



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACION DE LAS ACTIVIDADES ANTIINFLAMATORIA
“IN VIVO” Y ANTIOXIDANTE DE TINTURAS ELABORADAS A
BASE DE GUARANGO (*Caesalpinia spinosa*) y SANGRE DE
DRAGO (*Croton lechleri*)”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: BELÉN ESTEFANÍA CHÁVEZ PILCO

TUTORA: DRA. SUSANA ABDO LÓPEZ

Riobamba-Ecuador

2016

© 2016, BELÉN ESTEFANÍA CHÁVEZ PILCO

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “EVALUACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ANTIINFLAMATORIA “*IN VIVO*” Y ANTIOXIDANTE, DE TINTURAS ELABORADAS A BASE DE GUARANGO (*Caesalpinia spinosa*) Y SANGRE DE DRAGO (*Croton lechleri*)” de responsabilidad de la señorita egresada Belén Estefanía Chávez Pilco, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Susana Abdo López

**DIRECTORA DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Lic. Karen Acosta

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

BQF. Diego Vinueza Tapia., M.Sc.

DELEGADO DEL DECANO

DOCUMENTALISTA

SISBIB ESPOCH

Yo, Belén Estefanía Chávez Pilco, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba 01 de abril del 2016

BELÉN ESTEFANÍA CHÁVEZ PILCO

060406585-4

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación dedico a Dios, quien ha sido mi guía y luz en momentos de debilidad y tristeza, cuando sentía rendirme ante las adversidades y los obstáculos que se presentaron durante el transcurso de mi carrera.

A mi papi Gastón quien desde el cielo me bendice día a día para salir adelante.

A mi mami Cecilia ejemplo de superación, por su esfuerzo, abnegación, ternura y por ser el cimiento principal para la construcción de mi vida profesional.

A mi hermana Geoselin por estar conmigo apoyándome cuando la tristeza y los problemas invadían mi mente. A mis tías: Dori, Mercedes y Lucy de la misma manera a mis abuelitas Rosita, Olguita y Tita por sus consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi perseverancia para lograr mis objetivos.

Gracias también a mis queridas primas por estar presentes en cada uno de los logros alcanzados durante mi vida, a mis amigas que sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento alegría y tristeza y a todas aquellas personas que durante estos cinco años de carrera estuvieron apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

Belén

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por permitirme utilizar las instalaciones durante el desarrollo de mi investigación y contribuir con mi formación profesional.

A quienes guiaron el presente trabajo de investigación a mi tutora Dra. Susana Abdo, colaboradora Lic. Karen Acosta por el apoyo y aporte brindado en la elaboración del presente trabajo, de la misma manera al B.Q.F Diego Vinuesa Tapia por el conocimiento y experiencia impartido que contribuyó a la finalización de la presente investigación.

Belén

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1.1. Tinturas.....	5
<i>1.1.1. Clasificación</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2. Técnicas de preparación</i>	<i>5</i>
<i>1.1.3. Solventes y equipos utilizados.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.4. Preparación de las tinturas</i>	<i>6</i>
1.2. Actividad antiinflamatoria	6
<i>1.2.1. Inflamación.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2. Finalidad de la inflamación</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3. Componentes de la reacción inflamatoria</i>	<i>7</i>
<i>1.2.4. Factores causales.....</i>	<i>7</i>
<i>1.2.5. Signos Clínicos.....</i>	<i>8</i>
<i>1.2.6. Tipos de Inflamación</i>	<i>8</i>
<i>1.2.7. Mediadores de la inflamación</i>	<i>10</i>
<i>1.2.8. Fases de la inflamación</i>	<i>10</i>
1.3. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)	11
<i>1.3.1. Clasificación</i>	<i>11</i>
<i>1.3.2. Mecanismo de acción</i>	<i>11</i>
<i>1.3.3. Reacciones adversas más frecuentes.....</i>	<i>12</i>
1.4. Diclofenaco sódico	12
<i>1.4.1. Efecto terapéutico</i>	<i>13</i>
<i>1.4.2. Mecanismo de acción</i>	<i>13</i>
<i>1.4.3. Posología</i>	<i>13</i>
<i>1.4.4. Reacciones secundarias y adversas</i>	<i>13</i>
1.5. Actividad antioxidante.....	15

1.5.1.	<i>Radical libre</i>	15
1.5.2.	<i>Estrés oxidativo</i>	15
1.5.3.	<i>Antioxidante</i>	16
1.6.	Vegetales utilizados	18
1.6.1.	<i>Sangre de drago (Croton lechleri)</i>	18
1.6.2.	<i>Guarango (Caesalpinia spinosa)</i>	24
1.7.	Animales de experimentación	27
1.7.1.	<i>Principio de las 3R</i>	28
1.7.2.	<i>Estandarización de los individuos</i>	28
1.7.3.	<i>Reactivo biológico</i>	29
1.7.4.	<i>Especies más utilizadas</i>	29
CAPÍTULO II		
2.1.	Lugar de investigación	32
2.2.	Recolección del material vegetal	32
2.3.	Reactivos Biológicos	32
2.3.1.	<i>Descripción</i>	33
2.3.2.	<i>Condiciones Ambientales</i>	33
2.4.	Equipos y Reactivos	33
2.4.1.	<i>Equipos</i>	33
2.4.2.	<i>Materiales</i>	34
2.4.3.	<i>Reactivos</i>	35
2.5.	Técnicas y métodos	36
2.5.1.	<i>Acondicionamiento de material vegetal</i>	37
2.5.2.	<i>Control de calidad de tinturas</i>	37
2.5.3.	<i>Análisis microbiológico</i>	39
2.5.4.	<i>Cromatografía en capa fina</i>	40
2.5.5.	<i>Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</i>	42
2.5.6.	<i>Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico</i>	43
2.5.7.	<i>Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH*</i>	44
2.5.8.	<i>Evaluación de la actividad antiinflamatoria</i>	47
CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
3.1.	Control de calidad	51
3.2.	Control de calidad físico de las tinturas de <i>Croton lechleri</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i>	52
3.3.	Análisis Microbiológico	53

3.4.	Cromatografía en capa fina (TLC)	54
3.4.1.	<i>Compuestos fenólicos</i>	54
3.4.2.	<i>Compuestos alcaloideos</i>	56
3.5.	Cuantificación de Fenoles Método de Folin - Ciocalteau	57
3.6.	Cuantificación de flavonoides totales	58
3.7.	Capacidad Captadora de Radicales libres	60
3.8.	Evaluación de la actividad antiinflamatoria “in vivo”	62
	CONCLUSIONES	65
	RECOMENDACIONES	66
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1	Zonas de vida de <i>Caesalpinia spinosa</i>	26
Tabla 2-1	Especies más utilizadas en modelos experimentales y sus respectivos usos.....	30
Tabla 1-2	Descripción animales de experimentación ratas albinas wistar.....	33
Tabla 2-2	Condiciones ambientales a la que fueron sometidas los animales de experimentación.....	33
Tabla 3-2	Protocolo de la evaluación de la Actividad Antiinflamatoria “ <i>in vivo</i> ”.....	49
Tabla 1-3	Resultados de los requisitos organolépticos de las tinturas.....	52
Tabla 2-3	Resultados del control de calidad de las tinturas.....	53
Tabla 3-3	Resultados del análisis microbiológico de las tinturas.....	54
Tabla 4-3	Posibles compuestos flavónicos identificados mediante TLC de <i>Croton lechleri</i>	55
Tabla 5-3	Posibles compuestos flavónicos identificados mediante TLC de <i>Caesalpinia spinosa</i>	55
Tabla 6-3	Resultados de la cuantificación de fenoles mediante el método de Folin-Cicalteau.....	57
Tabla 7-3	Resultados de la cuantificación de flavonoides Totales.....	58
Tabla 8-3	Resultados de la capacidad captadora de radicales libres.....	60
Tabla 9-3	Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1	Factores causales, propósito fisiológico y consecuencias de una inflamación.....	8
Figura 2-1	Árbol y látex envasado de <i>Croton lechleri</i>	19
Figura 3-1	Monómeros, algunos dímeros proantocianidínicos y el trímero galocatequina caracterizados en la sangre de drago de <i>Croton lechleri</i>	21
Figura 4-1	Estructura de la taspina y de la 3,4-O-metilcedrusina.....	22
Figura 5-1	Diterpenos aislados de la sangre de drago de <i>Croton lechleri</i>	22
Figura 6-1	Árbol y vainas maduras de <i>Caesalpinia spinosa</i>	24
Figura 7-1	Estructura parcial de tanino del guarango (a), galatos del ácido quínico (b).....	27
Figura 9-1	Rata albina wistar.....	29
Figura 1-2	Protocolo de la investigación.....	36
Figura 2-2	Esquema de la cromatografía en Capa Fina de las Tinturas Madres.....	41
Figura 3-2	Esquema de la cuantificación de Fenoles totales. Método Folin – Ciocalteu.....	43
Figura 4-2	Esquema de la cuantificación de Flavonoides totales.....	44
Figura 5-2	Modelo de la actividad de un antioxidante sobre el radical DPPH*.....	45
Figura 6-2	Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante.....	45
Figura 7-2	Esquema de la Capacidad Captadora de Radicales libres.....	47
Figura 8-2	Esquema de la Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria en ratas wistar.....	48
Figura 1-3	Cromatografía en capa fina de <i>Croton lechleri</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i>	54
Figura 2-3	Cromatografía en capa fina de la fracción alcaloidea de <i>Croton lechleri</i>	56

