

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Pelargonium robertianum* L, «Geranio», EN *Mus musculus*.

Lucy A. Ibáñez V.\*

### RESUMEN

El presente estudio ha permitido evaluar la DL50 y la DE50 (dosis efectiva promedio) del efecto antiinflamatorio del extracto metanólico de las hojas de *Pelargonium robersitanum* L «Geranio». Para evaluar la DL50; se utilizaron 36 ratones divididos en grupos de 6 animales. Administrándose dosis diferentes del extracto metanólico por la vía oral por medio de sondas intragástricas, estando en observación durante 24, 48 y 72 horas, después de la administración. El valor de la DL50 fue de: 8,717.02 mg/kg, realizada por el Método de Lichfield y Wilcoxon.

También se evaluó la dosis DE50, siguiendo la técnica de Winter y Sughisita; para esta prueba fueron utilizados 50 ratones albinos machos cuyos pesos oscilaban entre: 200 a 250 g; los cuales fueron divididos al azar en 5 grupos de experimentación:

I Grupo: Control Negativo (agua destilada, 3 ml/kg); II Grupo: Control Positivo (Diclofenaco, 10 mg/kg); al III, IV y V Grupos se les administró: 250, 500 y 1000 mg/kg, respectivamente. La administración fue hecha por vía oral 30 minutos antes de inyectarle en la región subplantar 0,1 mL de carregenina al 1% en la pata posterior derecha y en la pata posterior izquierda igual volumen de solución salina al 0,9%, observándose que el extracto metanólico presenta un efecto inhibitorio en comparación con el efecto antiinflamatorio presentado por el diclofenaco (62%), obteniéndose porcentajes de: 26, 38 y 57% para las diferentes dosis y la DE50 ha sido de: 681,9577 mg/kg, realizada por el Método de Probitz y ANOVA ( $p=A.0001$ ,  $F=5240$ ,  $R^2=0,9979$ ).

En el extracto bioactivo se encontraron compuestos fenólicos tales como flavonoides: Rutina y Quercetina por medio de: HPLC y TLC; inhibidores de la ciclooxigenasa causante de los procesos inflamatorios.

También se encontraron alcaloides, denominados por: GM1, GM2, GM3, los cuales fueron analizados por medio de: IR, HPLC, RMNCI3, RMHNI.

**Palabras Claves:** Antiinflamatorio, *Pelargonium robertianum* L, Geranio, Diclofenaco, Inflamación, toxicidad, DL50, DE50, Screening Fitoquímico, HPLC, RMNCI3, RMNH1, IR, Alcaloide, Flavonoide, Rutina, Quercetina.

### ABSTRACT

The purpose of the present investigation has been to evaluate DL50 and effective dose average DE50 of antiinflammatory effect of the methanolic extract of the leaves of *Pelargonium robertianum* L. «Geranio». To evaluate the DL50, 36 mice were used and divided in groups of 6 animals; administered doses different from the methanolic extract by oral route by means of intragastric cannulas, observed constantly during the firsts 24, 48 and 72 hours. The value of the DL50 was of 8,717.0 mg/kg by Lichfield and Wilcoxon Method. Also to evaluate the DE50, following Winter and Sughisita technique, 50 male albino rats. The weight average ranged between 200 to 250 g. and were divided randomly in 5 groups of experimentation: I G, Negative Control (Distilled Water, 3 ml/kg); II G, Positive control (Diclofenac, 10 mg/kg); III, IV and V Groups were given 250, 500 y 1000 mg/kg respectively. The administration was made by oral route 30 min before the subplantar injection of 0,1 milliliter of 1% carragenan in the posterior right leg and in the opposite leg an equal volume of 0.9% saline solution. Observing that the methanolic extract presented an inhibitory effect in comparison to inflammation presented by Diclofenac (62%)

\* Facultad de Medicina Humana. Instituto de Investigación, Centro de Investigación de Medicina Tradicional Andina. USMP

obtaining the 26;38 and 57% for the different doses and the Average Effective Dose has been of 681,9577 by the method of Probst and ANOVA ( $p=0.0001$ ,  $F=5240$ ,  $R^2=0.9979$ ). In the bioactive extract finding the following were found phenolics as compounds flavonoids: Rutin and Quercetin, inhibitors of the ciclooxigenase observed by HPLC y TLC respectively and alkaloids named: GM1, GM2, GM3, has been analyzed by means of IR, HPLC, RMNC13, RMNH1.

**Keys Word:** *Pelargonium robertianum* L *Geranium*. Diclofenac, inflammation, toxicity, DL50, DE50, Screening, Phytochemical, HPLC, RMNC13, RMNH1, IR, Alkaloid, flavonoids, Rutin, quercetin.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades que cursan con inflamación aguda o crónica se han convertido en problemas de salud pública mundial para los cuales es urgente contar con nuevos fármacos para su control y/o tratamiento. Entre las estrategias que se han seguido para lograr este objetivo está la de explorar las propiedades de numerosos extractos y compuestos de origen vegetal (1).

La fitoterapia, en países en vías de desarrollo como el nuestro, es una alternativa a la crítica situación económica de la gran mayoría de la población; siendo ventajosa y natural por las virtudes de muchas plantas medicinales nativas y/o adaptadas, reconocidas a través de investigaciones químicas, farmacológicas y seguimiento clínico (2).

Actualmente es necesario aplicar los conocimientos a fin de evaluar con rigor científico, la eficacia y seguridad de una planta a la cual se le atribuyen ciertas propiedades a fin de obtener un fitomedicamento que cuente con estudios que le proporcionen mayor credibilidad y pueda ser utilizado en fitoterapia (3).

Un ejemplo es *Pelargonium robertianum* L, «Geranio», que es una planta que se encuentra en patios, jardines, lugares sombreados, distribuyéndose en regiones templadas y en zonas tropicales, su deliciosa fragancia floral hace que sea un placer utilizarla en aceite ya sea sola o junto con otros aromas; se dice que equilibra la naturaleza pasiva-agresiva, mejora las relaciones pobres e incrementa la percepción de tiempo-espacio (4).

Las patologías más comunes tratadas con esta planta en la medicina tradicional son los procesos inflamatorios de diversa índole que producen signos y síntomas en órganos y/o sistemas tales como: artritis, inflamaciones dérmicas y en vías genitourinarias, afecciones de la garganta, además de tener uso como antiespasmódico y

antihemorrágico (5, 6, 7). Generalmente se prepara una infusión de hojas y/o flores al 1% es decir 10g en 1 litro de agua y de esta solución se toman 2 a 3 tazas diarias (8). La tintura de geranio casera fue descrita por Font Quer (9).

En este estudio se evaluó la inocuidad del extracto metanólico de *Pelargonium robertianum* L, con el fin de ser usado en el tratamiento de enfermedades que implican mecanismos inflamatorios hallando en primer lugar la Dosis Letal Media (DL50) por medio del Método de Litchfield y Wilcoxon, teniendo en cuenta el criterio de Williams(17) y la Dosis Efectiva Media (DE50) del efecto antiinflamatorio de acuerdo al modelo de Winter y Sughisita, así como determinar los constituyentes químicos usando técnicas de TLC, HPLC, IR, RMNH1 y RMNC13.

## MATERIAL Y MÉTODOS

- *Pelargonium robertianum* L, «Geranio»
- Ratones, *Mus musculus* cepa Balb C53 de ambos sexos de dos meses de edad de 20 a 25 g de peso corporal promedio.
- Ratas albinas consanguíneas cepa Holtzman, de ambos sexos, de 4 meses de edad con 250g de peso corporal promedio.

### Toma de muestra

Se recolectó 1 kg de hojas de Geranio, en la provincia de Lima, en el mes de setiembre siendo identificada taxonómicamente como *Pelargonium robertianum* L, las cuales fueron estabilizadas por medio de secado en estufa a una temperatura no mayor a 40°C por 7 días, posteriormente se pulverizaron y se pesaron 400g de hojas secas y molidas procediéndose a la obtención del extracto metanólico al 10% p/v, por maceración a temperatura ambiente por 8 días después de los cuales fue filtrado y evaporado.

