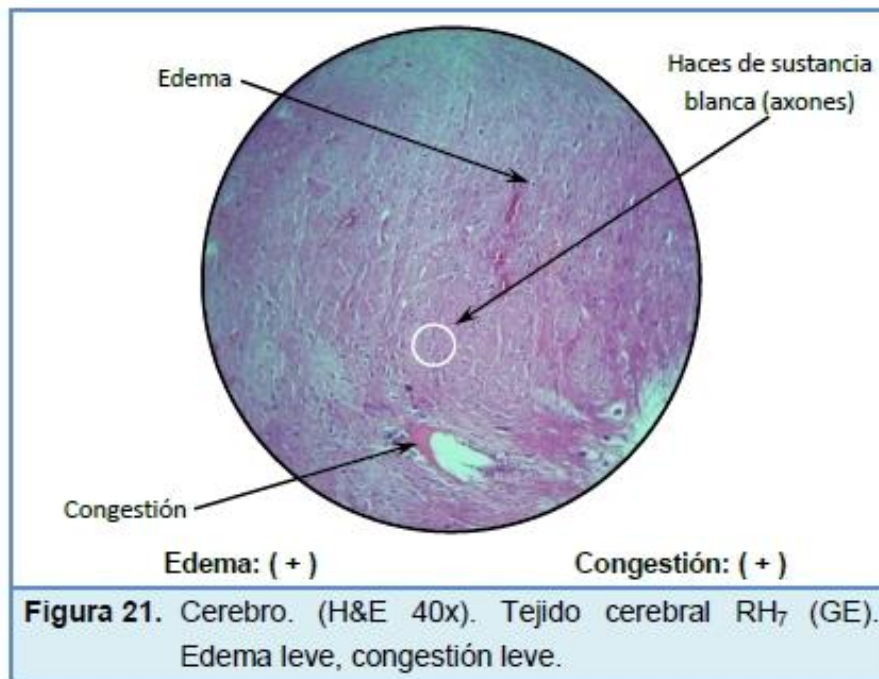
Tejidos de cerebros de ratas hembras del grupo control (figuras 18 y 19)



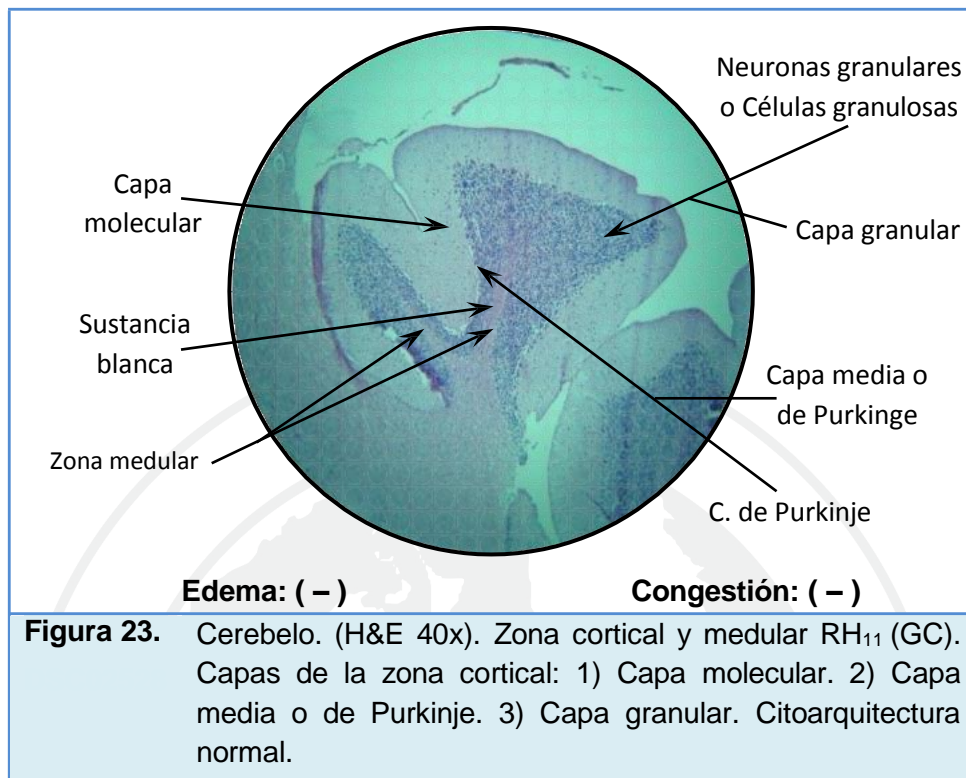


Tejidos de cerebros de ratas hembras del grupo experimental (figuras 20, 21 y 22)

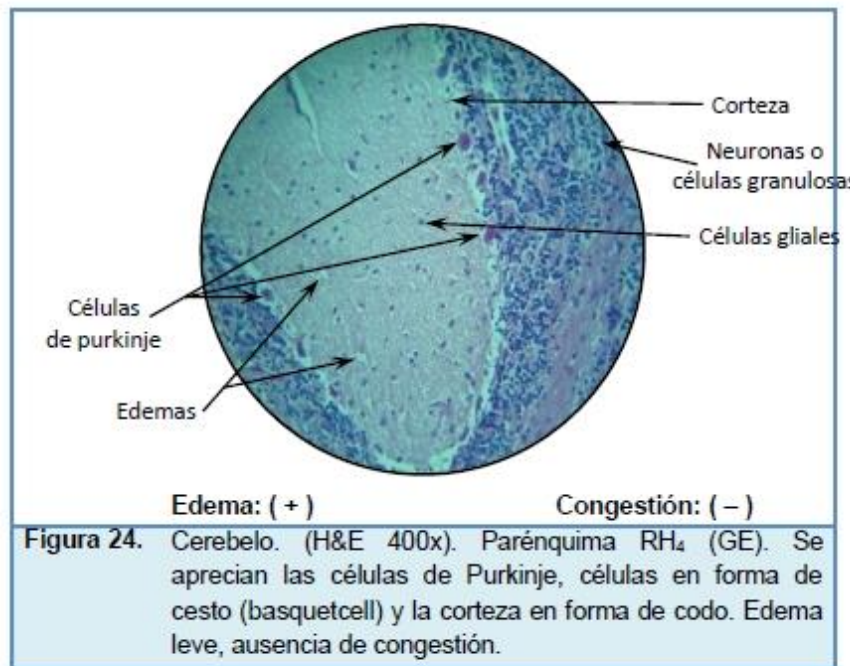




Tejido de cerebelo de rata hembra del grupo control



Tejido de cerebelo de rata hembra del grupo experimental



5.2.6. Análisis estadístico cualitativo de tejidos nerviosos de cerebros y cerebelos de ratas hembras

Determinación cualitativa de las observaciones microscópicas

Tabla 19. Determinación cualitativa de los tejidos nerviosos de cerebros y cerebelos de las ratas hembras del GE (G1) y GC (G3), luego del 14° día de la administración de 5000 mg/Kg de extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. "chinchilcuma".

ORGANO/ OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	RATAS HEMBRAS											
	GRUPO EXPERIMENTAL (G1)										GRUPO CONTROL (G3)	
	RH ₁	RH ₂	RH ₃	RH ₄	RH ₅	RH ₆	RH ₇	RH ₈	RH ₉	RH ₁₀	RH ₁₁	RH ₁₂
CEREBRO:												
Edema	+	+	+	+	+	+	+	++	-	-	-	-
Congestión	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
CEREBELO:												
Edema	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Valores observados (variables cualitativas):

- Presencia: leve o escaso (+), moderado o discreto (++) , severo (+++)
- Ausencia: no comprometido (-)

Distribución de frecuencias y representación gráfica de resultados (tabla 20 y figuras 25 y 26)

Tabla 20. Tabla de distribución de frecuencias de las variables cualitativas de los tejidos de cerebros y cerebelos de las ratas hembras del GE (G1). Tabulación efectuada con los datos de la tabla 19.