ÍNDICE ANEXOS

- ANEXO A** Materia vegetal *Caesalpinia spinosa* y látex de *Croton lechleri*
- ANEXO B** Maceración y Sonicación de las tinturas
- ANEXO C** Elaboración de las 5 Tinturas
- ANEXO D** Análisis Organoléptico
- ANEXO E** Determinación de la densidad Relativa, sólidos totales, determinación del pH e índice de refracción
- ANEXO F** Análisis Microbiológico en cabina de flujo laminar
- ANEXO G** Cromatografía en columna para las fracciones etanólica de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa*
- ANEXO H** Cromatografía en Capa Fina para la fracción metanólica de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa* y la fracción alcaloidea de *Croton lechleri*
- ANEXO I** Cuantificación de fenoles totales mediante de espectrofotometría. Método Folin-Ciocalteu
- ANEXO J** Cuantificación de flavonoides totales con cloruro férrico mediante de espectrofotometría
- ANEXO K** Determinación de la capacidad captadora de electrones por el método del DPPH*
- ANEXO L** Materiales utilizados para la evaluación de la actividad Antiinflamatoria
- ANEXO M** Administración intragástrica de las tinturas
- ANEXO N** Inducción del edema plantar con carragenina al 1%
- ANEXO O** Mediciones de diámetro y altura del edema generado
- ANEXO P** Curva de calibración para ácido gálico usada en la cuantificación de fenoles
- ANEXO Q** Curva de calibración para quercetina usada en la cuantificación de flavonoides
- ANEXO R** Tabla del TEST ANOVA de un factor para los tratamientos aplicados
- ANEXO S** Tabla del TEST ANOVA de un factor para los tiempos del ensayo
- ANEXO T** Tabla de subconjuntos homogéneos del test de TukeyB para el tiempo

ANEXO U Evaluación de la eficacia antiinflamatoria con respecto al tiempo de ensayo

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de cinco tinturas elaboradas a base de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y sangre de drago (*Croton lechleri*), se comprobó la calidad organoléptica, física y microbiológica de cada una de las tinturas. Mediante cromatografía en capa fina (TLC) se identificaron presuntivos metabolitos secundarios de tipo fenólico y alcaloideo. Con la utilización de técnicas espectrofotométricas se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides totales para cada una de las tinturas. Para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* se efectuó mediante el ensayo de captación de radicales libres con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*) utilizando como antioxidante estándar ácido gálico, los resultados fueron expresados como Concentración Inhibitoria Media (CIM). La evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* se realizó mediante el ensayo de la inducción de edema plantar en ratas wistar, se utilizó como control positivo diclofenaco sódico de 50 mg, los resultados se expresaron como porcentaje de eficacia antiinflamatoria. Los posibles compuestos fenólicos identificados por TLC en *Caesalpinia spinosa* fueron: ácido caféico, ácido clorogénico y ácido isoclorogénico, en lo que respecta a *Croton lechleri* se identificó posiblemente: ácido caféico y el alcaloide taspina. El contenido fenólico varió de $3,454 \pm 0,072$ a $9,621 \pm 0,072$ mg/mL de tintura, mientras que el contenido de flavonoides de $3,050 \pm 0,000$ a $10,350 \pm 0,750$ mg/mL de tintura; siendo la tintura de *Croton lechleri* la que presentó el mayor contenido de estos compuestos. La tintura que presentó mejor actividad antioxidante fue la conformada por un 30% de *Croton lechleri* y 70% de *Caesalpinia spinosa* con una CIM de 113,1744 $\mu\text{g/mL}$. En cuanto a la actividad antiinflamatoria se concluye que hay una baja actividad antiinflamatoria de todas las tinturas analizadas. Se recomienda evaluar los extractos etanólicos de cada una de las drogas analizadas.

Palabras Clave: <TINTURAS MADRES>, <CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA [TLC]>, <FENOLES TOTALES>, <FLAVONOIDES TOTALES>, <2,2-difenil-1-picrilhidrazil [DPPH]>, <EFICACIA ANTIINFLAMATORIA>, <FITOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>

SUMMARY

The objective of this investigation was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activity of 5 tinctures elaborated based on guarango (*Caesalpinia spinosa*) and drago blood (*Croton lechleri*), the organoleptic, physical and microbiological quality of each of the tinctures were proved. By using Thin Layer Chromatography (TLC), the presumptive secondary metabolites of phenolic and alkaloidal type, were identified. With the usage of the spectrophotometric techniques was quantified the content of total phenols and flavonoids per every tincture. For the evaluation of the antioxidant activity *in vitro* conducted by mean of catchment tests of free radicals with the radical 2, 2,2-difenil-1-picridrazil (DPPH*), using as a standard antioxidant gallic acid, the results were expressed as Mean Inhibitory Concentration.

The evaluation of the anti-inflammatory activity *in vivo* was made by means of the test of induction of the plantar edema in *wistar rats*, it was used as positive control the diclofenaco sodium of 50 mg, and the outcomes were expressed as an anti-inflammatory efficacy percentage. The possible phenolic compositions identified by TLC in *Caesalpinia spinosa* were: cafeic acid, chlorogenic acid, and isochlorogenic acid, related to *Croton lechleri* were identified possibly: cafeic acid and the taspina alkaloid. The phenolic content varied of $3,454 \pm 0,072$ to $9,621 \pm 0,072$ mg/mL of tincture; being, meanwhile the content of flavonoids of $3,050 \pm 0,000$ to $10,350 \pm 0,750$ mg/mL of tincture; being the tincture of *Croton lechleri* presented a best antioxidant activity, what the conformed by a 30% of *Croton lechleri* and 70% of *Caesalpinia spinosa* with a Mean Inhibitory Concentration (MIC) of 113, 1744 $\mu\text{g/mL}$. Referring to the anti-inflammatory activity is concluded that a low anti-inflammatory activity exists in the analyzed tinctures. It is recommended, evaluating the ethanolic extracts of each of the analyzed drugs.

KEY WORDS: <MOTHER TINCTURES> <THIN LAYER CROMATOGRAPHY> <TOTAL PHENOLS> <TOTAL FLAVONOIDS> <2,2-difenil-1-picridrazil [DPPH]> <ANTI-INFLAMMATORY EFFICACY> <PHYTOCHEMISTRY> <PHARMACOLOGY>

INTRODUCCIÓN

Los radicales libres en especial las especies reactivas de oxígeno (ROS) son producidas continuamente en nuestro cuerpo como un subproducto de muchos procesos metabólicos. Cuando el cuerpo se encuentra fisiológicamente en equilibrio tiene su propio sistema de defensa antioxidante que comprende sistemas enzimáticos, mismo que reaccionan con los radicales libres. (Scheibmeir et al., 2005, pp. 24-28)

Sin embargo, cuando la sobreproducción de radicales libres dentro del organismo es excesiva se ve alterado el equilibrio fisiológico y el cuerpo entra en un proceso denominado estrés oxidativo en el que las especies reactivas reaccionan con biomoléculas esenciales como: proteínas, grasas y ADN, desencadenando la aparición de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, envejecimiento. Cuando el organismo no es capaz de neutralizar la concentración excesiva de radicales libres, es necesario un suministro extra de antioxidantes de tipo natural proveniente de plantas y de frutas los mismos que presentan cierta ventaja sobre los antioxidantes de tipo sintético ya que estos últimos aún no se tiene la certeza de que poseen absoluta seguridad toxicológica. (Wang et al., 2009, pp. 240-248)

Por otro lado se conoce también que en el proceso inflamatorio participan ROS como mediadores de la inflamación, debido a ellos se considera una importante relación entre actividad antioxidante y antiinflamatoria. La utilización de plantas medicinales con un alto contenido de compuestos polifenólicos es una opción alternativa en el tratamiento de estas enfermedades. (Nardii et al., 2003, pp.176-177)

En los últimos años, los procesos inflamatorios son cada día más recurrentes en nuestro medio. La inflamación es una respuesta protectora, cuyo principal objetivo es liberar al organismo los agentes que causan dicha condición entre las que se mencionan microbios y toxinas provocando la necrosis de los tejidos. Por otro lado si la inflamación no es curada adecuadamente las reacciones de hipersensibilidad aparecen inmediatamente.