### Evaluación de la Dosis Letal Media (DL50)

Se utilizaron 36 ratones albinos procedentes del Instituto de Salud los cuales fueron mantenidos a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C con un ciclo de luz/oscuridad. La alimentación consistió en alimento balanceado y agua a voluntad. Se formaron grupos de seis animales cada uno. Las diferentes dosis del extracto metanólico se administraron por vía oral mediante cánula intragástrica con previo ayuno de 12 h. Se observaron a las 24 h, 48 h y 72 h. El valor de la DL50 se estimó mediante el método estadístico de los Probits (10,11).

### Evaluación de la Dosis Efectiva Media (DE50)

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de las hojas frente al edema experimental por carragenina según lo descrito por Winter, Sughisita y col. (22), para evaluar la Dosis Efectiva Media (DE50).

Para la preparación de las soluciones del extracto metanólico se disolvieron 30 g. en 60 ml de agua destilada obteniéndose una concentración de 500 mg/ml.

Se utilizaron 50 ratas las cuales fueron divididas en 5 grupos de ensayo con diez animales cada uno: GI Control Negativo (Agua destilada 3ml/kg); GII Control positivo (Diclofenaco, 10mg/kg), a los grupos III, IV y V se les administró 250, 500 y 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Pelargonium robertianum* L, respectivamente. La administración se realizó por vía oral 30 minutos previos a la inyección subplantar de 0.1 ml de carragenina al 1% en la pata derecha posterior y en la pata contralateral igual volumen de solución salina al 0.9%. Siendo calculado el porcentaje de inhibición del edema mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = (\text{Acpv} - \text{Atpv}) / \text{Acpv}$$

**Acpv**, incremento en el volumen de la pata en las ratas controles;

**Atpv**, incremento en el volumen de la pata en las ratas tratadas.

Los resultados fueron procesados estadísticamente. La estimación de la Dosis Efectiva Media (DE50) se ha realizado mediante el método de los Probits (9, 17, 18,19, 20, 21, 22, 23).

### Evaluación Fitoquímica

Se realizó en primer lugar un screening fitoquímico con el extracto metanólico totalmente seco a fin de evaluar la presencia de alcaloides, cumarinas, quinonas, triterpenos, esteroides, flavonoides, etc, utilizando los respectivos reactivos de coloración y precipitación, procediendo de acuerdo al método descrito por Ciulei (12), adaptada en el Laboratorio del Centro de Investigación de Medicina Tradicional Andina de la Facultad de Medicina de la USMP por ofrecer mayor reproducibilidad y ser de fácil ejecución permitiendo determinar la presencia de los principales grupos de compuestos químicos, tanto libres como en la forma de glicósidos.

Al observarse en el screening fitoquímico la presencia de flavonoides por medio de la prueba de Shinoda (13), se procedió a analizar la presencia del flavonoide Rutina en el extracto metanólico por HPLC e IR. El análisis por HPLC se realizó en un equipo L-7100, frente a un estándar de Rutina en presencia de Ac. Acético 0,025% (solvente A) y Metanol (Solvente B) con un flujo de 2 ml/min y un volumen de inyección de 5,0 µl y 80 µl de extracto metanólico de Geranio siguiendo el método de Merck descrito para el análisis de un flavonoide (14,15). El análisis por IR se realizó por película. La presencia de Quercetina fue detectada por TLC.

Para el aislamiento y la identificación de otros principios activos presentes en el extracto metanólico con actividad farmacológica, se sometió a un procedimiento para eliminar la clorofila filtrando con carbón activado. Para ello el extracto se disolvió en acetato de etilo (42 ml de acetato de etilo por 1 g de extracto) y se le agregó carbón activado (2,6 g de carbón activado por 1 g de extracto; se calentó en baño de agua a 37 °C durante 10 minutos a partir de la primera ebullición del extracto. Se filtró al vacío en un embudo de Buchner con una capa de celita lavada, el filtrado se concentró en rotavapor. La mezcla de alcaloides se separó por cromatografía en capa fina (CCF). El carbón que quedó en el embudo se lavó varias veces con acetato de etilo, con el fin de recuperar la mayor cantidad de la mezcla de alcaloides. El extracto sin clorofilas se sometió a Cromatografía en Columna (CC) para la separación de los alcaloides. En esta técnica, el extracto se preadsorbió en celita en una proporción 1:5. Como fase estacionaria se utilizó silicagel en una proporción 1:30 (Sílica gel 60, 0.2-0.5, Merck). Se eluyó

cambiando la polaridad gradualmente con una mezcla de hexano, acetato de etilo, metanol, en diferentes proporciones (de 9:1:0 hasta 0:1:9). De la CC se obtuvieron las fracciones GM1, GM2, GM3, GACH6 y GACH7. Estas fracciones han sido cromatografiadas en un sistema de solventes Acetona/acetato de etilo 75:25.

Frente al reactivo de Dragendorff, GM1,GM2 y GM3, mostraron reacción positiva para alcaloides, y frente al reactivo de cloruro férrico, las fracciones GACH6 y GACH7, mostraron reacciones positivas para compuestos fenólicos observándose manchas azules (15,16). Posteriormente se han realizado los análisis espectroscópicos por IR y RMNH1 para las fracciones GM1 (Alcaloide), GM2 (Alcaloide), GM3 (Alcaloide), GACH6 (Flavonoide), GACH7 (Flavonoide) realizándose el análisis por RMNC13 para GACH6 (Flavonoide) y CACH7 (Flavonoide) en un equipo Varian-Gemini 200 MHz-1.

RESULTADOS

Dosis Letal Media (DL50) según Lichfield y Wilcoxon

Los síntomas observados a las dosis administradas han sido sedación, caída del tren posterior, ojos cerrados y respiración acelerada.

La DL50 se ha determinado a partir de los porcentajes de mortalidad obtenidos por cada dosis ensayada hallándose un valor igual a 8,717.02 mg/kg con límite superior 95% = 11,500 mg/kg y límite inferior 95%= 6,500 mg/kg (Fig. N 1).

Tabla N.º 1: Estimación de la Dosis Letal Media del extracto metanólico de hojas de *Pelargonium robertianum* L.

Dosis	Mortalidad		
	24h	48h	72h
mg/kg			
2000	0/6	0/6	0/6
4000	1/6	1/6	1/6
8000	2/6	2/6	2/6
10000	3/6	3/6	3/6
12000	4/6	4/6	4/6
16000	6/6	6/6	6/6