VALORES OBSERVADOS			RATAS HEMBRAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL G1															
			EDEMAS						CONGESTIONES									
			CEREBROS RH (G1)			CEREBELOS RH (G1)			CEREBROS RH (G1)			CEREBELOS RH (G1)						
x_n			f_i	h_i	$h_i\%$	f_i	h_i	$h_i\%$	f_i	h_i	$h_i\%$	f_i	h_i	$h_i\%$	f_i	h_i	$h_i\%$	
x_1	no comprometido	(-)	{RH _{9,10} }	2	0,2	20%	{RH _{1-3,5,6,8-10} }	8	0,80	80 %	{RH _{1-6,8-10} }	9	0,9	90%	{RH ₁₋₁₀ }	10	1	100%
x_2	Leve o escaso	(+)	{RH ₁₋₇ }	7	0,7	70%	{RH ₄ }	1	0,10	10%	{RH ₇ }	1	0,1	10%	—	0	0	0%
x_3	Moderado o discreto	(+ +)	{RH ₈ }	1	0,1	10%	{RH ₇ }	1	0,10	10%	—	0	0,0	0%	—	0	0	0%
x_4	Severo	(+ + +)	—	0	0,0	0%	—	0	0,00	0%	—	0	0,0	0%	—	0	0	0%
TOTALES:			$n = 10$	1,00	100%	$n = 10$	1,00	100%	$n = 10$	1,00	100%	$n = 10$	1,00	100%	$n = 10$	1,00	100%	

- Donde:
- x_n : Variables cualitativa (diferentes valores observados)
 - f_i : Frecuencias absolutas (número de veces de observaciones)
 - h_i : Frecuencias relativas (proporción)
 - $h_i\%$: Frecuencias relativas porcentuales (porcentajes)
 - $n = \sum f_i$: Número total de observaciones (sumatoria total de f_i)

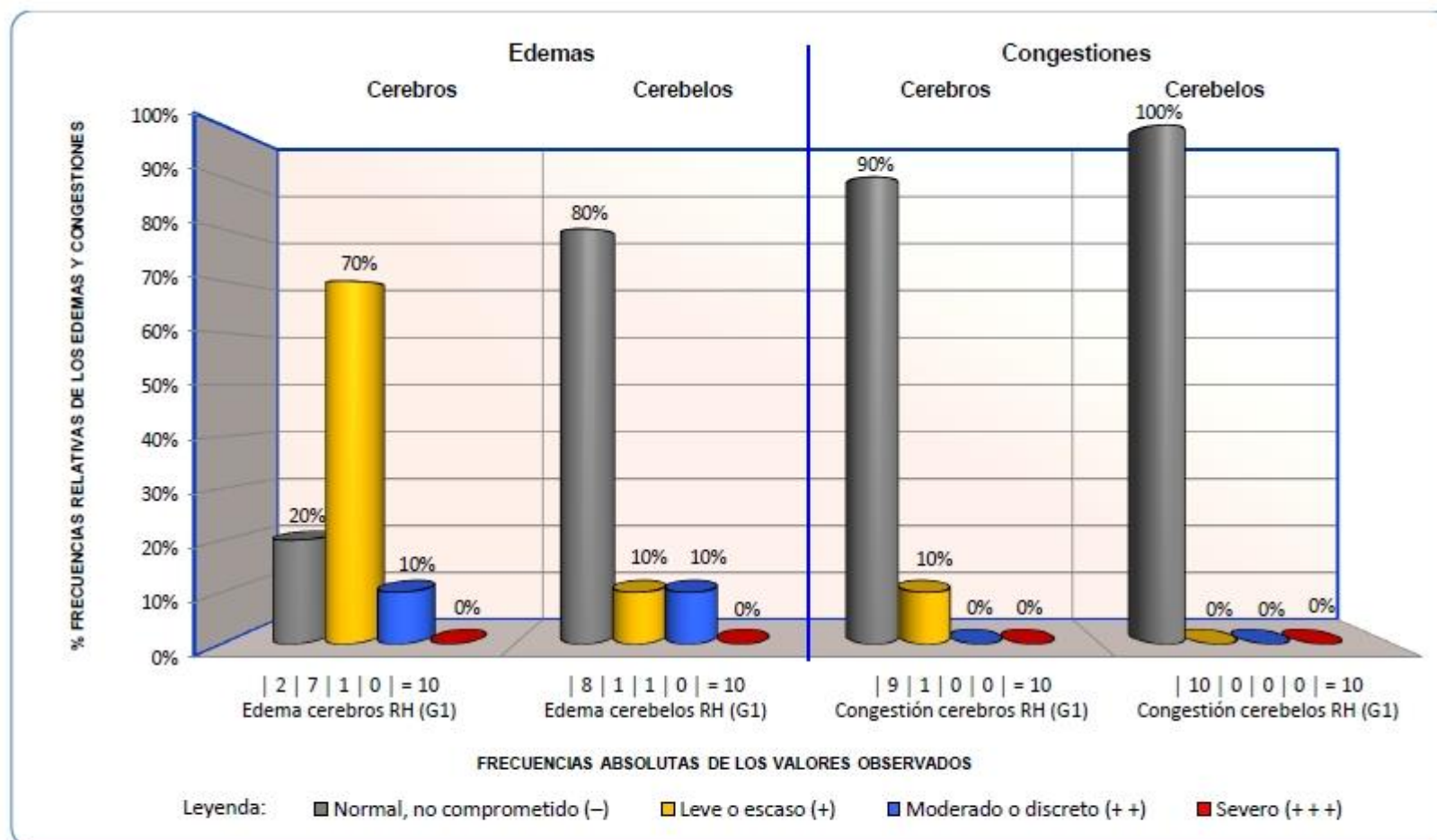


Figura 25. Representación gráfica de la distribución de frecuencias mediante diagrama de barras, correspondiente a la determinación cualitativa (valores observados) de los edemas y congestiones de los tejidos de las ratas hembras del GE (G1).

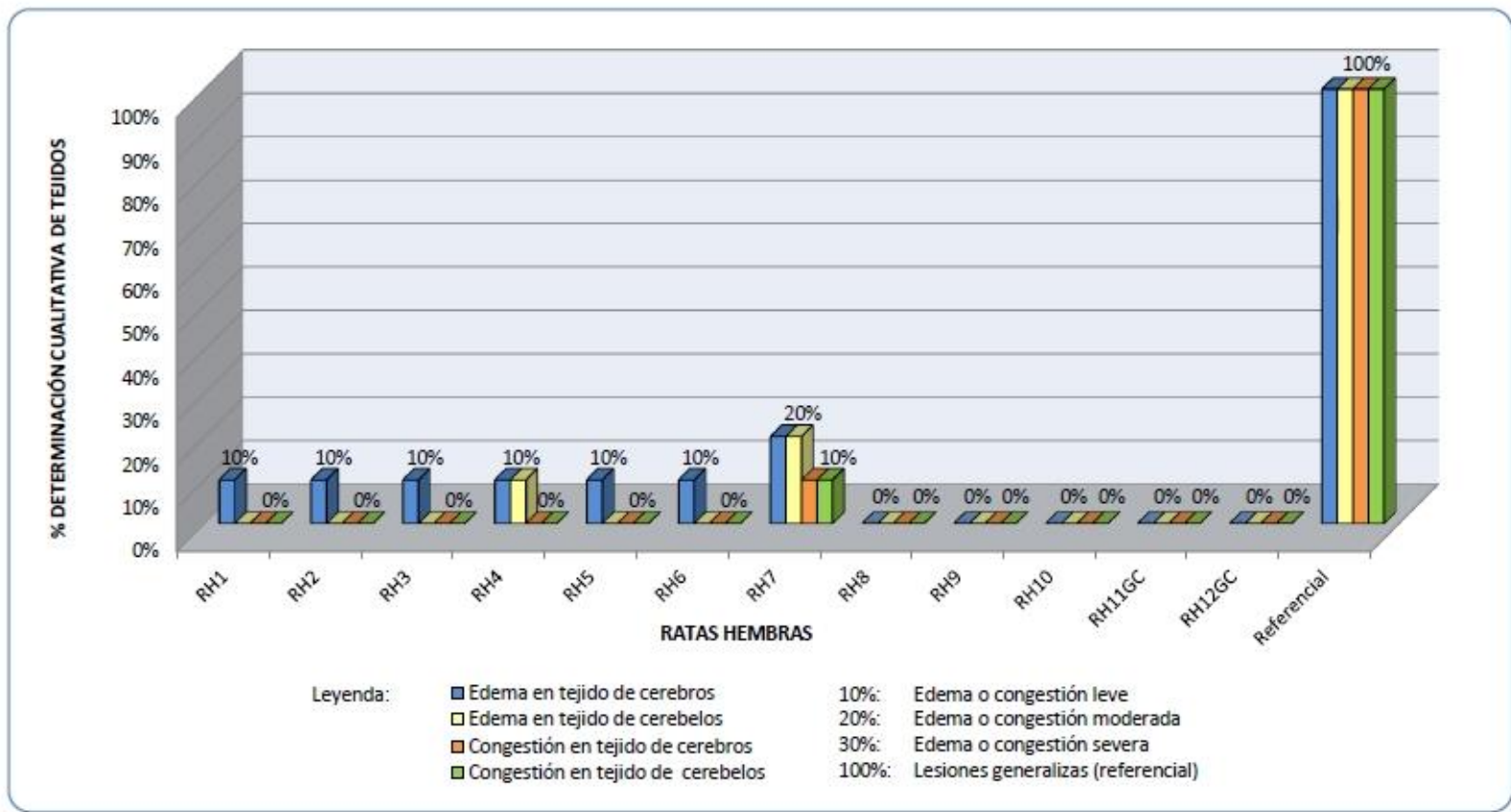
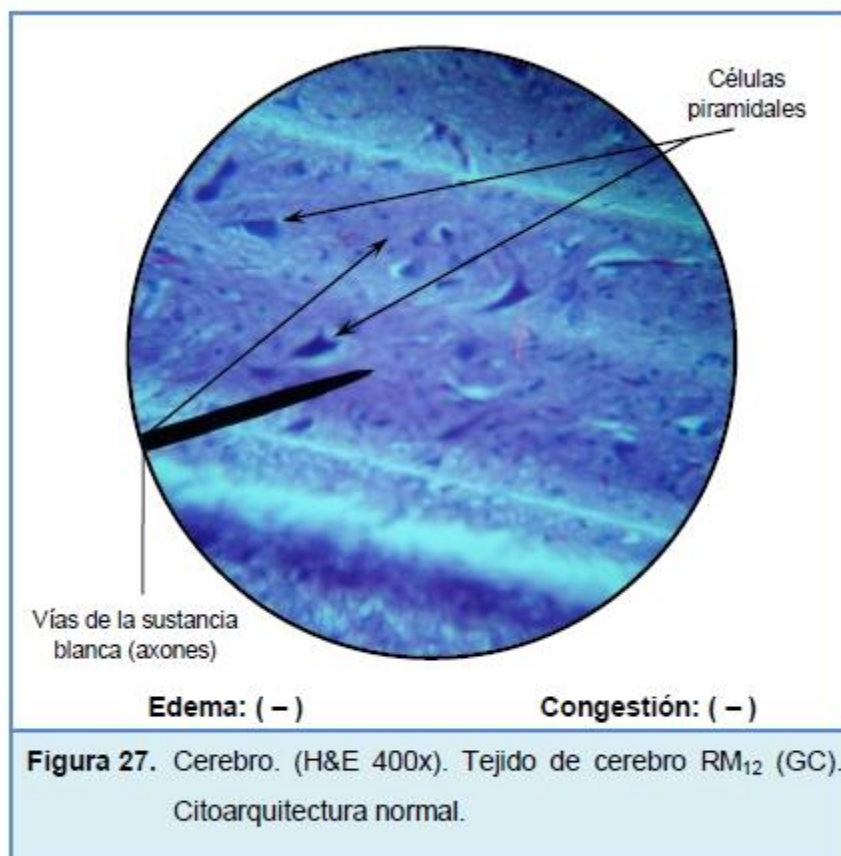