Los Antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son los medicamentos de primera elección al momento de tratar esta condición, los mismos que suelen ser utilizados ya sea por prescripción o automedicación. Además, tienen propiedades analgésicas y también antipiréticas. Se estima que se expenden toneladas por año. (Rodríguez, 2013)

Dentro del grupo de medicamentos AINES más utilizados se encuentra el ácido acetyl salicílico, paracetamol, dipirona, ibuprofeno, indometacina, diclofenaco, naproxeno, piroxicam y celecoxib. Se han realizado estudios en los que se ha estimado un consumo de AINES diariamente a nivel mundial por parte de 30 millones de personas, lo cual representa un gasto superior a los dos billones de dólares. Esta situación se torna incontrolable ya que no solamente constituyen un problema de salud por los efectos secundarios que los mismos presentan por una utilización crónica, sino que también implica un gasto económico representativo.

La incidencia real de las reacciones minúsculas en la población por la utilización de AINES no se conoce con exactitud a pesar de ser en uno de los grupos farmacológicos más vendidos. La principal causa se debe a que solamente una pequeña cantidad de pacientes con esta condición acuden a los centros de salud para ser atendidos. Sin embargo en un estudio estadístico se demuestra que anualmente se producen 16 000 fallecimientos en los Estados Unidos y 10 000 en Canadá vinculados con las reacciones adversas inducidas por los AINES, como por ejemplo, perforación gástrica, obstrucciones digestivas y úlceras. Un dato interesante es que la prevalencia de úlcera inducida por AINE oscila entre el 10% y el 25%, y es una causa importante de morbilidad y mortalidad. (Gor y Saksena, 2011, pp. 26-29)

Debido a estos problemas de salud se ve en la necesidad el investigador farmacéutico de ofrecer tratamientos alternativos para minimizar estos inconvenientes que generan los fármacos sintéticos, siendo las plantas medicinales la opción más viable por su accesibilidad, menor costo y reacciones adversas minúsculas. El principio activo de los medicamentos herbarios son los metabolitos secundarios, sustancias que la planta metaboliza en mínimas concentraciones y los utiliza para su supervivencia en condiciones extremas en el medio en el que se desarrolla. Ecuador posee una flora muy variada, existen muchas plantas con efectos benéficos para la salud, dentro de las que podemos mencionar: sangre de drago (*Croton lechleri*) y guarango (*Caesalpinia spinosa*); especies que crecen en la zona amazónica y andina respectivamente.

Tanto *Croton lechleri* como *Caesalpinia spinosa* han sido utilizadas, en la medicina popular por sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, mutagénicas y gastroprotectoras. Estas propiedades han sido comprobadas mediante investigaciones así por ejemplo Chambi y colaboradores en el año 2013 realizaron un trabajo de investigación acerca del potencial antioxidante de los extractos polifenólicos hidrolizados de las vainas de *Caesalpinia spinosa*. En dichos extractos la concentración de ácido gálico es alta, es por ello que la capacidad antioxidante medida de esta especie supera la

actividad de terbutil hidroquinona (TBHQ) que es un antioxidante sintético para retardar la oxidación del aceite de soja por lo que puede ser utilizado como una fuente alternativa de antioxidantes. (Chambi et al., 2013, pp. 168-175)

Por otra parte, Lopes y colaboradores demostraron también la actividad antioxidante de la savia de *Croton lechleri* en su artículo científico “Actividades mutagénicas y antioxidantes de la savia de *Croton lechleri* en sistemas biológicos”, la actividad antioxidante se evaluó frente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de las plántulas de maíz tratados con apomorfina. Mediante esta investigación se demostró una actividad antioxidante significativa contra los daños oxidativos inducida por la apomorfina en *Saccharomyces cerevisiae*, la savia también fue capaz de proteger a las células de las plántulas de maíz del efecto tóxico de la apomorfina. (Lopes et al., 2004, pp. 437-445)

En lo que concierne a la actividad antiinflamatoria de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa* no existen aún investigaciones; sin embargo, otras especies han sido estudiadas como: *Croton Urucurana* cuya composición fitoquímica es similar a la especie *lechleri*, se demostró la actividad antiinflamatoria con la inhibición del edema plantar inducido con carragenina en ratones y la acumulación de leucocitos. (Wolff et al., 2015, pp. 1-22)

El presente trabajo de investigación es una secuencia del trabajo de tesis realizado por Pamela Allaica en el que se comprobó la sinergia de las tinturas elaboradas con *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa* como actividad cicatrizante en heridas inducidas en ratones (*Mus musculus*), los resultados fueron muy favorables para las tinturas en combinación, debido a ello se pretende comprobar la sinergia de las drogas para las actividades antiinflamatoria y antioxidante, procesos que aparecen con la formación de la costra en la herida. (Allaica, 2015)

Los objetivos de la investigación en *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa* son: elaborar tinturas de los vegetales estudiados por si solos y en combinación; identificar los metabolitos secundarios de tipo flavónico y alcaloideo; cuantificar los flavonoides y fenoles totales de cada una de las tinturas elaboradas; evaluar la actividad antioxidante *in vitro* utilizando el método del DPPH* y la actividad antiinflamatoria con el método de inducción de edema plantar con carragenina en ratas (*Rattus novergicus*).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar las actividad antiinflamatoria *in vivo* y antioxidante *in vitro*, de tinturas elaboradas a base de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y sangre de drago (*Croton lechleri*)

Objetivos Específicos

- Evaluar la calidad organoléptica, fisicoquímica y microbiológica de las tinturas obtenidas a partir de *Croton Lechleri* y *Caesalpinia spinosa*.
- Identificar los metabolitos secundarios de tipo flavónico y alcaloideo provenientes de las drogas analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC).
- Cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides totales de las tinturas de *Croton Lechleri* y *Caesalpinia spinosa* mediante técnicas espectrofotométricas.
- Evaluar la capacidad captadora de radicales libres *in vitro* de las diferentes tinturas de *Croton Lechleri* y *Caesalpinia spinosa*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de las tinturas obtenidas utilizando ratas (*Rattus norvegicus*) mediante la inducción de edema plantar con carragenina.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Tinturas

Son preparaciones líquidas que resultan de la acción disolvente y/o extractiva de un solvente inerte sobre la droga vegetal

1.1.1. Clasificación

Se clasifican como provenientes de materia prima vegetal o animal.

1.1.2. Técnicas de preparación

La recolección es en la época en la cual la droga posee el contenido máximo de metabolitos activos así se recomienda que las plantas enteras sean recolectadas en épocas de floración, las hojas deben ser recolectadas después del desarrollo completo de la planta y antes de la floración, tallo y ramas deben recolectarse después del desarrollo de las hojas y antes de la floración. Cortezas de las plantas deben ser recolectadas en el periodo de desarrollo de las hojas y de los cogollos, momento durante el cual existe una mayor producción de savia y en lo que concierne a los frutos deben ser recolectados cuando se encuentren maduros. (Sharapin, et al., 2000, pp. 63-69)

1.1.3. Solventes y equipos utilizados

El solvente utilizado debe ser una mezcla hidroalcohólica en diferentes concentraciones, los equipos utilizados deben ser de material inerte por ejemplo acero inoxidable o vidrio para que no provoquen alteraciones en la composición de la tintura. Los equipos comúnmente utilizados son los siguientes: Molinos para cortar plantas, licuadora industrial, cuchillas de acero inoxidable, tablas para cortar plantas, tamices, percoladores y prensas. (Sharapin, et al., 2000, pp. 63-69)

1.1.4. Preparación de las tinturas

- Seleccionar el material vegetal (verificación de la parte adecuada, realización de exámenes macroscópicos y microscópicos, elaboración de ensayos para detectar la presencia de contaminantes, etc.).
- Escoger el método de extracción.
- Exprimir y filtrar el material luego de la extracción.
- Elaborar la tintura y realizar el control de calidad. (Sharapin, et al., 2000, pp. 63-66)

1.2. Actividad antiinflamatoria

1.2.1. Inflamación

Es la respuesta fisiológica localizada y protectora de los tejidos vascularizados frente a un daño. Incluye reacciones de naturaleza nerviosa (neurotransmisores siendo la serotonina uno de los más implicados), inmune (citocinas), endocrino (hormonas) vascular, humoral y celular en el sitio lesionado, conformado por un proceso dinámico. (Universidad Complutense de Madrid)

Se trata de un proceso complejo que involucra la acción coordinada de múltiples células, caracterizado por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales, como esteroides, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y especies reactivas de oxígeno (ERO).

La sobreproducción de especies reactivas de Oxígeno puede inducir estrés oxidativo y generar daños a nivel celular, que promueven la aparición de enfermedades crónicas.