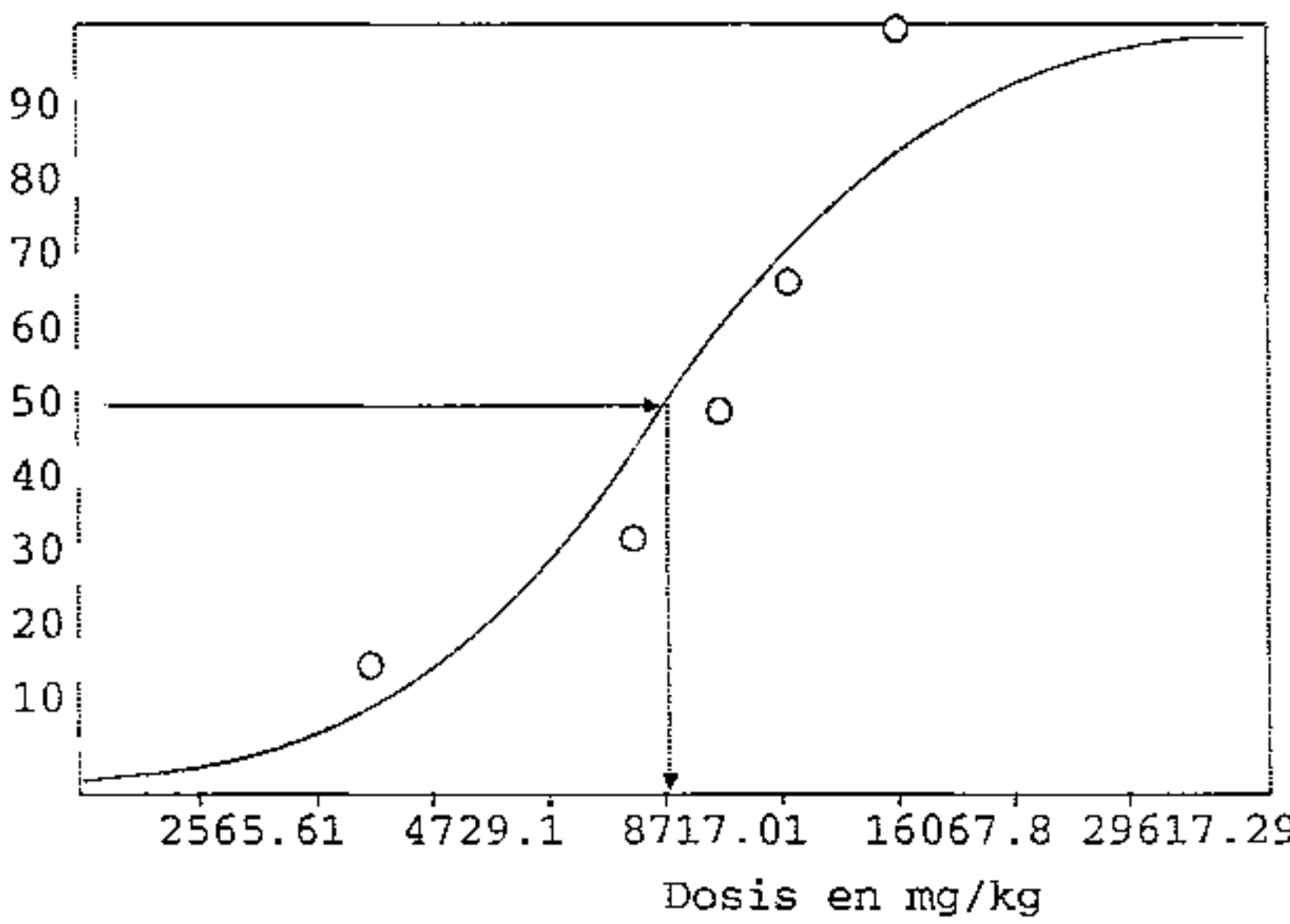


Figura N.º 1. Dosis Letal Media del ext. met. de hojas de *Pelargonium robertianum* L.

Dosis Efectiva Media (DE50) , por el edema de pata, según el Método de Winter, Sughisita y col.

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se tomaron en cuenta los valores de la diferencia entre los volúmenes de las patas por grupo de ensayo, los cuales aparecen en la Tabla N.º 2.

Los grupos tratados con el extracto poseen valores apreciablemente menores con respecto al grupo control.

Al realizar el análisis estadístico de los probits, se ha encontrado que existen diferencias significativas entre las respuestas a las diferentes sustancias ensayadas. En la Fig. N.º 2 se puede observar el porcentaje de inhibición de la formación del edema por grupo de tratamiento siendo el efecto inhibitorio mayor cuando se incrementa la dosis, siendo dosis dependiente, mostrando la dosis más alta un efecto inhibitorio similar al obtenido con el diclofenaco. En la Fig. N.º 3 se observa el valor de la DE50 por el Método de los Probits igual a 681.95 mg/kg.

Tabla N.º 2: Porcentaje de inhibición de la inflamación del extracto metanólico de hojas de Geranio.

Grupo	Dosis Mg/kg	Promedio de volumen desplazado	Porcentaje de Inhibición de la inflamación
I (Agua)	3 ml/kg	0.65+0.0001	0%
II (Dicl.)	10 mg/kg	0.25+0.0001	62%
III (Ger.)	250 mg/kg	0.48+0.0001	26%
IV (Ger.)	500 mg/kg	0.40+0.0001	38%
V (Ger.)	1000 mg/kg	0.28+0.0001	57%

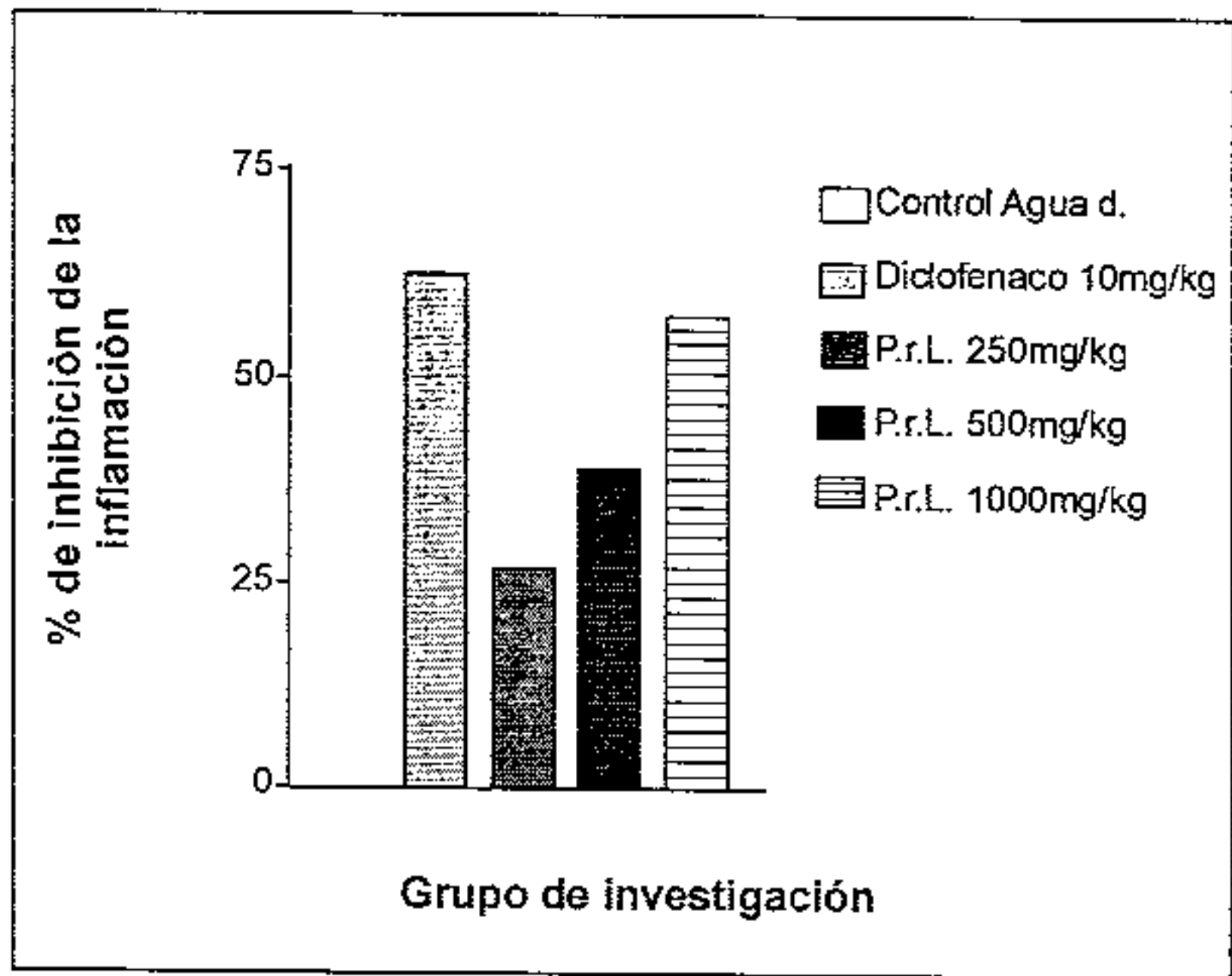


Figura N.º 2. Porcentaje de inhibición de la inflamación de Geranio & Diclofenaco.