Figura 26. Comparación porcentual mediante diagrama de barras correspondiente a los edemas y congestiones hallados en los tejidos de cerebros y cerebelos de las ratas hembras del GE (G1) y GC (G3).

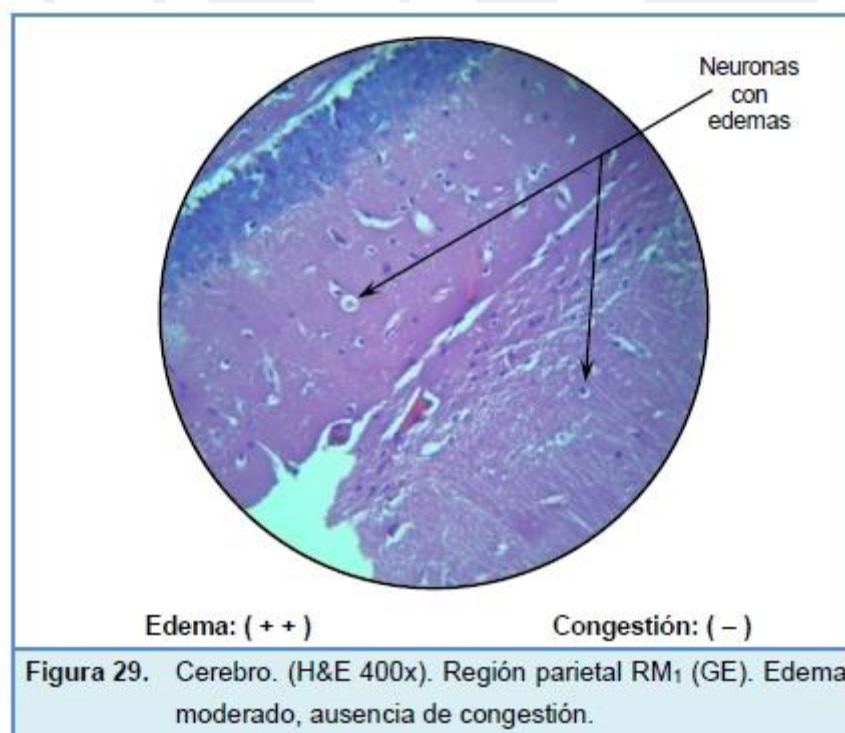
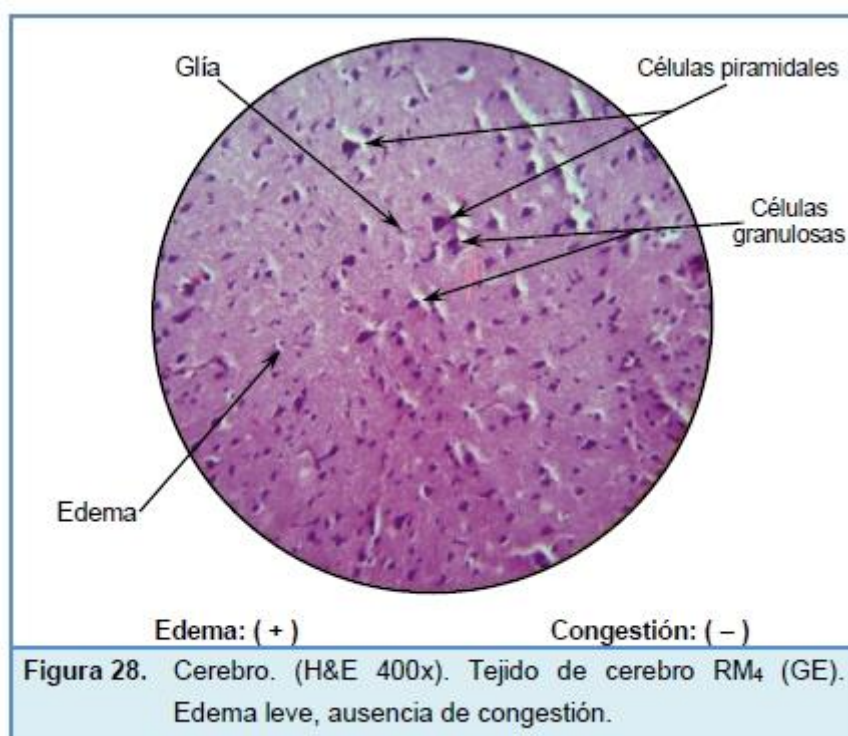
5.2.7. Análisis anatomopatológico de los tejidos nerviosos de los cerebros y cerebelos de las ratas machos