En las enfermedades infecciosas, la inflamación es una respuesta fundamental en la defensa del huésped, la eliminación del agente patógeno y en la reparación y normalización de las funciones del tejido. (Franco, et al., 2013)

1.2.2. Finalidad de la inflamación:

- Destruir, atenuar o mantener localizado al agente patógeno.
- Iniciar una cadena de acontecimientos que ayuden a curar y reconstruyan el tejido lesionado.
- Evitar que las infecciones se propaguen de forma incontrolada. (Universidad de los Andes de Venezuela)

1.2.3. Componentes de la reacción inflamatoria:

Componente vascular: Vasos sanguíneos, plasma, componente celular, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos, plaquetas, mastocitos, fibroblastos, macrófagos, matriz extracelular, proteínas fibrilares, proteínas estructurales, glucoproteínas de adhesión, proteoglicanos.

1.2.4. Factores causales.

- Factores endógenos: necrosis celular, rotura ósea.
- Factores exógenos: Agentes químicos (corrosivos), agentes físicos (quemaduras), mecánicos (corte), agentes biológicos (hongos, bacterias, etc.) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). (Universidad de Córdoba)

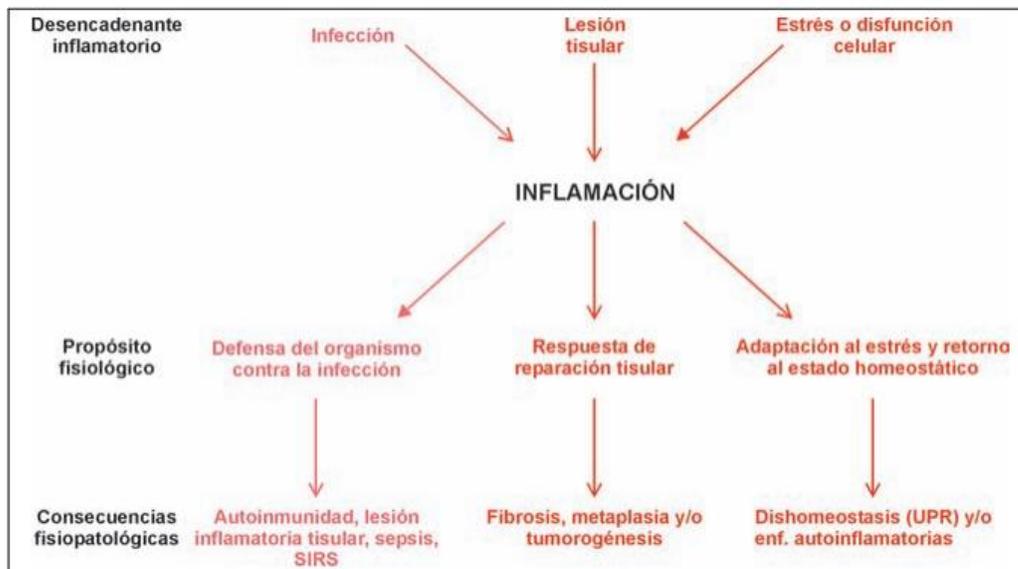


Figura 1-1 Factores causales, propósito fisiológico y consecuencias de una inflamación

Fuente: (García, 2008, p. 101)

1.2.5. Signos Clínicos

Según Paracelso (30 AC al 38 DC) los signos principales que conforman una inflamación son:

1. **Calor:** Aumento de la temperatura de la zona inflamada. Se debe a la vasodilatación y al incremento del consumo local de oxígeno.
2. **Rubor:** enrojecimiento, debido principalmente a los fenómenos de aumento de presión por vasodilatación.
3. **Edema:** Aumento del líquido intersticial.
4. **Dolor:** El dolor aparece como consecuencia de la liberación de sustancias capaces de provocar la activación de los receptores, tales como las prostaglandinas. (Catelli, 2009)

Sin embargo Galeno (130-200) añadió un quinto signo que es la pérdida de la función.

Además de la sintomatología local, también hay una respuesta sistémica del organismo acompañante que tiene que ver con el estrés y su intensidad es variable.

- Síntomas: Astenia (cansancio, poca motivación), anorexia (falta de apetito) y malestar general.
- Signos clínicos: Fiebre, taquicardia y taquipnea dependiendo del grado de inflamación.
- Signos analíticos: Leucocitosis con neutrofilia, reactantes de fase aguda (proteína C reactiva) y los mediadores inflamatorios interleucinas (IL-6).

1.2.6. Tipos de Inflamación

1.2.6.1. Aguda

Duración relativamente corta. Caracterizada por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos, principalmente neutrófilos. (Universidad Complutense de Madrid, 2014)

Los cambios que se producen tras la lesión tisular se deben a tres procesos:

1. Cambios en el flujo y calibre vascular que hacen que aumente el flujo sanguíneo.
2. Cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumentan la permeabilidad vascular e inducen la formación de exudado inflamatorio.
3. El paso de los leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones.

El resultado de todo ello es el acúmulo de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos. En los primeros 10-15 minutos se produce una hiperemia por dilatación de arteriolas, vénulas y aperturas de los vasos de pequeño calibre, tras esta fase aumenta la viscosidad de la sangre, lo que reduce la velocidad del flujo sanguíneo. Al disminuir la presión hidrostática en los capilares, la presión osmótica en el plasma aumenta y en consecuencia un líquido rico en proteínas sale de los vasos sanguíneos originando el exudado inflamatorio. (Universidad de Córdoba)

1.2.6.2. Crónica

Este tipo de inflamación dura semanas o meses .Por resolución incompleta del foco inflamatorio inicial o episodios múltiples en mismo sitio. Las características de este tipo de inflamación son:

1. Acumulación de macrófagos y linfocitos, desarrollo de fibroblastos y tejido vascular.
2. La reacción inflamatoria es más productiva que exudativa es decir que la formación del tejido fibroso prevalece sobre el exudado de líquidos.
3. Formación de granulomas, con células epiteloides y células multinucleadas.

La inflamación crónica puede producirse por diversas causas: progresión de una inflamación aguda, episodios recurrentes de una inflamación aguda e inflamación crónica desde el comienzo asociada frecuentemente a infecciones intracelulares. (Universidad de Córdoba)

1.2.7. Mediadores de la inflamación

Son moléculas de pequeño peso molecular y de origen plasmático o celular, encontramos metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos), aminas vasoactivas (histamina y serotonina) proteínas (citoquinas, interleuquinas, factores de crecimiento, factores de necrosis, neuropéptidos) y otros (óxido nítrico, radicales libres de oxígeno, factor activador de plaquetas).

Estos son los encargados de producir todas las reacciones físicas y químicas que se producen en el proceso inflamatorio, así como activar las células implicadas y mediar el control regulador de inicio y parada del proceso. De ellas las más importantes son las citoquinas. Todas estas células y pequeñas moléculas son activadas por determinados estímulos denominados señales activadoras de la inflamación. (Instituto Umberto)

1.2.8. Fases de la inflamación

De forma esquemática podemos dividir la inflamación en cinco etapas:

1. **Liberación de mediadores:** Son moléculas, la mayor parte de ellas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.
2. **Efecto de los mediadores:** Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
3. **Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.** Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.
4. **Regulación del proceso inflamatorio.** Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
5. **Reparación.** Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria. (González, et al., 2010)

1.3. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Los AINEs son un grupo de fármacos químicamente heterogéneos, la mayoría de estos medicamentos suelen ser ácidos orgánicos que además de cumplir con el efecto antiinflamatorio también son muy utilizados porque comparten acciones analgésicas y antipiréticas. El prototipo de este grupo de fármacos es la aspirina por lo que se conoce además como fármacos tipo aspirina.

1.3.1. Clasificación

Por su estructura química se clasifican en ácidos y básicos. Dentro de los AINEs Ácidos se encuentran los ácidos carboxílicos (salicílico, acético, propiónico y antranílico) y los ácidos enólicos (oxicams y pirazolonas).

En lo que concierne a AINEs bases incluyen a las siguientes familias: paraaminofenoles, sulfoanilidas, naftilalcanonas e inhibidores de la COX-2).

1.3.2. Mecanismo de acción

Se explica básicamente en el efecto inhibitor de la actividad de las ciclooxigenasas (COX) que son las enzimas que convierten el ácido araquidónico en las membranas celulares en endoperóxidos cíclicos inestables, los mismos que se transforman en prostaglandinas y tromboxanos responsables del proceso inflamatorio.