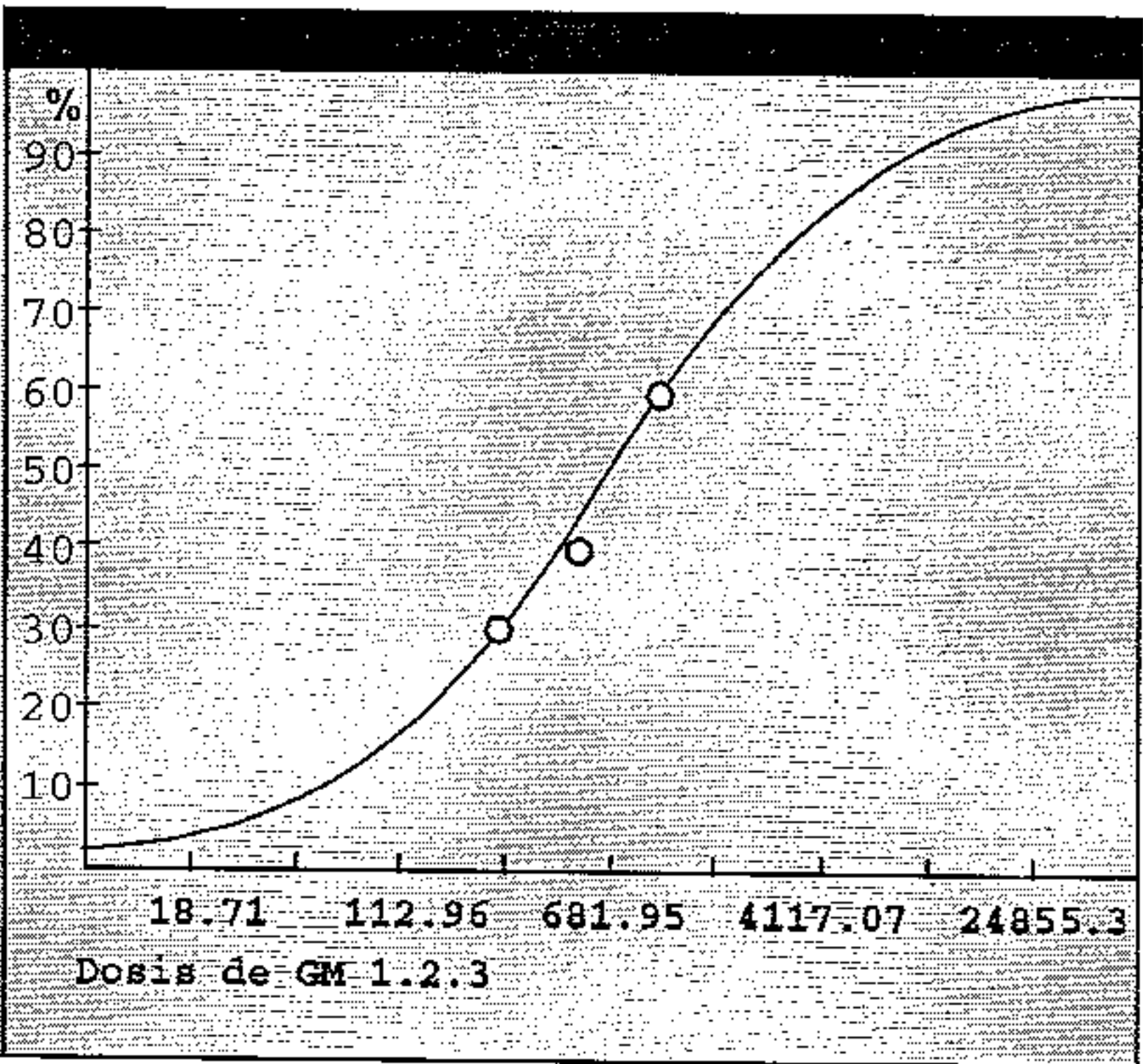


Figura N.º 3. Dosis Efectiva Media del ext. met. de hojas de *Pelargonium robertianum* L.

En el análisis de varianza los resultados para el efecto antiinflamatorio han sido significativos obteniéndose una  $p < 0.0001$  con un  $F = 5240$  y un  $R^2 = 0.9979$ . Los cálculos se han realizado en una microcomputadora IBM-PC empleando un programa computarizado.

De la Evaluación Fitoquímica según el Método de Ciulei

Los hallazgos del estudio fitoquímico cualitativo del extracto metanólico se presentan en la Tabla

N.º 3. El estudio por HPLC e IR frente al patrón de referencia Rutina ha revelado la presencia de Rutina, Figuras N.º 4 y N.º 5 (heterósido con estructura flavonol) presente en el extracto metanólico que podría ser el que ejerce el efecto antiinflamatorio en sinergismo con otros componentes entre ellos Quercetina detectada por TLC en un sistema de solventes Acetato de etilo/ Metanol/Agua en proporción 113.5/13.5/10 y 25 TLC aluminium sheets 20\*20 Silicagel 60F 254 Merck.

El extracto metanólico con actividad farmacológica ha presentado en mayor cantidad flavonoides en 2 fracciones GACH6 (Fig. N.º 6, N.º 7 y N.º 8) y GACH7 (Fig. N.º 9), y alcaloides en tres fracciones (GM1, GM2, GM3) los cuales han sido separados utilizando cromatografía en columna (c.c), cromatografía en capa fina (c.c.f) y preparativa (ccfp).

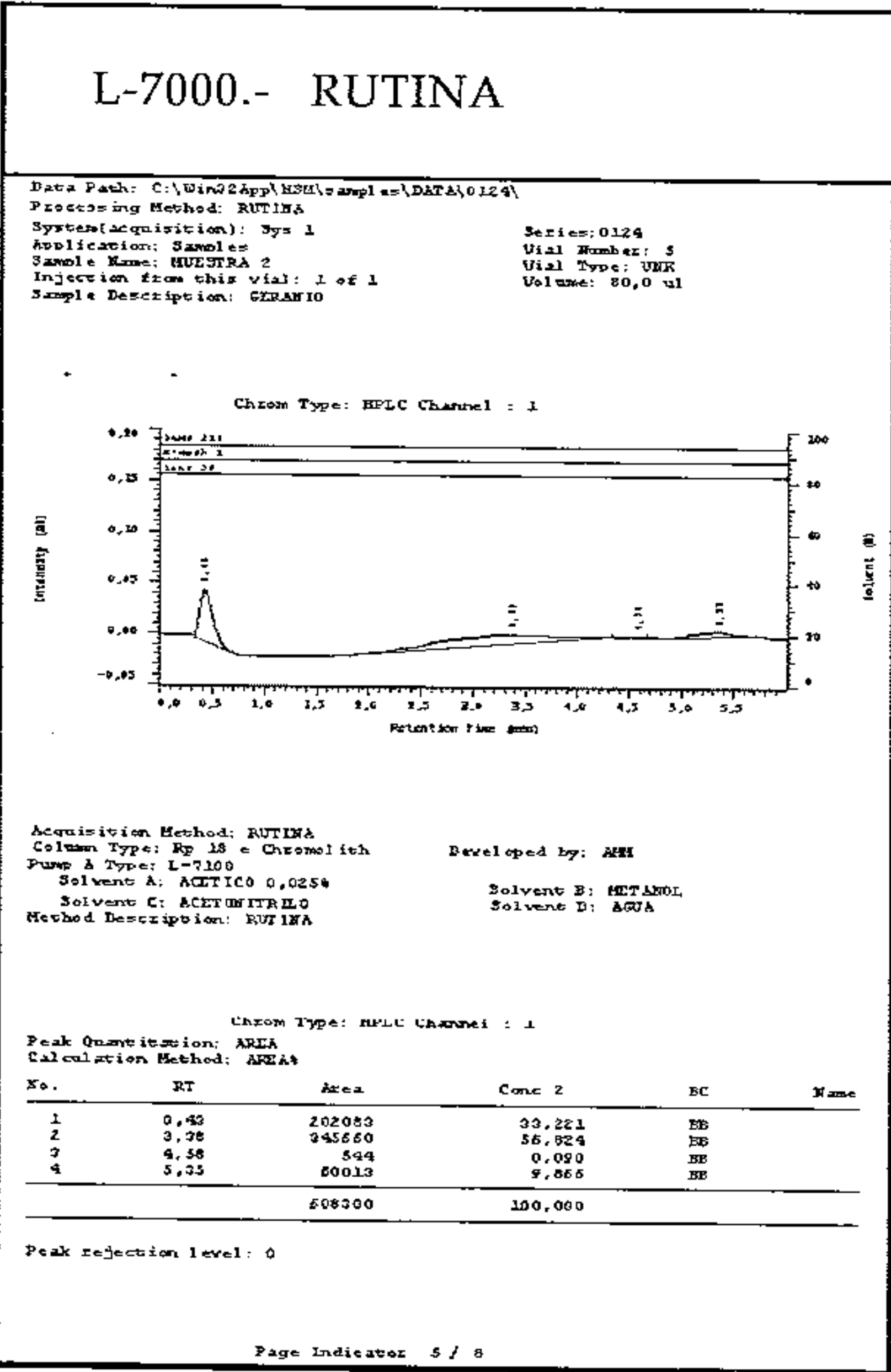


Figura N.º 4. Presencia de Rutina en el Ext. met., de *Pelargonium robertianum* L por HPLC.