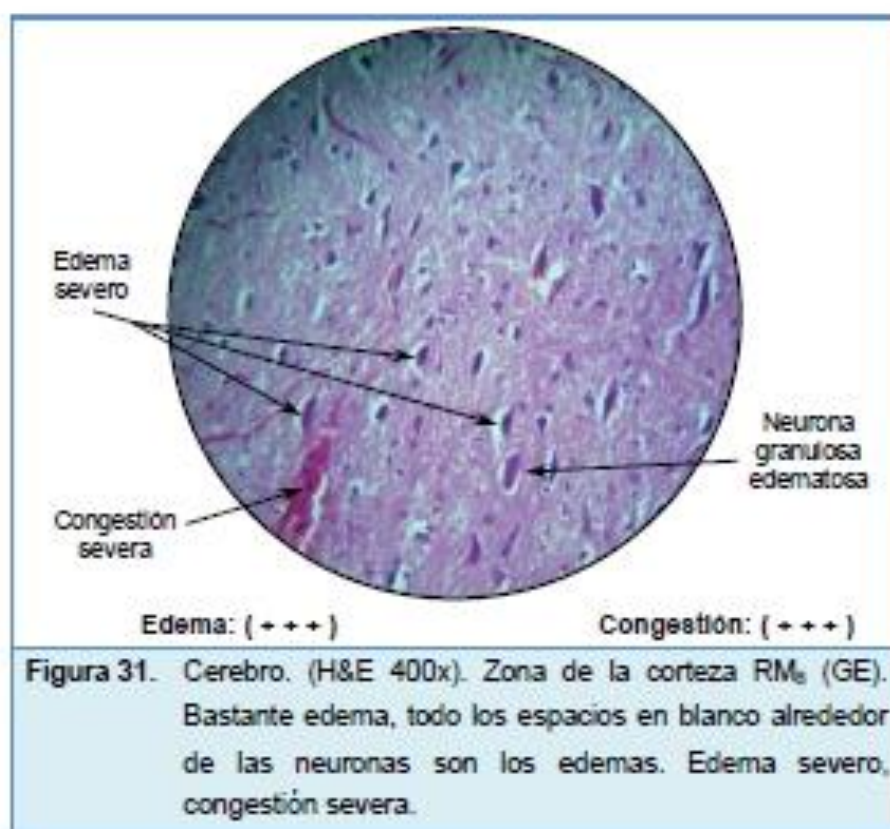
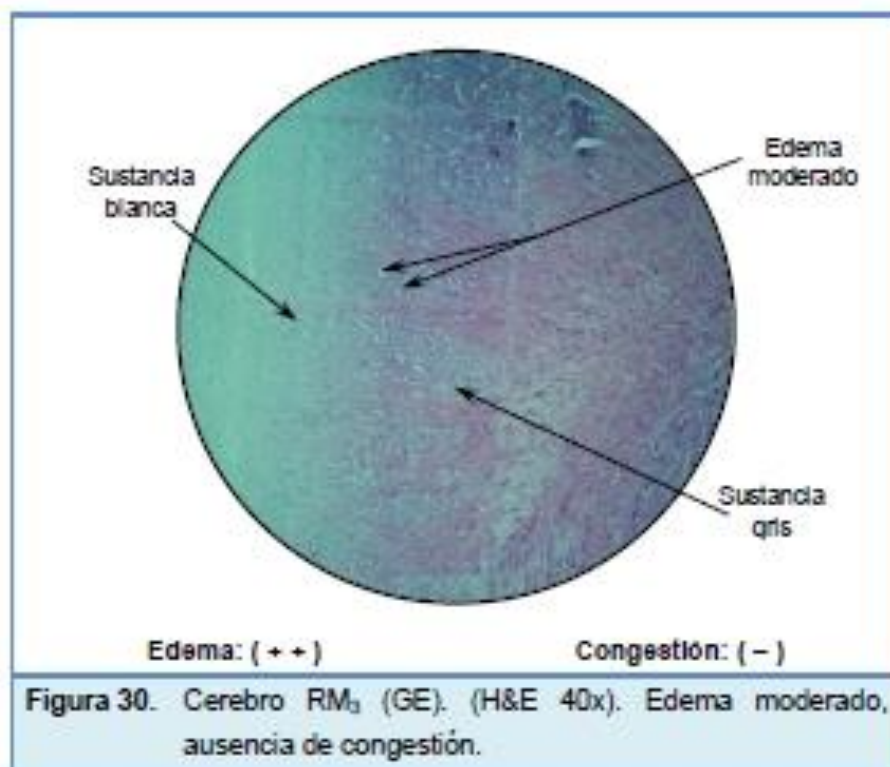
Microfotografías de los tejidos del cerebro y del cerebelo de las ratas machos del grupo control, a las cuales se les administró solo agua destilada 1 mL/100 g de peso corporal, comparado con las microfotografías de los tejidos del grupo experimental, tratados con el extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. ‘chinchilcuma’ a dosis única de 5000 mg/kg luego del día 14 de administración de la sustancia.

Tejido de cerebro de rata macho del grupo control

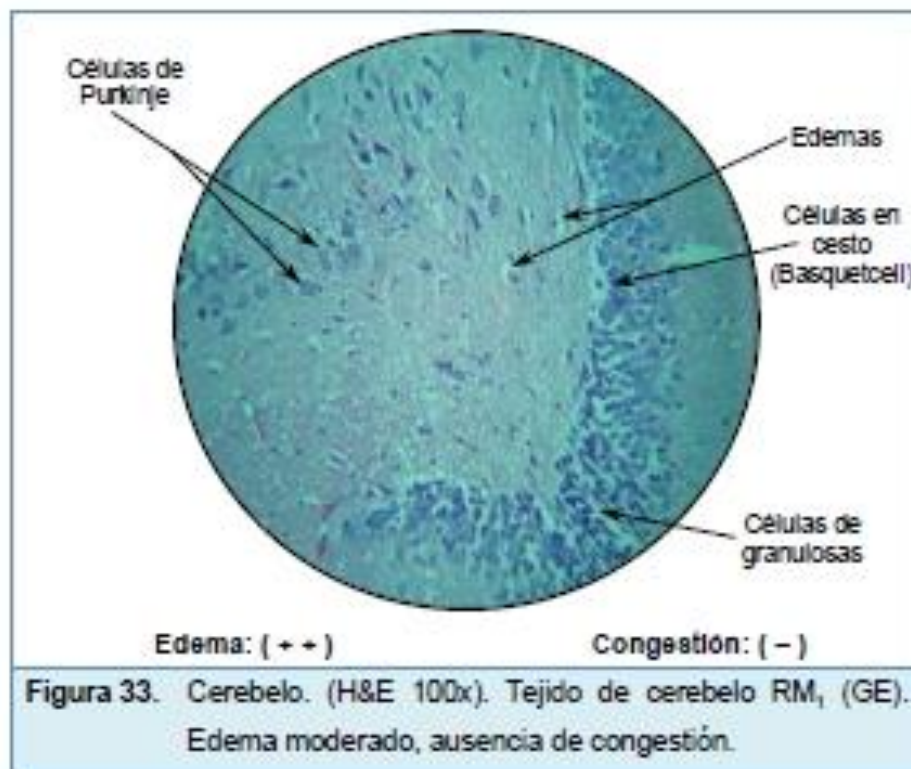
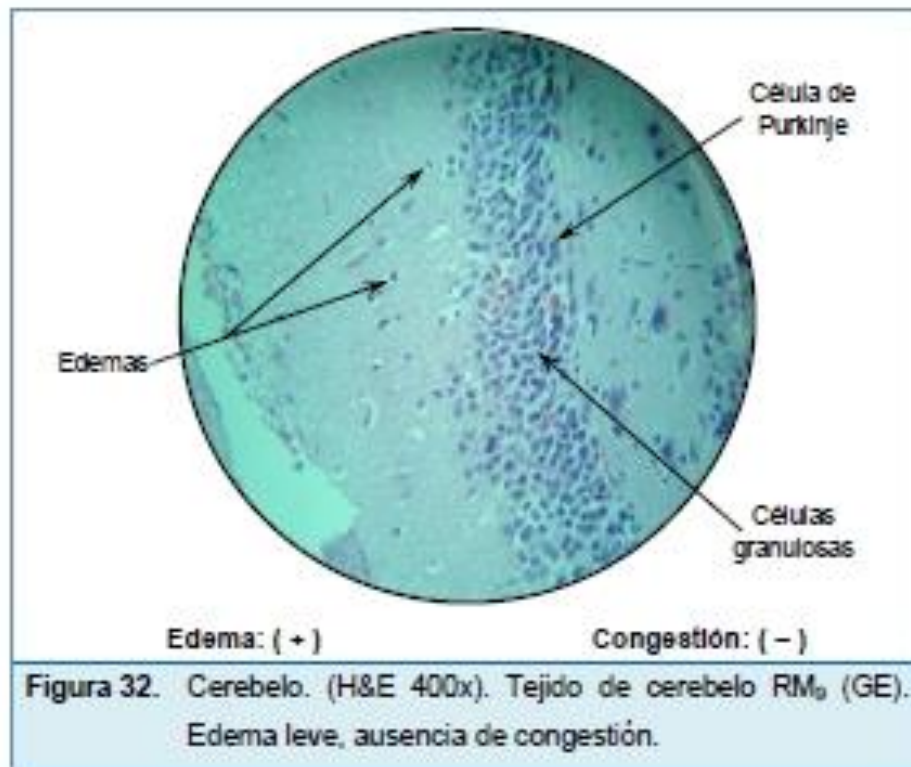


Tejidos de los cerebros de las ratas machos del grupo experimental
(figuras 28, 29, 30 y 31)





Tejidos de cerebelos de las ratas machos del grupo experimental
(figuras 32 y 33)



5.2.8. Análisis estadístico cualitativo de los tejidos nerviosos de cerebros y cerebelos de las ratas machos

Determinación cualitativa de las observaciones microscópicas

Tabla 21. Determinación cualitativa de los tejidos nerviosos de cerebros y cerebelos de las ratas machos del GE (G2) y GC (G4), luego del 14° día de la administración de 5000 mg/Kg de extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. "chinchilcuma".

ORGANO/ OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA	RATAS MACHOS											
	GRUPO EXPERIMENTAL (G2)										GRUPO CONTROL (G4)	
	RM ₁	RM ₂	RM ₃	RM ₄	RM ₅	RM ₆	RM ₇	RM ₈	RM ₉	RM ₁₀	RM ₁₁	RM ₁₂
CEREBRO:												
Edema	++	+	++	+	+	+	+	+++	+	+	-	-
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
CEREBELO:												
Edema	++	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Valores observados (variables cualitativas):

- Presencia: leve o escaso (+), moderado o discreto (++), severo (+++)
- Ausencia: no comprometido (-)

Distribución de frecuencias y representación gráfica de resultados (tabla 22 y figuras 34 y 35)

Tabla 22. Tabla de distribución de frecuencias de las variables cualitativas de los tejidos de cerebros y cerebelos de las ratas machos del GE (G2). Tabulación efectuada con los datos de la tabla 21.