1.3.2.1. Acción Antiinflamatoria

Al inhibir los AINEs, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, se reduce, la actividad vasodilatadora y quimiotáctica, evitando así la inflamación en los mecanismos iniciales. Además el hecho de inhibir las COX contribuye también a la acción antiinflamatoria porque interfiere en la síntesis de mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico. Por otra parte, los AINEs también intervienen en la función de los neutrófilos que son las células que proliferan con mayor frecuencia en la inflamación, inhiben funciones como: adhesividad, agregación, quimiotaxis, fagocitosis, desgranulación y generación de radicales libre. (García, 2008)

1.3.2.2. Acción Analgésica

Este grupo de medicamentos alivian un dolor de intensidad moderada a baja. Se utilizan con mucha frecuencia en dolores articulares, musculares, dentales y cefaleas de diversa etiología. Estos medicamentos no alteran los umbrales del dolor, sin embargo son muy útiles al momento de tratar episodios dolorosos causados inherentes a una inflamación

1.3.2.3. Acción antipirética

La acción antipirética se debe a la disminución de las concentraciones centrales de PgE2, mediante la inhibición directa de la actividad enzimática de la COX-2. Un mecanismo central adicional puede ser la liberación de sustancias antitérmicas endógenas, como la arginina-vasopresina.

1.3.3. Reacciones adversas más frecuentes

- **Gastrointestinal:** pirosis, dispepsia, gastritis, diarrea o estreñimiento, úlcera gástrica y duodenal.
- **Cardiovascular:** infarto agudo de miocardio, ICTUS, problemas vasculares arteriales y periféricos.
- **Renal:** retención de sodio y agua, hipercalcemia e HTA; también pueden producir nefritis, síndrome nefrótico y necrosis papilar.
- **Hipersensibilidad:** angioedema, shock anafiláctico, urticaria y el asma bronquial.
- **Hematológicas:** (agranulocitosis y anemia aplásica). (Rodríguez y Valdés, 2013)

1.4. Diclofenaco sódico

El diclofenaco Sódico es un fármaco de tipo no esteroide con propiedades antirreumáticas, antiinflamatoria, analgésicas y antipiréticas. El principal mecanismo de acción es la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas, las mismas contribuyen de forma esencial en el desarrollo de la inflamación, dolor y fiebre.

1.4.1. Efecto terapéutico

Las propiedades antiinflamatorias y analgésicas del diclofenaco se manifiestan clínicamente dentro de las afecciones reumáticas por una mejora marcada de los signos y síntomas de dolores en reposo y en movimiento, rigidez matutina, inflamación de articulaciones así como un mejoramiento de la capacidad funcional. En las inflamaciones post-traumáticas y post-operatorias el diclofenaco disminuye rápidamente los dolores espontáneos, en movimiento y reduce el edema de origen inflamatorio y traumático. (Norgreen)

1.4.2. Mecanismo de acción

El principal mecanismo de acción es la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas las mismas contribuyen de forma esencial en el desarrollo de la inflamación, dolor y fiebre. (Norgreen)

1.4.3. Posología

Según los Protocolos terapéuticos del Ecuador 2012 la posología de diclofenaco sódico es:

Control de dolor en adultos y niños mayores 12 años 75 – 150 mg al día, Intramuscular.

Niños > 12 meses 0.5 – 3 mg/kg/día, hasta dos veces al día, durante no más de 2 días.

1.4.4. Reacciones secundarias y adversas

En términos generales se consideran reacciones adversas frecuentes cuando su incidencia es mayor de 10%, ocasionales entre 1 a 10%; reacciones adversas entre 0.001 a 1%, en casos aislados menos de 0.001%.

Las reacciones adversas se mencionan de acuerdo con el sitio de afección.

1.4.4.1. Tracto gastrointestinal

- Dolor epigástrico
- Dispepsia
- Flatulencia y anorexia.

1.4.4.2. Sistema nervioso central

- Cefalea
- Mareo o vértigo
- Somnolencia.

1.4.4.3. Piel

- Eritemas o erupciones cutáneas.
- Urticaria.

1.4.4.4. Hematológica

- Trombocitopenia
- Leucopenia
- Anemia (hemolítica, aplásica)
- Agranulocitosis.

1.4.4.5. Hipersensibilidad

- Reacciones de hipersensibilidad como asma, reacciones sistémicas anafilácticas/anafilactoides

1.4.4.6. Sistema cardiovascular:

Palpitación, dolor torácico, hipertensión e insuficiencia cardiaca congestiva. (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios)

1.5. Actividad antioxidante

Es la inhibición o retraso del daño celular a causa de estrés oxidativo, se basa en el que una molécula suficientemente estable es capaz de donar un electrón a un radical libre y neutralizarlo antes que las moléculas vitales sean dañadas.

1.5.1. Radical libre

Los radicales libres son moléculas inestables y muy reactivas. Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen. (Venereo, 2002, pp. 126-133)

1.5.1.1. Daños de los radicales libres a nivel celular

- **Lípidos y proteínas:** se ven afectadas principalmente las funciones vitales celulares tales como: transporte de nutrientes, eliminación de desechos y división celular. El radical superóxido, O_2 provoca una reacción en cadena de la lipoperoxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular.
- **DNA:** impiden que tenga lugar la replicación celular y contribuyen al envejecimiento celular.

Tanto las funciones habituales del organismo (el metabolismo de los alimentos, la respiración y el ejercicio) producen radicales libres así como también estamos expuestos a elementos del medio ambiente que crean radicales libres como la polución industrial, tabaco, radiación, medicamentos, aditivos químicos en los alimentos procesados y pesticidas. Sin embargo no todos los radicales libres son peligrosos pues, por ejemplo, las células del sistema inmune crean radicales libres para matar bacterias y virus, pero si no hay un control suficiente por los antioxidantes, las células sanas pueden ser dañadas. (Federación Española del café)

1.5.2. Estrés oxidativo

Es la exposición de la materia viva a diversas fuentes que alteran el equilibrio que debe existir entre las especies reactivas y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies

químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno.

El estrés oxidativo trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular. (Venereo, 2002, pp. 126-133)

Enfermedades o procesos asociados al daño oxidativo en las moléculas biológicas:

- Envejecimiento: Peroxidación de los ácidos grasos de la membrana celular y daño del ADN.
- Aterosclerosis: Peroxidación de lípidos en las partículas de LDL con daño de otros componentes.
- Cáncer: Daño del ADN.
- Cataratas: Modificaciones irreversibles en las proteínas.
- Cuadros Inflamatorios Crónicos: Activación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria.
(Federación Española del café)

1.5.3. Antioxidante

Un antioxidante es una sustancia que se encuentra en bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable (biomoléculas) y que reacciona con mayor velocidad con el radical libre de esta manera retarda o previene la oxidación de las biomoléculas. Dicho de otra manera son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas. (Venereo, 2002, pp. 126-133)

Tipos de antioxidantes

- **Antioxidantes endógenos:** mecanismos enzimáticos del organismo (superóxidodismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y la coenzima Q-). Algunas enzimas necesitan cofactores

metálicos como selenio, cobre, zinc y magnesio para poder realizar el mecanismo de protección celular.

- **Antioxidantes exógenos:** son introducidos por la dieta, se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (vitaminas E y C y del caroteno) y provenientes de vegetales como flavonoides y compuestos polifenólicos. (Martínez y Pulido)

1.5.3.1. Flavonoides como antioxidantes

La estructura química de los compuestos polifenólicos es la que les confiere la capacidad antioxidante que ejercen sobre los radicales libres. Esta actividad antioxidante se ve directamente relacionada con el grado de metoxilación, el número de grupos hidroxilo.

Por ello los flavonoides que presentan mejor actividad antioxidante son:

- Tienen 2 grupos hidroxilo en posición orto en el anillo B, por lo que le confiere una alta estabilidad al radical que se forma después de la reacción con la especie reactiva.
- Contienen un doble enlace 2,3 en conjugación con el 4-oxo (C=O) en el anillo C.
- Aquellos compuestos que tienen grupos OH- en 3 y 5 y el grupo oxo (C=O) en 4 de los anillos A y C.

Los flavonoides que presentan mejor actividad antioxidante son: quercetina, rutina, catequina, epicatequina, cianidina, apigenidina, crisina y taxifolin.

Los flavonoides son transportados unidos a la albumina hasta el hígado, de allí se conjugan con grupos sulfato y metilo o ambos a la vez. La adición de estos grupos aumenta el tiempo de eliminación en circulación y disminuye la toxicidad. Ya que se ubican en la membrana en la interfase lípido/agua son los primeros en reaccionar con las especies reactivas de oxígeno que se forman en esa área.

Las funciones que se conocen de los flavonoides son:

1. Inhibición enzimática (ciclooxigenasa, lipoxigenasa, mieloperoxidasa, xantina oxidasa, NADPH, oxidasa, etc.)
2. Estos compuestos se oxidan dando lugar a compuestos más estables.
3. Pueden estabilizar compuestos obtenidos a partir de los radicales libres.
4. Pueden presentar un efecto aditivo a la defensa antioxidante endógena.