Tabla N.º 3: Metabolitos identificados en el extracto metanólico de las hojas de *Pelargonium robertianum* L «Geranio»

METABOLITO	PRUEBA O REACCIÓN	RESUL-TADO
AMINOÁCIDOS LIBRES	NINHIDRINA	---
COMPUESTOS FENÓLICOS	TRICLORURO FÉRRICO	+++
TANINOS	DICROMATO DE POTASIO	+++
	GELATINA	+++
	ACETATO DE PLOMO	+++
FLAVONOIDES	SHINODA	+++
ALCALOIDES	R. DRAGENDORFF	+++
	R. MAYER	+++
	R. POPOFF	+++
	R. BERTRAND	+++
ESTEROIDES	LIEBERMANN	++
AZÚCARES REDUCTORES	FEHLING	++
	TOLLENS	++
OXIMAS	HIDROXILAMINA	++
ALCOHOLES	NITRATO DE CERIO AMONIACAL	++
GLUCÓSIDOS	R. ANTRONA	+++
	VAINILLINA SULFÚRICA	+++
	MOLISH	+++
	BENEDICT	+++
SAPONINAS	INDICE AFROSIMÉTRICO	++

Intensidad de reacción: Leve (+), Moderada (++), alta (+++).

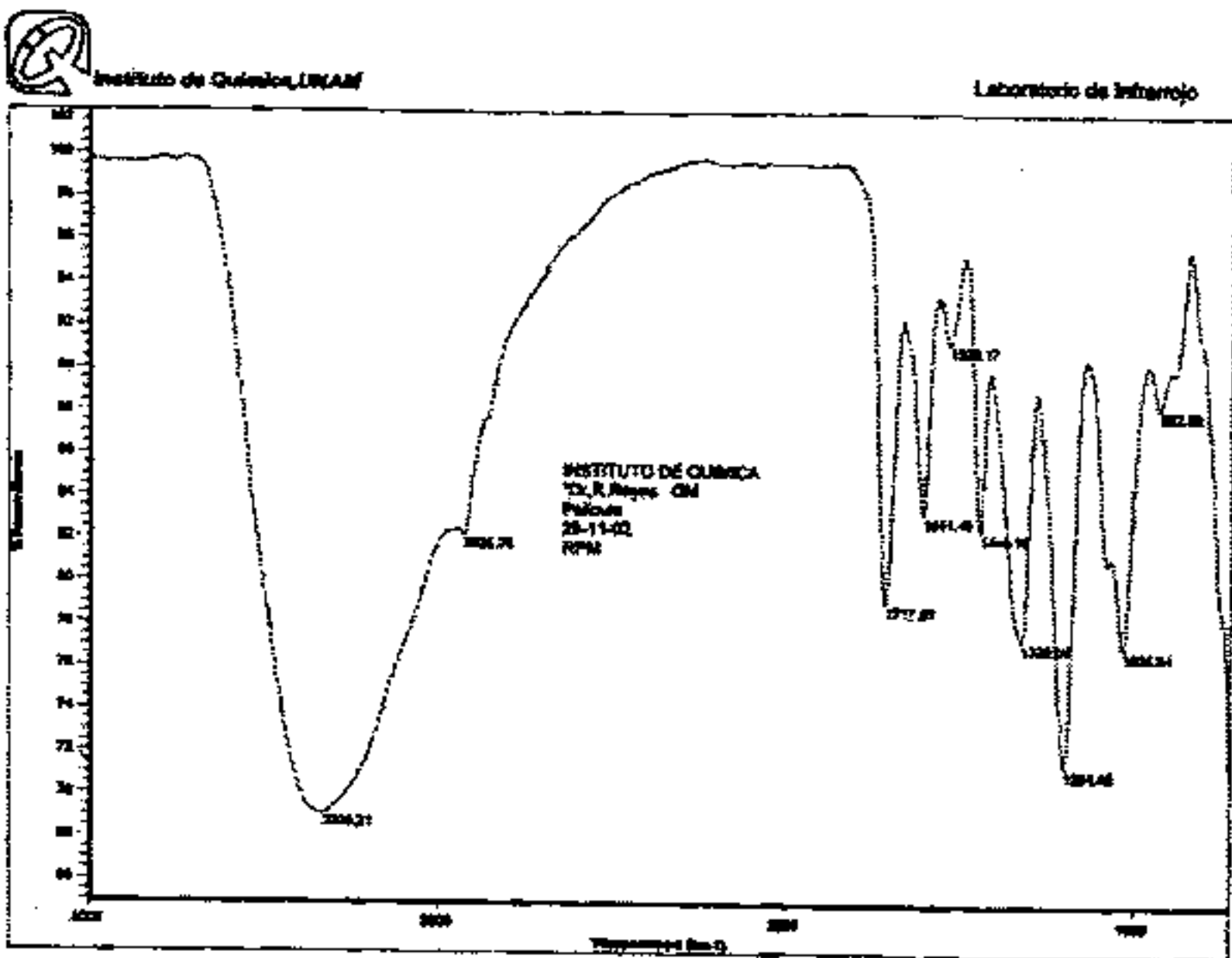


Figura N.º 5. Presencia de Rutina en el ext. met. de *Pelargonium robertianum* L, por IR.