VALORES OBSERVADOS			RATAS MACHOS DEL GRUPO EXPERIMENTAL G2															
			EDEMAS							CONGESTIONES								
			CEREBROS RM (G2)			CEREBELOS RM (G2)				CEREBROS RM (G2)			CEREBELOS RM (G2)					
X_n			f_i	h_i	$h_i\%$	f_i	h_i	$h_i\%$	f_i	h_i	$h_i\%$	f_i	h_i	$h_i\%$	f_i	h_i	$h_i\%$	
X_1	no comprometido	(-)	—	0	0,0	0%	{RH _{2,3,5-8} }	6	0,60	60%	{RH _{1-7,9,10} }	9	0,9	90%	{RH ₁₋₁₀ }	10	1	100%
X_2	Leve o escaso	(+)	{RH _{2,4-7,9,10} }	7	0,7	70%	{RH ₄ }	3	0,30	30%	—	0	0	0%	—	0	0	0%
X_3	Moderado o discreto	(++)	{RH _{2,3} }	2	0,2	20%	{RH ₁ }	1	0,10	10%	—	0	0	0%	—	0	0	0%
X_4	Severo	(+++)	{RH ₃ }	1	0,1	10%	—	0	0,00	0%	{RH ₃ }	1	0,1	10%	—	0	0	0%
TOTALES:			$n = 10$	1,0	100%	$n = 10$	1,0	100%	$n = 10$	1,0	100%	$n = 10$	1,0	100%	$n = 10$	1,0	100%	

Donde:

- X_n : Variables cualitativa (diferentes valores observados)
- f_i : Frecuencias absolutas (número de veces de observaciones)
- h_i : Frecuencias relativas (proporción)
- $h_i\%$: Frecuencias relativas porcentuales (porcentajes)
- $n = \sum f_i$: Número total de observaciones (sumatoria total de f_i)

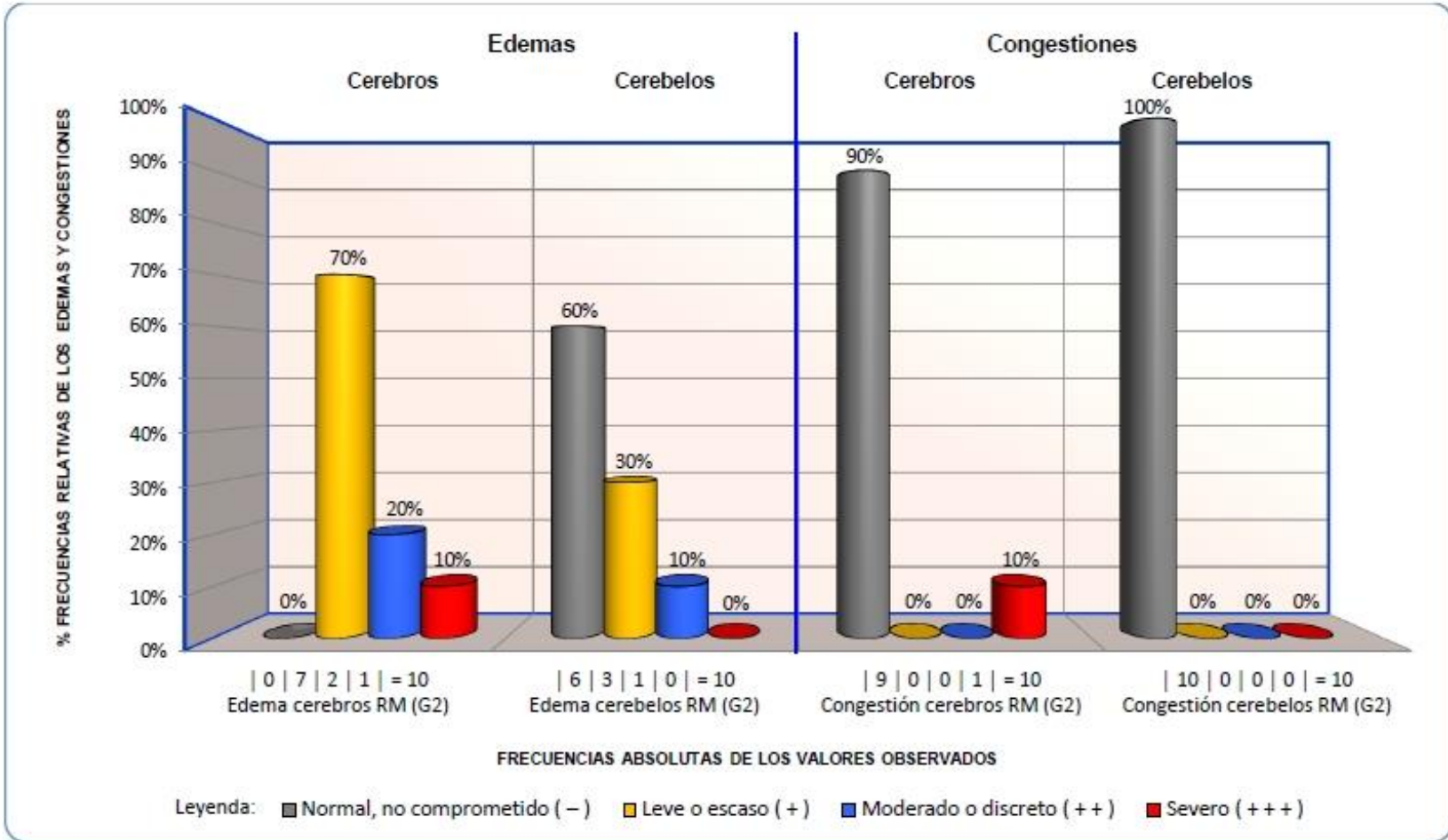


Figura 34. Representación gráfica de la distribución de frecuencias mediante diagrama de barras, correspondiente a la determinación cualitativa (valores observados) de los edemas y congestiones de los tejidos de las ratas machos del GE (G2).

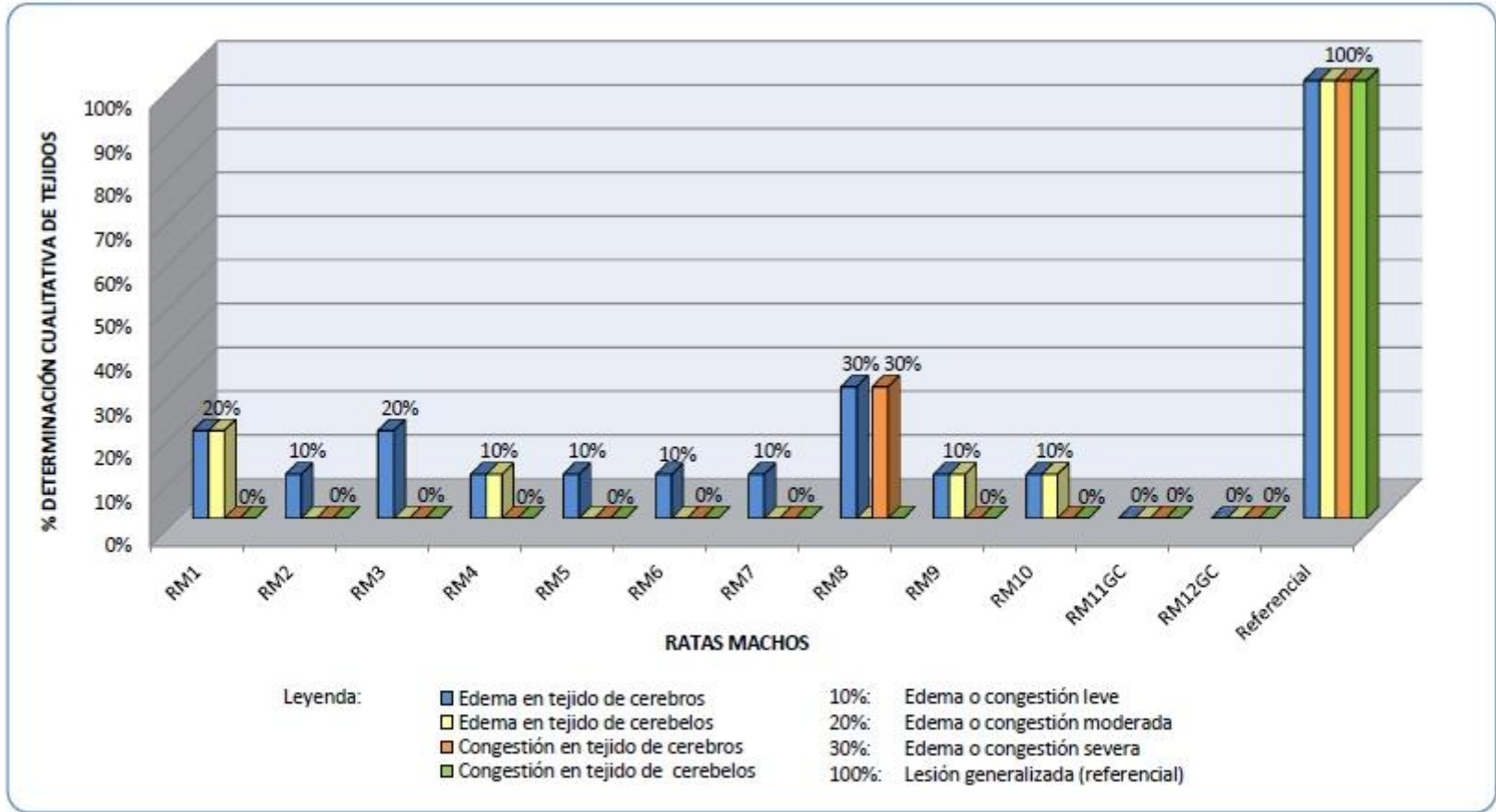


Figura 35. Comparación porcentual mediante diagrama de barras correspondiente a los edemas y congestiones hallados en los tejidos de cerebros y cerebelos de las ratas machos del GE (G2) y GC (G4).