Entre sus efectos clínicos tenemos: antiteterogénico, antitrombogénico, antiinflamatorio (disminuye la inmovilización de los leucocitos, disminuye la activación del complemento, reduce los niveles de ciclooxigenasa), antitumoral, antiviral. (Valls)

1.6. Vegetales utilizados

1.6.1. Sangre de drago (*Croton lechleri*)



Figura 2-1: Arbol y látex envasado de *Croton lechleri*

Elaborado por: (Chávez, 2016)

El término “Sanguis Draconis” hace referencia a la resina de color rojo muy parecida a la sangre que posee la especie *Croton lechleri* también se puede obtener de otras especies como: *Daemonorops* incluyendo *Daemonorops didymophyllus*, *Daemonorops propinquus* (originarias de la península Malaya). En Ecuador se encuentra en la región amazónica, su aspecto es muy llamativo por constituirse un árbol frondoso ha hecho que los científicos estudien esta especie por más de un siglo

incentivados por sus múltiples usos terapéuticos entre los cabe mencionar: actividad cicatrizante, antitumoral, reumatismos, antiinflamatorio entre otras. (Pieters, 1998)

1.6.1.1. Taxonomía

- **Reino:** Plantae
- **División:** Angiospermas.
- **Clase:** Dicotiledóneas.
- **Orden:** Geraniales.
- **Familia:** Euphorbiaceae
- **Género:** *Croton*.
- **Especie:** *lechleri*

1.6.1.2. Descripción

Croton lechleri, la especie productora de sangre de drago más conocida y estudiada, es una especie monoica, perenne, arbórea o arbustiva que puede alcanzar más de 25 m de altura.

Las copas son globosas con un enramado desordenado, generalmente con ramificación simpodial y con fuerte tendencia a la bifurcación cuando crece a pleno sol. Las ramas están cubiertas con pelos estrellados más o menos simples. Las hojas son simples, anchas y marcadamente cordiformes, opuestas con el ápice decuspidado o ligeramente acuminado, membranosas, plurinervadas, con 2 glándulas en la base cordada. Las hojas jóvenes son tormentosas, más tarde se vuelven glabrescentes por ambos lados. Los peciolos son más o menos largos y las estipulas son rígidas y sublanceoladas.

Presentan espigas florales terminales o subterminales de 22 a 72 cm. Las flores pistiladas tienen el ovario supero elipsoide con tres carpelos, cada uno de los cuales contiene un ovulo y esta densamente cubierto por 2 capas de tricomas multirradiados.

Al estrujar las hojas ofrecen una fragancia intensa y penetrante, las hojas maduras cambian a color ladrillo amarillento y luego se desprenden. (Risco, et al., 2005, pp. 101- 114)

1.6.1.3. Hábitat

Las especies conocidas como sangre de drago se distribuyen en un amplio rango climático altitudinal, desde los 200 hasta aproximadamente los 1000 metros sobre el nivel del mar en bosque tropical húmedo desde el sur de México hasta América del sur. *Croton lechleri* es nativo de Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil; en estos se países se cultiva para la producción del látex. (Risco, 2005, pp. 101- 114)

1.6.1.4. Obtención

Este proceso se denomina sangrado. El látex brota al hacer incisiones en la corteza del tronco, se realizan dos tipos de incisiones: familiar y comercial. Cuando el fin de recolección es familiar las incisiones son oblicuas, en espiral o en V en cambio cuando se realiza con fines comerciales se abate el árbol las incisiones deben realizarse a una distancia de 20 cm.

La abundancia de la resina obtenida varía según los siguientes factores: diámetro del tronco, existencia de cortes previos, hora de recolección siendo mayor en la mañana, presencia de suelo, habilidad, fase lunar y características intrínsecas de la planta. (Risco, 2005, pp. 101- 114)

1.6.1.5. Composición química

Los componentes mayoritarios encontrados y aislados de la sangre de drago son: catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina (monómeros de flavan-3-oles) y proantocianidinas de diferentes tamaños. (Ubillas et al., 1994 pp. 77-106)

Los componentes básicos son: (+)-catequina, (+)-galocatequina, (-)-epicatequina y (-)-galoepicatequina, siendo predominantes (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina. Entre los compuestos minoritarios, se encuentran el alcaloide taspina, un lignano denominado dimetilcedrusina y diterpenos como ácido hardwickiico, bicantriol, crolequinol, ácido crolequínico, korberina A y korberina B. (Risco, 2005, pp. 101- 114)

Además están presentes β -sitosterol y β -sitosterol-3-O- β -D-glucopiranosido, 1,3,5-trimetoxibenceno, 2,4,6-trimetroxifenol, 3,4-dimetoxifenol, alcohol 3,4-dimetoxibenzílico y alcohol 4-hidroxifenetílico

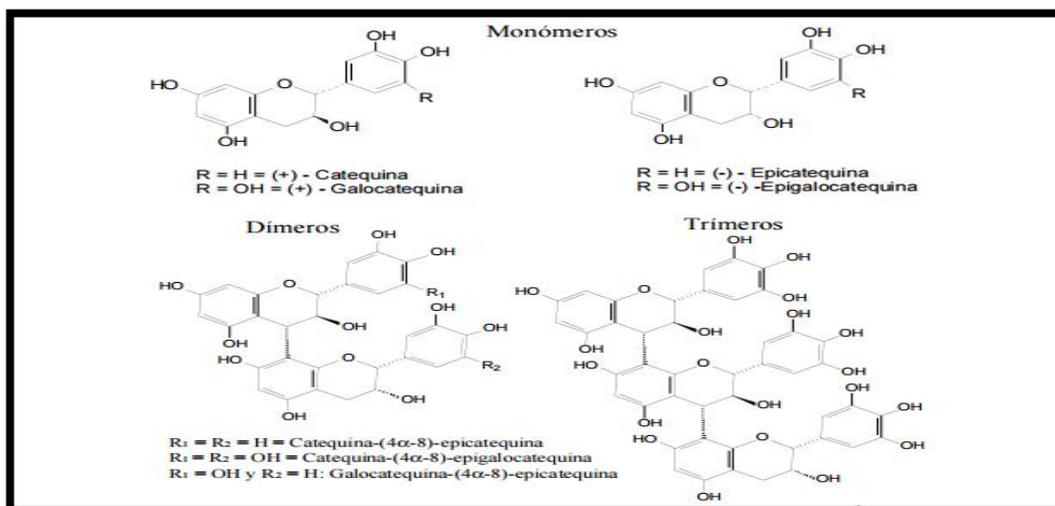


Figura 3-1: Monómeros, algunos dímeros proantocianidínicos y el trímero galocatequina caracterizados en la sangre de drago de *Croton lechleri*.

Fuente: (Risco, et al., 2005, p. 102)

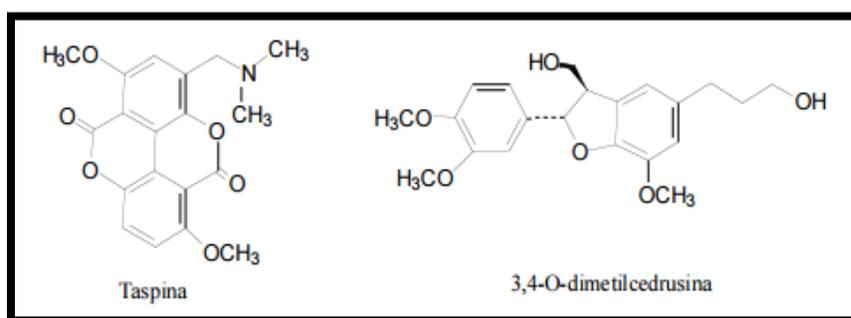


Figura 4-1: Estructura de la taspina y de la 3,4-O-metilcedrusina

Fuente: (Risco, et al., 2005, p. 102)

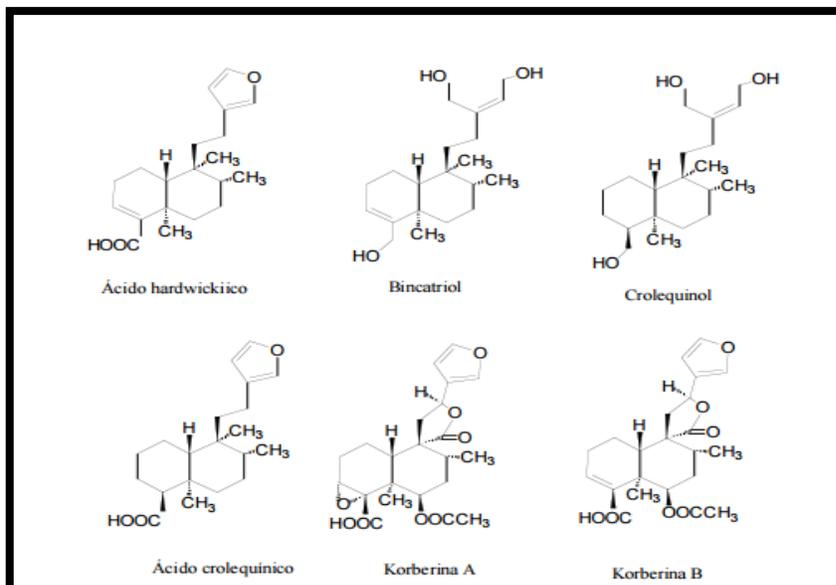


Figura 5-1: Diterpenos aislados de la sangre de drago de *Croton lechleri*

Fuente: (Risco, et al., 2005, pp. 103)

1.6.1.6. *Propiedades terapéuticas*

- **Usos populares**

A nivel popular se utiliza mayoritariamente como cicatrizante por sus propiedades antiinflamatorias, antisépticas y hemostáticas. Esta especie además es utilizada como antidiarreico, tratamiento de úlceras gastrointestinales, cólicos uterinos, retención de orina y como anticancerígeno. Algunas tribus la usan también para tratar fiebres de origen digestivo, piorrea, baños vaginales antes del parto. (Risco, 2005, pp. 101- 114)

1.6.1.7. *Actividad farmacológica*

- ✓ **Actividad cicatrizante**

Es una de las actividades más estudiadas de la sangre de drago, su mecanismo de acción es estimulando la contracción de la herida, favoreciendo la formación de la costra y regeneración de la piel por la formación de colágeno. La cicatrización de las heridas se atribuye a la tarpina, la 3'-4-O-dimetilcedrusina y los polifenoles (catequinas y proantocianidinas), sin embargo se ha demostrado que el látex total es más activo que sus componentes aislados.