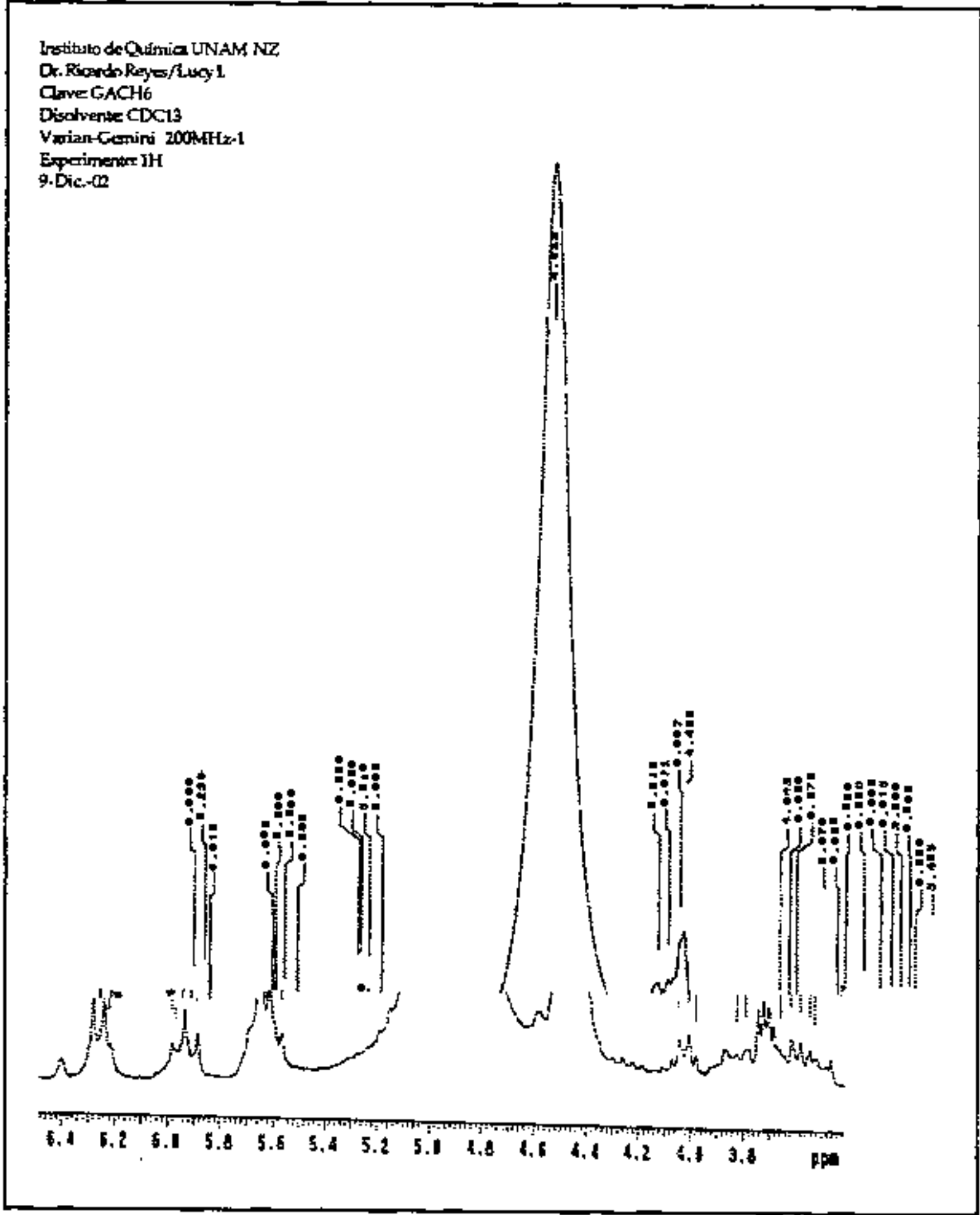


Figura N.º 6. Presencia de GACH6 (compuesto fenólico) aislado de *Pelargonium robertianum* L por RMNH1.

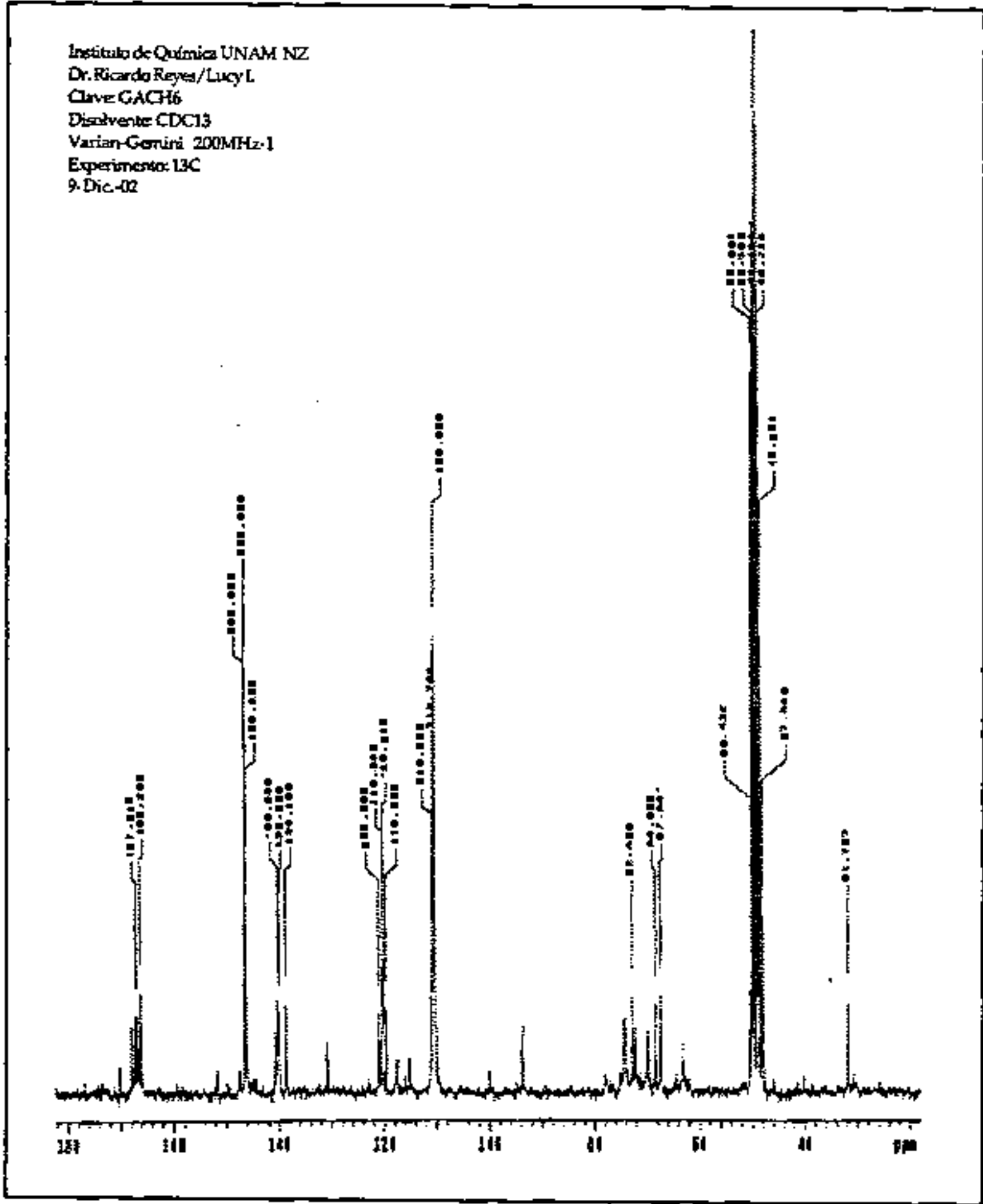


Figura N.º 7. Presencia de GACH6 (compuesto fenólico) aislado del extracto con actividad antiinflamatoria por RMNC13.