5.2.9. Interpretación de resultados

En la figura 14, en el promedio de los pesos corporales de las ratas hembras del GE (G1), respecto del GC (G3) se observa un punto de inflexión que corresponde a un incremento de pesos en el sétimo día; sin embargo, este comportamiento de la curva de crecimiento, según el análisis estadístico de comparación de pesos corporales, no tiene diferencia significativa.

En la figura 16, el incremento progresivo del promedio de pesos corporales de las ratas machos del GE (G2), respecto del GC (G4), se mantiene constante, lo cual indica que se comportó acorde con la curva de crecimiento.

Según la tabla 20 y 22, distribución de frecuencias absolutas, los números de tejidos con mayor incidencia encontrados son 19 observaciones sin compromiso de congestión, 7 edemas leves y 6 sin edemas.

Según las tablas 20 y 22, de distribución de frecuencias absolutas, el número de tejidos con menor incidencia son tres edemas leves, tres edemas moderados y dos casos con edema y congestión fuerte, como máximo.

De acuerdo con los resultados que se aprecian en las figuras 26 y 35, definitivamente no existen grandes cantidades de edemas ni congestiones generalizadas que hayan causado daño a los 20 cerebros y cerebelos de las ratas durante la evaluación efectuada.

Los tejidos de cerebros y cerebelos del GC (G3 y G4) se encuentran en estado normal, tal como se observa en las figuras 18, 19, 23 y 27. La determinación cualitativa de los tejidos nerviosos que se detallan en las tablas 19 y 21.

La ausencia de efectos tóxicos (figuras 13, 15 y 17 y anexo 2) y la evidencia de que los animales no fueron afectados letalmente (tablas 18, 19 y 21), permiten afirmar que los edemas y las congestiones reversibles no son relevantes (figuras 26 y 35).

Según las variables cualitativas, se obtuvieron resultados favorables y no favorables (tablas 23 y 24).

Tabla 23. Interpretación según variables cualitativas correspondientes a los tejidos de cerebros y cerebelos de las ratas hembras del GE (G1).

INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA	FAVORABLE	NO FAVORABLE
$f_1 = 2 \rightarrow$ De las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, 2 no presentan edema	X	
$f_2 = 7 \rightarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, 7 tienen edema leve	X	
$f_4 = 1 \rightarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, 1 tiene edema moderado		X
$f_1 = 8 \rightarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebelos analizados, 8 no presentan edema	X	
$f_2 = 1 \rightarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebelos analizados, 1 tiene edema leve	X	
$f_4 = 1 \rightarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebelos analizados, 1 tiene edema moderado		X
$f_1 = 9 \rightarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, 9 no presentan congestión	X	
$f_2 = 1 \rightarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, 1 tiene congestión leve (RH ₇)	X	
$f_1 = 10 \rightarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebelos analizados, ninguno presenta congestión	X	

Tabla 24. Interpretación según variables cualitativas, correspondientes a los tejidos de cerebros y cerebelos de las ratas machos del GE (G2).

INTERPRETACIÓN ESTADÍSTICA	FAVORABLE	NO FAVORABLE
$f_2 = 7 \rightsquigarrow$ De las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, 7 tienen edema leve	X	
$f_3 = 2 \rightsquigarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, 2 tienen edema moderado		X
$f_4 = 1 \rightsquigarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, sólo 1 tiene edema severo (RM_8)		X
$f_1 = 6 \rightsquigarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebelos analizados, 6 no presentan edemas	X	
$f_2 = 3 \rightsquigarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebelos analizados, 3 tienen edema leve	X	
$f_3 = 1 \rightsquigarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebelos analizados, 1 tiene edema moderado	X	
$f_1 = 9 \rightsquigarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, 9 no presentan congestión	X	
$f_4 = 1 \rightsquigarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebros analizados, sólo 1 tiene congestión severa (RM_8)		X
$f_1 = 10 \rightsquigarrow$ de las 10 muestras de tejidos de cerebelos analizados, ninguno presenta congestión	X	

VI. DISCUSIÓN

En la evaluación realizada, la fisiología del crecimiento de las ratas del grupo experimental respecto al grupo control, el consumo de alimentos y la ganancia de pesos corporales, para las ratas machos no se vio alterada desde el inicio hasta el final del ensayo, encontrándose dentro de los parámetros normales según la curva de evolución para ratas; en tanto que para las ratas hembras en el sétimo día se observa un punto de inflexión creciente así como un punto de inflexión decreciente, lo que permite distinguir tres fases durante el proceso de crecimiento: una fase de crecimiento lento al inicio (pre-PVC), seguida de una fase de crecimiento acelerado (PVC) y de una última fase de desaceleración del crecimiento (pos-PVC). Estas variaciones son parámetros normales de la curva de evolución para ratas⁵⁵; por otro lado, el hecho de que a rata el peso de la rata hembra RH₈ disminuyera en el sétimo día en 2,7 g no tiene mayor relevancia, dado que ello representa una mínima proporción del material biológico animal (1:10). Según el análisis estadístico realizado en el programa SPSS versión 15, comparaciones múltiples de los pesos \bar{X} de la ratas hembras y machos se encuentran dentro de la zona de confianza (0,95), en tanto que las variaciones de peso se encuentran dentro de la zona de probabilidad de rechazo (0,05), lo que vale afirmar que no existe diferencia significativa (tablas 13 y 17).

Como los animales no pueden comunicar los síntomas, gran parte de las observaciones son solo signos perceptibles por el observador³⁵; sin embargo, en la revista Retel se menciona que los síntomas más comunes de toxicidad

aguda para roedores, según el método hacia arriba y hacia abajo, son náuseas, salivación, distensión abdominal, pérdida de equilibrio, dificultades respiratorias, convulsiones, postración y anorexia, administrándoles 2 mL de solución acuosa por 100 g de peso corporal a 2000 mg/Kg de dosis máxima de la sustancia. Asimismo, en dicha revista se visualizan imágenes de signos y síntomas de un estudio experimental de toxicidad aguda, tales como cianosis de patas, postración, hematuria, problemas en la marcha, ataxia, hemiplejia y piloerección³⁶. En el presente caso, los animales no mostraron signos perceptibles correspondientes a efectos de toxicidad aguda.

En la revista boliviana de química, publicada por Navarro, se menciona que en el ensayo de valoración de la toxicidad aguda del ácido úsnico en ratones Swiss albinos, a las cuatro horas de inoculación de 775 mg de sustancia, aparecieron signos de ataxia, con efectos letales 1:3, en 1000 mg 3:3 y a 2000 mg 3:3⁵⁶. En la presente evaluación, en los 14 días de observación no se presentaron evidencias de neurotoxicidad central aguda en cerebros o en cerebelos. La supervivencia de los animales fue de 100 %, no hubo muerte de ningún animal.

La encefalopatía tóxica por exposición a sustancias tóxicas puede producir trastornos celulares, vasculares o metabólicos, que alteran el funcionamiento del encéfalo y los procesos fisiológicos, comprometiendo la vida⁵⁷. En la evaluación realizada no hubo hallazgos de lesiones macroscópicas: todos los cerebelos y cerebros de las ratas hembras y machos estuvieron en buen estado.

Repetto señala que una dosis máxima tolerable es la cantidad máxima de sustancia que no produce la muerte de los animales de experimentación³⁵. El extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' cumple con este postulado.

Las observaciones microscópicas de los tejidos de cerebros y cerebelos solo fueron pequeñas cantidades de edemas y de congestiones reversibles, no son graves ni generalizadas, y van desde leve a moderado y, en algunos casos, graves. No representan hallazgos patológicos mayores que hayan causado daño de los órganos encefálicos. En consecuencia, el extracto hidroalcohólico no causó cambios anatomopatológicos (lesiones), degeneración celular

(tumefacción), ni destrucción de los tejidos evaluados (necrosis). Las neuronas y neuroglías se encontraron en buen estado. Los edemas y las congestiones obedecen a la ingesta del producto. Cualitativamente, hace suponer un inicio de toxicidad, calificada como una toxicidad leve. Bello afirma que una sustancia con valores elevados para la DL_{50} , indicadora de escasa toxicidad aguda, puede ser muy peligrosa cuando se absorbe en forma crónica; por ello, la evaluación de toxicidad aguda a dosis límite DL_{50} se utiliza como punto de inicio para la obtención de otros parámetros toxicométricos³⁸. Esta teoría permite continuar la evaluación del extracto hidroalcohólico estudiado.