La taspasina promueve las fases tempranas de la curación de la herida, su mecanismo de acción está relacionado con la estimulación de la quimiotaxis de los fibroblastos. (Cai, et al., 1991)

A pesar de que los componentes ya mencionados como la taspina y la 3-4-O-dimetilcedrusina son muy efectivos como cicatrizantes se ha comprobado que el látex resulta mucho más efectivo al momento de curar heridas que los componentes aislados. Los polifenoles también juegan un papel importante al momento de cicatrizar las heridas inducidas por úlceras gastrointestinales. (Ubillas et al., 1994 pp. 77-106)

✓ **Actividades Antimicrobianas y antivirales**

A la proantocianidina se le atribuye esta actividad inhibe diferentes virus DNA Y RNA incluyendo el virus del herpes y de la hepatitis A y B, sin embargo es inactivo frente al citomegalovirus humano, para bacterias como *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. (Ubillas et al., 1994 pp. 77-106)

✓ **Actividad Inmunomoduladora**

El extracto de sangre de drago ha demostrado inhibir la proliferación de células T estimuladas, muestra una acción dual en la modulación de la producción de especies reactivas de oxígeno y fagocitosis.

Actividad sobre la producción de especies reactivas de Oxígeno (ROS)

Se conoce como estrés oxidativo al desbalance de los procesos que generan ROS y los mecanismos que los consumen, de esta manera la producción de especies reactivas de oxígeno se producen de una manera incontrolada, entre las patologías que se pueden mencionar por una sobreproducción de especies reactivas mencionados: arterioesclerosis, cáncer, Parkinson, Alzheimer, artritis reumatoide, shock hemorrágico, SIDA y envejecimiento principalmente.

Los taninos condensados y en general los ácido fenoles, polifenoles, flavonoides poseen la capacidad de quelar los radicales libres y se relacionan con propiedades antioxidantes. (Ubillas et al., 1994 pp. 77-106)

✓ Actividad antiinflamatoria

El compuesto relacionado a esta actividad farmacológica es la taspasina, aunque se ha demostrado también que el látex tiene una potente actividad intraperitoneal, esta actividad antiinflamatoria del látex de sangre de drago es comparable con el naproxeno sódico. (Ubillas et al., 1994 pp. 77-106)

1.6.2. Guarango (*Caesalpinia spinosa*)



Figura 6-1: Árbol y vainas maduras de *Caesalpinia spinosa*

Elaborado por: (Chávez, 2016)

El guarango también conocido como tara, taya, vinillo, divi divi de tierra fría o acacia, es una especie de tipo leguminosa distribuida a lo largo de la región andina, es un árbol que fue utilizado por las culturas pre-incas e incas en la elaboración de tintes para textilería, cerámica, curtido de pieles y medicina, por poseer entre sus componentes: taninos, colorantes, gomas y otros, utilizados en la industria farmacéutica como excipientes de los medicamentos, estas aplicaciones revelan el importante uso de la especie con fines no maderables. (Hidrobo, 2011)

1.6.2.1. Taxonomía

- **Reino:** Vegetal
- **División:** Espermatofita.
- **Clase:** Angiosperma.
- **Orden:** Fabales.
- **Familia:** Caesalpinacea
- **Género:** *Caesalpinia*
- **Especie:** *Caesalpinia spinosa*

1.6.2.2. Descripción botánica

Es un árbol pequeño de etapa juvenil su tamaño varia de 2 a 3 m y puede llegar a medir hasta 12 m en pocas ocasiones. El fuste es corto cilíndrico y está recubierto por una corteza gris espinosa agrietada con ramillas densamente pobladas. (Hidrobo, 2011)

Presenta raíces profundas y pivotantes; las hojas son alternas, compuestas, pinnadas y dispuestas en espiral, son ovoides, brillantes y ligeramente espinosas de color verde oscuro pueden llegar a medir de 8 a 12 cm de longitud. La inflorescencia presenta racimos terminales de 15 a 20 cm de largo, las flores son amarillas con un ligero tono rojizo.

Los frutos son vainas arqueadas cuyas dimensiones son de 2 cm de ancho por 8 cm de largo presenta un color naranja rojizo y en su interior contienen de 6 a 7 semillas. En tanto que las semillas son ovoides, algo aplanadas brillantes con una gamma de color que va desde café hasta negro, de las mimas se pueden extraer gomas comestibles.

1.6.2.3. Distribución geográfica

Es una especie arbórea perenne, que se encuentra principalmente en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile. Se encuentra en la zona occidental de la cordillera de los Andes, su desarrollo se evidencia desde los 800 m hasta los 3200 m de altura. En nuestro país la producción de guarango se presenta en todas las provincias de la región Sierra. (Hidrobo, 2011)

1.6.2.4. Condiciones de hábitat

Esta planta resiste sequías, plagas y enfermedades además que se adapta a una variedad de climas y suelos como se muestra en la Tabla 1-1:

Tabla 1-1: Zonas de vida de *Caesalpinia spinosa*.

Zona de Vida	Precipitaciones promedio (mm)	Temperaturas promedio (°C)	Distribución
Estepa espinosa – montano bajo	250 – 500	12 -18	Toda la zona
Bosque seco – montano bajo	500 – 700	12 -18	Zona de menor precipitación
Matorral desértico – montano bajo	200 – 250	13 – 18	Zona de mayor precipitación y lomas
Monte espinoso – premontano	350 – 500	18 – 20	Zona de menor precipitación
Matorral desértico – Premontano	200 – 250	18 - 21	Zona de mayor precipitación y humedad

Realizado por: Belén Chávez, 2016

Fuente: (Hidrobo, 2011)

1.6.2.5. Composición química

Semillas: Contienen: aceites volátiles, ácidos grasos (lípidos 5,68%), antocianinas esteroides, triterpenoides, flavonoides, resinas, taninos (0,22%), antracenos, hidratos de carbono (fructosa, glucosa, sacarosa), proteínas (17,86%), vitaminas además iones y minerales (calcio 80mg, magnesio 292mg, hierro 20mg, fósforo 270mg, potasio, cloruros, nitratos, sulfatos).

Hojas: glicósidos, gomas, mucílagos, taninos (12.7% en la forma de taninos gálicos), antraquinonas: agliconas libres, C-glicósidos, esteroides y flavonoides. (Hidrobo),

Vainas: Contienen entre 50 a 60 % de taninos hidrolizables de tipo galotaninos y en muy baja proporción elagitaninos. Para muchos galotaninos el poliol central es la glucosa, en otros puede ser el glucitol, hamametosa (derivada de la ribosa), ácido sikímico, quínico, quercitol.

Los taninos de las vainas de guarango se componen esencialmente de los esteres polidigaloilicos de ácido quínico.

Los taninos del guarango pueden ser divididos en 3 grupos:

- Ácidos mono-, di-, tri, y tetragaloilquinico los que no tienen enlaces depsídicos
- Ácidos relacionados a la estructura 3, 4,5-trigaliol, considerados como los componentes mayores de los taninos del guarango.
- Despídos relacionados al ácido 1, 3, 4, 5-tetragaloilquinico.