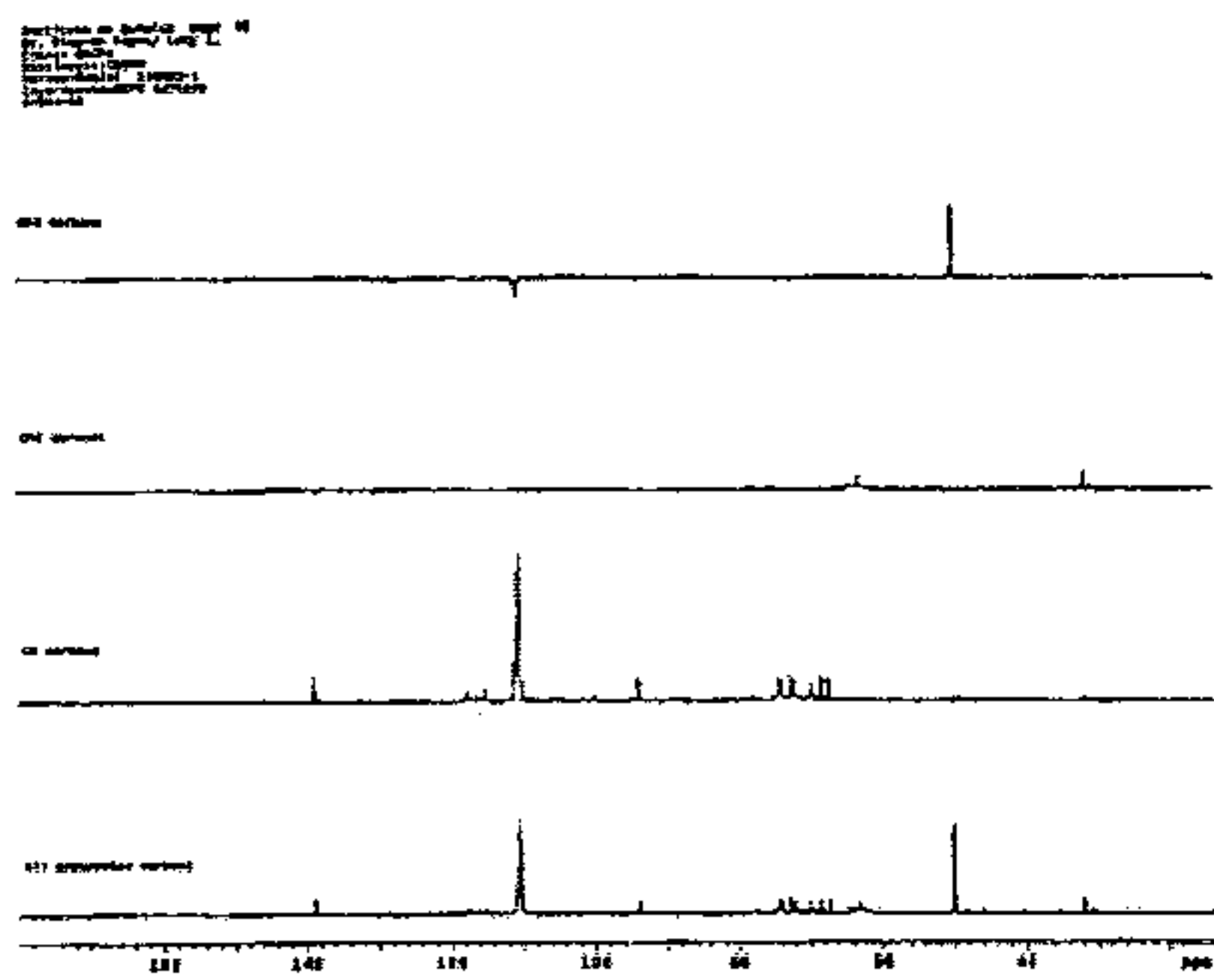


Figura N.º 8. Presencia de GACH6 (compuesto fenólico) del extracto con actividad antiinflamatoria.

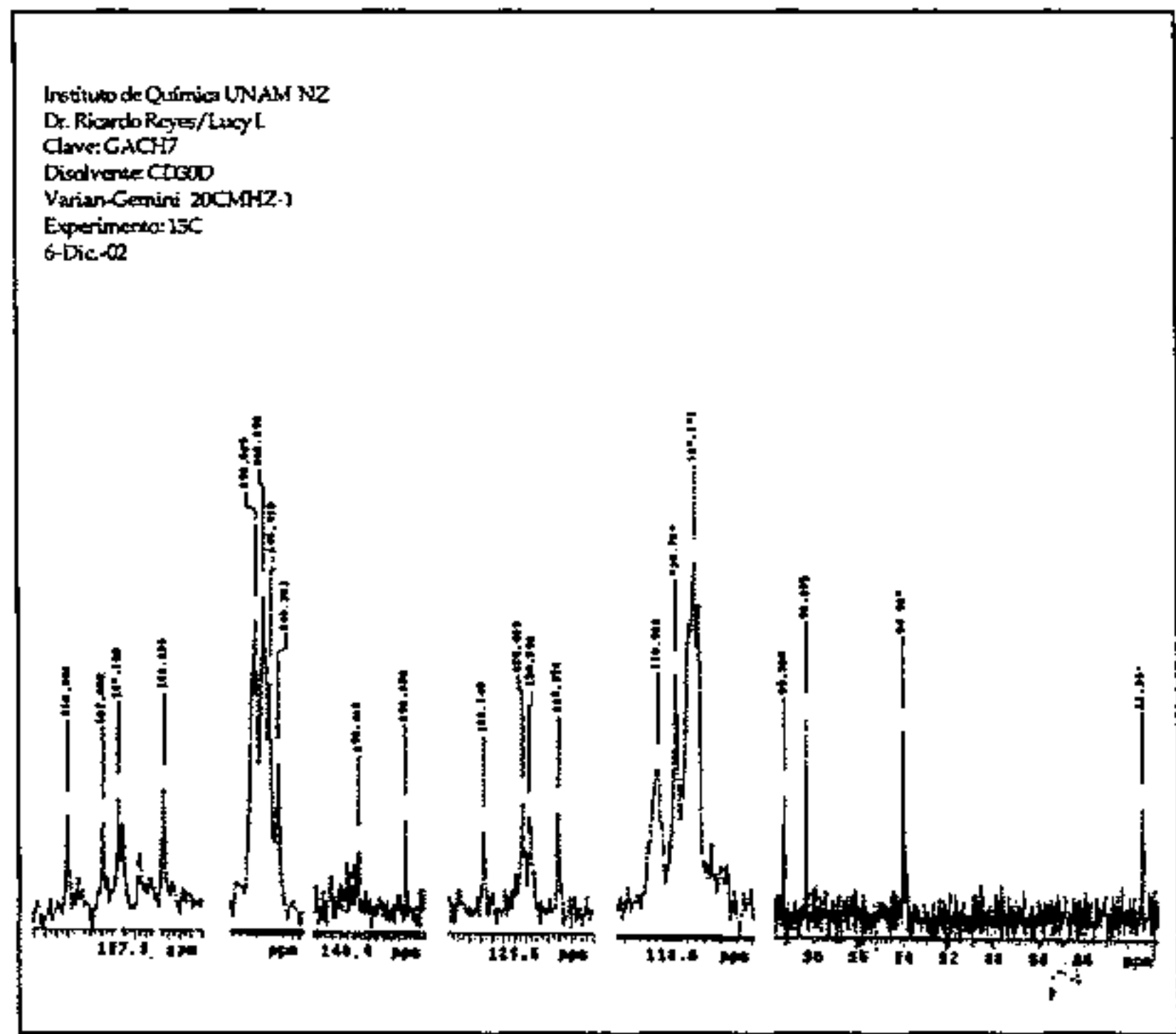


Figura N.º 9. Presencia de GACH7 (compuesto fenólico) del extracto con actividad antiinflamatoria por RMNC13.

DISCUSIÓN

Considerando el criterio de Williams para la calificación de los resultados de DL50 del extracto metanólico de hojas de Geranio, esta planta es prácticamente no tóxica por presentar un DL50= 8 717.02 mg/kg; pues, de acuerdo a este autor la sustancia es extremadamente tóxica si es menor a 1 mg/kg; altamente tóxica menor a 50 mg/kg; moderadamente tóxica menor a 500 mg/kg; ligeramente tóxica menor a 5000 mg/kg; prácticamente no tóxica menor a 15000 mg/kg y relativamente inocua mayor a 15000 mg/kg (17,24).

Con respecto a la Dosis Efectiva media (DE50) de la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de las hojas de *Pelargonium robertianum* L. «Geranio» en animales de experimentación (ratas) para validar científicamente las propiedades terapéuticas en procesos que cursan con inflamación no se ha reportado a la fecha ningún trabajo anterior, siendo este el primer reporte que analiza tal actividad obteniéndose un valor de 681.9577 mg/kg, observándose que el extracto metanólico de hojas administrado por vía oral a una dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg causa una inhibición de la inflamación dependiente de la dosis. El valor relativo de la eficiencia antiinflamatoria del *Pelargonium robertianum* L. frente a Diclofenaco es similar a la dosis de 1000 mg/kg.

La inflamación inducida descrita por Winter y colaboradores y modificada en 1981 por Sughisita es muy útil para estudiar la actividad de agentes antiinflamatorios. Ésta consiste en la administración subcutánea de una pseudosolución de lambda carragenina, a nivel de la aponeurosis plantar de la rata, provocando una reacción de carácter inflamatorio mediada por liberación de diversos autacoides como: histamina, serotonina, bradiquinina, prostaglandinas, y de otros mediadores del proceso inflamatorio tales como: interleucinas, factor de necrosis tumoral, factor activador de plaquetas, factores activadores del complemento, migración de leucocitos a la zona injuriada, etc.