Los valores de la DL_{50} dependen de factores como el sistema biológico o animal, la raza, el sexo, la edad, la dieta, la raza, etc. (idiosincrasia). La DL_{50} del DDT vía oral en ratas es de 87 mg/kg; en perros, de 150 mg/kg⁴⁰. Por lo tanto, las diferentes observaciones microscópicas se deben a la dosis respuesta según la sensibilidad de cada individuo. Para una extrapolación, ningún animal responde a los tóxicos exactamente igual que los hombres; sin embargo, cuando se expresa en función al peso corporal, los humanos son 10 veces más sensibles a los tóxicos que los animales (Klaaseen y Walkins, 2005)³⁹.

Las variables cualitativas y cuantitativas permitieron demostrar que la H_0 , que suponía causar efectos neurotóxicos en cerebros y cerebelos de ratas administrada a dosis única de 5000 mg/kg, queda rechazada. La hipótesis H_1 es aceptada; es decir, el extracto hidroalcohólico de hojas frescas de 'chinchilcuma' administrado a dosis única de 5000 mg/kg no causa efecto neurotóxico central en cerebros y cerebelos de ratas.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

Los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' encontrados son alcaloides, carbohidratos, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, triterpenos y/o esteroides, grupo amino libres y azúcares reductores.

De acuerdo con la evaluación efectuada, el extracto hidroalcohólico de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' administrado en dosis única de 5000 mg/kg de peso corporal no causó efectos neurotóxicos degenerativos directos en los cerebros y en los cerebelos de las ratas, ni alteración fisiológica de los animales de experimentación. Según el Sistema Global Armonizado (SGA), la DL_{50} se encuentra por encima de los 5000 mg/kg, y es "prácticamente no tóxica".

7.2. Recomendaciones

1. Si bien se pudo determinar mediante la evaluación de la toxicidad aguda de hojas frescas de *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma' que es "prácticamente no tóxica", se deben tomar en cuenta los edemas y las congestiones encontradas, por lo que se recomienda tener cuidado con la ingesta de esta especie vegetal en concentraciones elevadas. Del mismo modo, se debe dar un uso responsable a todas las especies vegetales.
2. Se recomienda efectuar estudios de toxicidad crónica, considerando el nivel sin efecto observable (NISEO) con otros animales de experimentación.
3. Realizar estudios fitoquímicos y toxicológicos comparativos con otras especies vegetales del género *Mutisia* o con variedades de *Mutisia acuminata* R. & P.
4. Dado que existen numerosos antecedentes por intoxicación de plantas aparentemente medicinales, se recomienda a la autoridad pública sanitaria difundir medidas preventivas sobre este tipo de intoxicación, con el fin de evitar pérdidas de vidas humanas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Bataller R. (2004). *Toxicología clínica*. Valencia: Romeus; pp. 203, 210-212, 216.
- 2 Hernández G. (2010). Ciclo de vida de los medicamentos. En Hernández G., Moreno A., Zaragoza F., Porras A. editores. *Tratado de medicina farmacéutica*. Madrid: Médica Panamericana; pp. 175-181.
- 3 Ferreyra R. & Macbride J. (1995). *Flora of Peru. Feldiana: Botany. Family Asteraceae*. Chicago: Field Museum of Natural History; 54(6): 54-63.
- 4 Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE/OECD).(2001). *Directrices para los ensayos de productos químicos. Toxicidad oral aguda. Directriz OCDE/OECD 423*. París: OECD Publishing.
- 5 Ensayos preclínicos. (2013). [Internet]. España: Grünenthal. [Citado el 10 de octubre de 2013]. Disponible en http://www.grunenthal.com/grt-web/Grunenthal_Pharma_S.A./I-D/De_la_Investigacion_al_Medicamento/Ensayos_preclinicicos/197600209.jsp
- 6 Merck Sharp & Dohme de España. (2013). Biología del sistema nervioso. Cerebro. En *Manual Merck de información médica para el hogar*. Madrid: Médica Panamericana.
- 7 Alper M. (2008). *Dios está en el cerebro*. Bogotá: Norma; p. 118.
- 8 Mendoza N. (2008). *Farmacología médica*. México D. F.: Médica Panamericana; pp. 102, 139-144.
- 9 Camacho L. & Uribe L. (1995). Caso clínico: intoxicación por agua de *Lupinus mutabilis* "chocho". *Boletín Sociedad Peruana de Medicina Interna*; 8(3-4): 35-37.
- 10 Mattos P., Cordero A. & Bartos A. (2007). Intoxicación por anís estrellado en un

- lactante menor. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*; 46(2): 105-107 [citado el 12 de diciembre de 2012]. Disponible en http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1024-06752007000200004&script=sci_arttext
- 11 Muñoz O., Montes M. & Wilkomirsky T. (2001). *Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología*. (2.^a ed.). Chile: Universitaria; pp. 77-79.
- 12 Villagran C. & Castro V. (2003). *Ciencia indígena de los Andes del norte de Chile*. Chile: Universitaria; p. 198.
- 13 Katinas L., Gutiérrez D., Grossi M. & Crisci J. *Asteraceae (Compositae)*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* [SciELO Scientific Electronic Library Online]. 2007; 42 (1-2): 129, 113-114 [Citado el 9 de julio de 2012]. Disponible en http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722007000100014
- 14 Papavero N. & Bousquets J. (2007). *Historia de la biología comparada. El siglo de las luces*. México: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); 8(4): 259, 135-162.
- 15 Linneo C. (el Joven). (1781). *Supplementum plantarum: Systematis vegetabilium editionis decimae tertiae*. Universidad de Harvard: Impensis Orphanotrophei; pp. 57,373.
- 16 Sagástegui A., Dillon M., Leiva S. & Lezama P. (1999). *Diversidad florística del norte del Perú*. (Tomo I). Trujillo: Arnaldoa; p. 100.
- 17 Brako L. & Zarucchi J. (1993). *Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Perú. Asteraceae*. Estados Unidos: Missouri Botanical Garden; pp. 156-157.
- 18 Calleja M. (1992). *Historia de la ciencia y de la técnica. La farmacia en ilustración*. Madrid: Akal; 31(22).
- 19 The Plant List. *A working list of all plant species* [Internet]. Missouri: Collaboration between the Royal Botanic Gardens, Kew and Missouri Botanical Garden. [Actualizado en 2010. Citado el 1 de noviembre de 2012]. Disponible en <http://www.theplantlist.org/tpl/search?q=Mutisia>

- 20 Asociación especializada para el desarrollo del Consejo Provincial de la Unión. (1998). *Estudio de la biodiversidad de la cuenca del Cotahuasi: flora medicinal*. Arequipa: Akuarella; p. 192.
- 21 Cerrate E. (1978). *Plantas medicinales*. Lima: El Pino; pp. 11-12.
- 22 Pardal R. (1998). *Medicina aborígen americana*. (2.^a ed.). España: Renacimiento; p. 173.
- 23 Ruiz H., Rodríguez R. & González A. (2007). *Relación del viaje hecho a los reinos del Perú y Chile*. Madrid: Catarata; p. 137.
- 24 Tovar O. & Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. (2001). *Plantas medicinales del valle del Mantaro*. Lima: Concytec; p. 44.
- 25 Sagástegui A., Sánchez I., Zapata M. & Dillon M. (2003). *Diversidad florística del norte del Perú*. (Tomo II). Trujillo: Upao; p. 79.
- 26 Ilse K., Diana C., Bernard J. & Sánchez J. (2000). *Plantas en la cultura andina*. Huancayo: Cedepas; pp. 34-37.
- 27 Remedios que nunca se acaban. [Internet]. Bolivia: Agrecolandes. [Actualizado en 2010. Citado el 11 de junio de 2012]. Disponible en <http://www.agrecolandes.org/files/departamentos/fichas/remedios.pdf>
- 28 Fernández E. (2006). *Catálogo florístico del jardín botánico Martín Cárdenas*. Cochabamba, Bolivia.
- 29 Beltrán H. (2006). *Certificación Botánica de la Mutisia acuminata R. & P. "chinchilcuma"*. Lima.
- 30 Vicuña Z. (2011). *Inventario de plantas medicinales del Tahuantinsuyo*. (Tomo I). Lima: Cesis; p. 403.
- 31 Arce C., Cárdenas G., De la Rosa C. & Uriondo K. (2010). *Actividad antiinflamatoria tópica de hidrogeles elaborados con extractos de Mutisia acuminata R. & P. "chinchilcuma"*. [Internet]. Lima. [Actualizado en 2010. Citado el 17 de julio de 2012]. Disponible en <http://www.encuentrocientificointernacional.org/ECI2010v/ECi2010vresumen.htm>
- 32 Cifuentes M., Sola J., Paredes H., Bedoya J. & Sánchez J. (1992). *Medicina andina: situaciones y respuestas*. Quito: Centro Andino de Acción Popular (CAAP); p. 208.

- 33 De Pardo E., Monroy M. & Copali D. (2009). Sustancias folclóricas como causa de Intoxicación por sustancia desconocida en terapia intensiva del "Hospital Pediátrico Manuel Asencio Villarroel" (2003-2008). *Gaceta Médica Boliviana*; 32(2): 17-22 [Citado el 25 setiembre de 2012]. Disponible en http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S1012-29662009000200004&script=sci_abstract
- 34 Bello J. & López de Cerain A. (2001). *Fundamentos de ciencia toxicológica*. Madrid: Díaz de Santos; p. 41.
- 35 Repetto M. & Repetto G. (2009). *Toxicología fundamental*. (4.^a ed.). Madrid: Díaz de Santos; p. 244.
- 36 Arencibia D. & cols. (2009). Toxicología experimental: toxicidad aguda. Servicio de Toxicología del sanatorio de niños Sertox, Argentina. *Revista de toxicología en línea Retel*; 22(1): 1-15 [Citado el 4 marzo de 2012].
- 37 United Nations. (2006). Sistema global armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Estados Unidos: United Nations Publications; pp. 115 y 460.
- 38 Betés M., Duran M., Mestres C. & Nogués M. (2009). *Farmacología para fisioterapeutas*. Madrid: Médica Panamericana; pp. 1 y 2.
- 39 Thibodeau G. & Patton K. (2008). *Estructura y función del cuerpo humano*. (13.^a ed.). Barcelona: Elsevier Mosby; p. 201.
- 40 Kalat J. (2004). *Psicología biológica*. (8.^a ed.). Universidad de Carolina del Norte: Paraninfo; pp. 109,110.
- 41 Costa J., Madrid J. & Zamora S. (1993). *Manual de clases prácticas de fisiología animal*. Murcia: Universidad de Murcia; p. 23.
- 42 Wingerd B. (1988). *Rat Dissection Manual*. Baltimore & London: The Johns Hopkins University Press; p. 68.
- 43 Ross M. & Pawlina W. (2008). *Histología*. (5.^a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana; pp. 3, 6.
- 44 Welsch U. & Sobotta J. (2009). *Histología*. (2.^a ed.). Madrid: Médica Panamericana; pp. 4, 5.

- 45 Rodríguez G. & Pinto R. (2006). *La lepra*. Colombia: Universidad Nacional de Antioquía; p. 156.
- 46 Sabnis RW. (2010). *Handbook of Biological Dyes and Stains: Synthesis and Industrial Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons; p. 223.
- 47 Miranda M. (2002). *Métodos de análisis de drogas y extractos*. Ciudad de La Habana. Cuba.
- 48 Lock de Ugaz O. (1994). *Investigación fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales*. (2.^a ed.). Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; pp. 1-11, 92, 94, 98.
- 49 Bruneton J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica y plantas medicinales*. (2.^a ed.). Zaragoza: Acribia; pp. 317, 321.
- 50 Miján A. (2002). *Técnicas y métodos de investigación en nutrición humana*. Barcelona: Glosa; pp. 113-132.
- 51 National Research Council. (1996). *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. (7.^a ed.). Washington DC: National Academies Press.
- 52 Bermejo J. y cols. (2006). *Técnico especialista en anatomía patológica del servicio gallego de salud*. Sevilla: MAD; p. 312.
- 53 Cediel J. y cols. (2009). *Manual de histología: tejidos fundamentales*. Colombia: Universidad del Rosario; pp. 35-41.
- 54 Sharapin N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santafé de Bogota D. C.: Secretaría Ejecutiva del Convenio Andrés Bello; p. 198.
- 55 Cossio M., Gómez R., Pilco S., Lancho J. & De Arruda M. (2012). Propuesta de una ecuación lineal para valorar la velocidad de crecimiento somático a partir de la masa corporal de ratas machos Wistar. *Anales de la Facultad de Medicina de la UNMSM*; 73(2).
- 56 Navarro E., Ávila J., Mollinedo P., Vila J. & Ruiz G. (2010). Valoración de la toxicidad aguda *in vivo* del ácido úsnico (*Usnea spp.*). *Revista Boliviana de Química*; 27(1): 1-5. [Citado el 5 marzo de 2012].
- 57 Encefalopatía tóxica. (2008). [Internet]. Colombia: Gouzy A. [Actualizado en 2008. Citado el 10 de enero de 2012]. Disponible en <http://www.udca.edu.co/component/k2/item/42-encefalopatia-toxica.html>

ANEXOS

Anexo 1. Certificación botánica de la especie vegetal *Mutisia acuminata* R. & P. 'chinchilcuma'

HAMILTON W. BELTRAN S
CEREBELER STRASSE 11
Calle Alfredo Naves No. 290
Miraflores - San Miguel
whilanzan@netmail.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo Colegiado quien suscribe CERTIFICA que, la muestra botánica de la planta conocida como "CHINCHILCUMA", proporcionada por la Srta. JUANA ELVIRA CHAVEZ FLORES, ha sido estudiada científicamente y determinada como Mutisia acuminata, y de acuerdo al Sistema de Clasificación de A. Cronquist et al 1981, se ubica en las siguientes categorías taxonómicas:

DIVISION	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Asteridae
ORDEN	: Asterales
FAMILIA	: ASTERACEAE
GENERO	: <u>Mutisia</u>
ESPECIE	: <u>Mutisia acuminata</u> R. & P.

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

Lima 15 Agosto 2006


Blgo. HAMILTON BELTRAN

Hamilton W. Beltran S.
Biólogo - Científico
C.R.P. 2719

Anexo 2. **Formato de registro de exámenes físicos efectuados durante la evaluación de la toxicidad aguda³⁸**
(para cada animal)

FECHA DE INICIO DEL EXAMEN:

CÓDIGO:

ESPECIE:

SEXO:

DOSIS:

OBSERVACIONES	PERIODO DE EVALUACIÓN (DÍA)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A) ASPECTO FÍSICO:														
1. Posiciones extrañas														
2. Posición de la cola, orejas														
3. Salivación														
4. Lacrimo														
5. Moqueo														
6. Excretas														
B) COMPORTAMIENTO:														
7. Agresividad														
8. Consumo agua / alimentos														
C) EXÁMENES FÍSICOS:														
9. Tono muscular (grado de tensión muscular)														
10. Temblores musculares														
11. Convulsiones														
12. Parálisis														
13. Catatonía (rigidez muscular)														
14. Alteración de reflejos														
15. Tamaño de pupila														
16. Opacidad corneal														
17. Sensibilidad al dolor														
18. Lesiones en la piel														
D) AUTOPSIA DE ANIMALES SACRIFICADOS:														
19. Exámenes macroscópicos de los órganos														

Legenda: N: No comprometido, no presenta signos:

(P): presenta signos:

Anexo 3. **Formato de control y evolución de pesos corporales**

FECHA DE CONTROL: 1^{er} día:

7^o día:

14^o día:

DOSIS:

ESPECIE ANIMAL:

PESO RATAS HEMBRAS				PESO RATAS MACHOS			
Código (RH _n)	1 ^{er} día (g)	7 ^o día (g)	14 ^o día (g)	Código (RM _n)	1 ^{er} día (g)	7 ^o día (g)	14 ^o día (g)
RH ₁				RM ₁			
RH ₂				RM ₂			
RH ₃				RM ₃			
RH ₄				RM ₄			
RH ₅				RM ₅			
RH ₆				RM ₆			
RH ₇				RM ₇			
RH ₈				RM ₈			
RH ₉				RM ₉			
RH ₁₀				RM ₁₀			
RH ₁₁				RM ₁₁			
RH ₁₂				RM ₁₂			

Leyenda: RH: rata hembra
 RM: rata macho
 n: número de rata

Anexo 4. Figuras de las actividades realizadas durante el bioensayo experimental



Figura 1. Autopsia de ratas albinas cepa Holtzmann para la extirpación de cerebros y cerebelos.



Figura 2. Agradecimiento especial a la Dra. Juana Chávez Flores, por el asesoramiento brindado en la investigación experimental realizada por el Br. Edgar Fortuna García.



Figura 3. Observación microscópica de los tejidos de cerebros y cerebelos de las ratas albinas cepa Holtzmann en el Laboratorio Central de Patología Clínica del Hospital Nacional Arzobispo Loayza.



Figura 4. Agradecimiento al Dr. Anatomopatólogo Ernesto Raez Gonzales, por su valiosa participación del durante los análisis microscópicos efectuados a los tejidos de cerebros y cerebelos de ratas, así como en la interpretación de resultados.