Teniendo en cuenta que una hora después de la administración de la carragenina, la histamina y la serotonina tienen un papel principal como mediadores, y de una hora y media a dos horas y media aproximadamente después de la inyección, intervienen las kininas y en la última fase participan las prostaglandinas, fundamentalmente PGE, PGE2 y PGF2a (17); se considera que la respuesta vascular máxima ocurre aproximadamente a las 4 horas, por ello el edema inducido por el agente irritante fue medido a través de un pletismómetro a las 4 h de inyectada la carragenina, determinándose el incremento de volumen, al sustraer el valor que se obtuvo en la pata tratada con carragenina el valor de la pata contralateral.

Se ha utilizado la carragenina porque produce un edema menos modificado por factores ajenos a los propiamente característicos de la inflamación y además porque la actividad antiinflamatoria de este test guarda una buena correlación con la activi-

dad antiinflamatoria en clínica. La elección del pletismómetro como técnica farmacológica se debe a que presenta mayor exactitud en la medición de la magnitud de la inflamación con respecto al vernier (25).

El análisis fitoquímico del extracto metanólico de *Pelargonium robertianum* L. nos ha permitido determinar la presencia de: compuestos fenólicos, glicósidos, taninos, flavonoides en gran cantidad, alcaloides de los cuales se han aislado tres GM1, GM2, GM3 y se están realizando estudios para la determinación estructural.

Siendo la Rutina y la Quercetina, los flavonoides encontrados en mayor proporción en el extracto metanólico del Geranio, y conociéndose además que la Rutina disminuye la permeabilidad vascular, lo cual disminuiría la salida de los neutrófilos y macrófagos hacia la zona injuriada, elemento fundamental de todo proceso inflamatorio y habiendo sido demostrada la actividad inhibitoria sobre la ciclooxigenasa tanto de Rutina como de Quercetina (26) se podría explicar el efecto antiinflamatorio del Geranio encontrado en el presente trabajo. No se descarta, sin embargo, la participación de otros mecanismos de acción, así como la participación de otros componentes como los alcaloides GM1, GM2, GM3 presentes en el extracto, en la producción del efecto antiinflamatorio de esta planta, requiriéndose de trabajos adicionales para evaluar experimentalmente esta actividad así como de otros compuestos y demostrar sus efectos como antitumoral y antiviral lo cual podría deberse al geraniol que contienen las hojas (27, 28, 29, 30).

Del estudio realizado se concluye que, de acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto metanólico de geranio es prácticamente inocuo con una gran zona manejable y con un índice terapéutico alto.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso J.R. (2000). Plantas Medicinales de Acción Antiinflamatoria Tratado de Fitomedicina: Bases Clínicas y Farmacológicas. Resumen de trabajo para el Curso de Fitoterapia-FITO 2000. Lima-Perú.
2. Alonso J.R. (2002). Pasado, presente y futuro de las Plantas Medicinales. Del empirismo al Cientificismo. IV Congreso Mundial de Medicina Tradicional. Nov. Lima-Perú
3. Castañeda C.B. Manrique M.R. Ibáñez V.L. (2002). Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi, chocho) en animales de experimentación. Horizonte Médico (2), Pág. 37. Facultad de Medicina. USMP.
4. Arroyo, R. (1987). Estudio antimicrobiano de *Pelargonium robertianum* L «Geranio». Tesis para optar el Título de Q. F. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM.
5. Soukup, J. (1987). Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora peruana y Catálogo de los Géneros. Ed. Salesiana. Lima. Biblioteca Nacional del Perú.
6. Soukup, J (1979). Genera peruviana .Ed. Salesiana -Lima-Perú.
7. U.N.M.S.M, (1991). Cátedra de Salud Pública. Facultad de Farmacia. Recursos vegetales de uso medicinal. 2.ª Ed. Lima-Perú.
8. Font Quer, P (1953). Diccionario de Botánica. Ed. Labor. Barcelona-España.
9. Font Quer, P. (1976). Plantas medicinales. El dioscórides Renovado. Ed. Labor S.A Barcelona -España .
10. Tillan C., Lagarto P. (1997) Toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Mentha espicata* L. (hierbabuena) . Rev. Cubana Plant Med. 2 (2-3): 6-8.
11. Vega M. R. (1999). «Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto de *Piper auritum* H.B.K y toxicidad aguda oral». Rev. Cubana Plant Med.; 1(4): 11-4.
12. Ciulei, I. (1982). Metodología D'Analyse des Produit Vegetaux. Mimeografadoi Facultade de Farmacia, Bucarest. Brasil.
13. Bonilla R.P.E (2002) Investigación Fitoquímica de los metabolitos secundarios en hojas y tallos de *Lupinus ballianus*. UNMSM.
14. Nikolai Sh. (2000). Instituto de Química, Universidad Federal Fluminense (UFF), Brasil. «Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterápicos». Publicación del Convenio Andres Bello (CAB) y el CYTED, Santafé de Bogota, D.C., Colombia .
15. R. Kesse, R.K Müller, (1990). «Métodos de Laboratorio para Química Orgánica. Noriega Editores. Editorial Limusa. México. ISBN 0-8312-396-9. Alan.R. Vician Codi, Elliot Middleton et al. (1988). Planta Flavonoids In Biology and Me-

- dicine II, Biochemical, Cellular and Medicinal Properties. INC New Cork. United States of América .
16. Domínguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa, México.
  17. CYTED (1995). Manual de Técnicas de Investigación.
  18. Mujumdar, A.M; Naik D.G (2000). Antiinflammatory activity of *Curcuma amada* roxb. in albino rats. Indian Journal of Pharmacology 2000; 32: 375-377.
  19. Cybeles E.A, Nayana S (2002). Analgesic and Anti-inflammatory propiedades de *Plantago australis* hydroalcoholic extract. Acta Farm. Bonaerense 21(2): 89-92.
  20. Ascencio V.J. (2001). Efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de *Scrophularia scorodonia*. Rev. Latinoamer. Quím. Vol. 29 Suplemento Especial. p. 72.
  21. Rosales Cl.V.del P (1999). Evaluación farmacológica de *Pluchea carolinensis* Jacq. , (salvia de playa) en animales de experimentación Revista Cubana Plant Med 3(2): 65-7.
  22. Sugishita E. Amagaya S., Ogihara Y. (1981). Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. J. Pharmacobiodyn.; 4: 561-575
  23. Shivagi B., T (2000). Assessment of the anti-inflammatory effects of *Swertia chirata* in acute and cronic experimental models in male albino rats. Indian Journal of Pharmacology; 32: 21-24.
  24. FRAME. (1991). Animals and Alternatives in Toxicology: present status and future prospects. ATLA 1; 19:116-38.
  25. Pavón Hernández et al.(1999). Actividad antiinflamatoria y cicatrizante del ungüento rectal de aloe vera. Rev Cubana Plant Med 3 (3): 106-9.
  26. Harborne J.B. (1994). The Flavonoids Advances in Research, since 1986 to 1994. First Edition. England.
  27. Ibáñez V. L. (2003). Importancia de la Investigación Científica en Plantas. Rev. Folium Año XII, Número 34. p. 5. México
  28. Masuda-Y. (1997). El geranylgeraniol induce potentemente la actividad de caspase-3- durante la apoptosis en la leucemia humana en células U937. Biochem-Biophys-Res-Commun. 29 de mayo; 234(3): 641-5 .
  29. Miquel-k; Pradines-un; Favre-G.(1996). Farnesol y geranylgeraniol inducen desorganización de cytoskeleton de actin y apoptosis en A549 las células del adenocarcinoma pulmonares. El d' Oncologie de Laboratoire el et de Cellulaire Moleculaire, INSERM U397, Toulouse, Francia. BIOCHEM-BIOPHYS-RES-COMMUN. Ago 23; 225(3): 869-76.
  30. Nishikitani-M; Kubota-K.(1996). Aislamiento de Geranyl 6-O-alfa-L-arabinopyranosyl-beta-D-glucopyranoside como precursor del aroma de las hojas de un cultivar de té verdes. Universidad de Ochanomizu, Tokio, Japón Biosci-Biotechnol-Biochem. Mayo; 60(5): 929-31.