Galotaninos del guarango son: ácido 4-galoil-5-(digaloil) quinico, ácido 5-galoil-4-(digaloil) quinico, ácido 3-(digaloil) 4-5-digaloilquinico, ácido 4-(digaloil) 3-5-digaloilquinico ácido 1, 3, 4 trigaloilquinico. (Hidrobo, 2011)

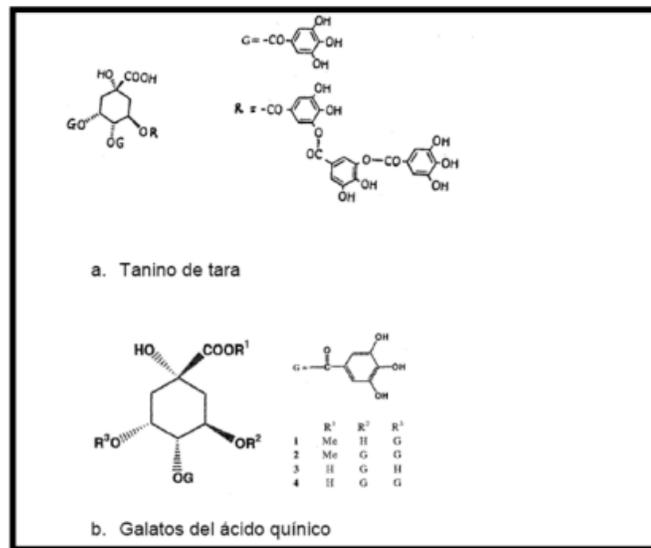


Figura 7-1: Estructura parcial de tanino del guarango (a), galatos del ácido quínico (b)

Fuente: Hidrobo, 2011

1.7. Animales de experimentación

Desde la antigüedad los seres humanos utilizaron animales como modelo de la vida, pero nunca se planteó en profundidad la reflexión acerca de la utilización bioética y racional de los mismos por esta razón es importante tratar 3 temas: los beneficios que ha supuesto el uso de animales de experimentación para la especie humana, la actitud en contra de la experimentación animal por parte de algunos científicos, la postura actual de los científicos hacia la experimentación animal y finalmente la postura hacia el animal en sí mismo.

Pese a todos problemas a tratar expuestos anteriormente los científicos han propuesto plantear el principio de las 3R: remplazar, reducir y refinar.

1.7.1. Principio de las 3R

1.7.1.1. Remplazar

Esta regla pretende sustituir los animales de laboratorio por equivalentes no animales

1.7.1.2. Reducir

El concepto de reducir no es más que reducir el número de animales utilizados, utilizando modelos estadísticos que realizan un cálculo inverso, es decir, teniendo en cuenta la mortalidad que implica un determinado procedimiento por nuestra experiencia anterior, podemos averiguar el número de animales de los que hemos de partir. Para estos estudios existen multitud de paquetes software especializado, como por ejemplo el Nquery Advisor con firma irlandesa.

1.7.1.3. Refinar

Término en el que se engloban todos aquellos procedimientos que pretendan minimizar el sufrimiento o la ansiedad de los animales utilizados. (Boada, et al.)

1.7.2. Estandarización de los individuos



Figura 8-1: Rata albina wistar

Elaborado por: (Chávez, 2016)

1.7.3. Reactivo biológico

Es un animal de experiencia, en función de un tema de estudio es capaz de dar una respuesta fiable y reproducible, las condiciones de vivienda y pureza del animal a experimentar deben ser vigiladas, controladas y constatadas. Se conoce como homogeneidad del reactivo biológico a la capacidad de garantizar resultados reproducibles. Existen diferentes tipos entre estas tenemos:

- **Homogeneidad somática:** se refiere a la igualdad de sexo, peso, edad, esto se logra fácilmente en roedores y difícilmente en animales superiores como carnívoros, primates y herbívoros.
- **Homogeneidad genética:** obtenida por una tasa de consanguinidad elevada.
- **Homogeneidad sanitaria:** Tendencia a evitar posibles perturbaciones debidas a estados patológicos no deseados, que influyen en la expresión genética del animal (genotipo), condicionando a largo plazo el fenotipo y a corto plazo el estado físico.

El objetivo es la obtención de animales biológicamente estandarizados, otro concepto similar es la estandarización de variables ambientales del espacio vital ocupado por el animal como: temperatura, ventilación, humedad, luz y las variables de comportamiento o etiología.

1.7.4. Especies más utilizadas

Se exponen algunas especies más comúnmente utilizadas ordenadas por tamaño:

1. **Roedores y lagomorfos:** las ventajas que presentan estos animales son su pequeño tamaño, alta prolificidad, su facilidad de manejo y mantenimiento.
2. **Carnívoros:** entre los animales de experimentación de este grupo encontramos al perro y gato.
3. **Animales de granja:** oveja, cerdo, primates no humanos. (Boada, et al.)

Tabla 2-1: Especies más utilizadas en modelos experimentales y sus respectivos usos.

Especie	Nombre común	Características experimentales	Uso
<i>Mus musculus</i>	Ratón	Muy susceptibles desarrollar tumores. Escasa longevidad.	Ensayos de administración de dosis, mutágenesis y neogénesis. Obtención de anticuerpos monoclonales. Oncología Medicina comparada
<i>Rattus norvegicus</i>	Rata	El más usado en microcirugía. Longevidad de 2 a 3 años	Evaluación de medicamentos. Modelos de enfermedades Microcirugía Geriatría
<i>Cavia porcellus</i>	Cobaya	Fácil sensibilización y fácil acceso y eliminación del timo. Alta susceptibilidad a patologías. Favorable anatomía del oído medio.	Inmunología: producción y control de sueros. Investigación auditiva. Dietética: estudios sobre vitamina C y aminoácidos
<i>Cricetulus griseus</i> y <i>Mesocricetus auratus</i>	Hámster chino y dorado	Incisivos de crecimiento continuo. Abazones para almacenamiento y transporte de alimentos. Elevada incidencia de diabetes Numero de cromosomas (22).	Estudios de caries dental. Nutrición Teratología y genética. Citogénesis Citología e histología.
<i>Meriones unguiculatos</i>	Jerbo	Crisis epileptiformes con rápida recuperación sin secuelas. Hospedador de diferentes microorganismos y parásitos	Nutrición Estudios de arterioesclerosis Medicina comparada
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Conejo	Inconvenientes: Sistema nervioso inestable, fragilidad vascular y ósea, estado sanitario poco satisfactorio, sensibilidad a los anestésicos y tendencia a la obesidad	Inmunología: obtención de anticuerpos Toxicología: evaluación muscular y ocular. Reproducción: anticonceptivos, embriología y teratología.

			Farmacología: cardiovascular (ateromatosis)
--	--	--	---

Elaborado por: Belén Chávez, 2016

Fuente: (Boada, et al., 2011)

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de investigación

La investigación se llevó en las siguientes instalaciones académicas:

- En el laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.
- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH.
- Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- En el Bioterio de la Facultad de Ciencias, en la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

2.2. Recolección del material vegetal

➤ Sangre de Drago

Sangre de drago (*Croton lechleri*) proveniente del cantón Puyo, de la comunidad de Cañarí, Provincia de Pastaza.

➤ Guarango

Guarango (*Caesalpinia spinosa*), proveniente del cantón Penipe, provincia de Chimborazo.

2.3. Reactivos Biológicos

En el estudio *in vivo* de la actividad antiinflamatoria se utilizaron ratas wistar (*Rattus norvegicus*).

2.3.1. Descripción

Tabla 1-2: Descripción animales de experimentación ratas albinas wistar.

Nomenclatura	Cr1 (WI) BR
Peso promedio	250 – 350g
Edad	4 a 5 meses
Sexo	Machos
Lugar de nacimiento	Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSPI)

Elaborado por: (Chávez, 2016)

2.3.2. Condiciones Ambientales

Tabla 2-2: Condiciones ambientales a la que fueron sometidas los animales de experimentación.

Temperatura	23 ± 2 ° C
Humedad	21 ± 2 %
Período de fotoluminiscencia	12 Horas de luz y 12 Horas de oscuridad
Alimentación	22,3 g al día
Tiempo de ambientación	7 días

Elaborado por: (Chávez, 2016)

2.4. Equipos y Reactivos

2.4.1. Equipos

- Molino Arthur Thomas
- Estufa Memmert SNB400
- Sonificador
- Mufla

- Rotavapor
- Vórtex
- Balanza analítica Radwag
- pHmetro 211 microprocessor pH Meter
- Espectrofotómetro Cole Parmer S-2150
- Refractómetro de Abbé

2.4.2. *Materiales*

- Picnómetro de 10 mL.
- Cápsula de porcelana.
- Pisceta
- Pinzas para cápsula
- Reverbero
- Baño de agua.
- Desecadora conteniendo sílica gel.
- Pipeta aforada de 5 mL.
- Cuba cromatografía.
- Capilares
- Aspersor
- Vasos de precipitación.
- Balones aforados de 10mL
- Balones aforados de 100mL
- Balones aforados de 50mL
- Probeta de 50mL
- Micropipeta automática de 1000uL
- Micropipeta automática de 100uL
- Tubos de vidrio de 10mL
- Puntas azules de 1000uL
- Puntas amarillas de 100uL
- Puntas azules de 1000uL
- Puntas amarillas de 100uL
- Embudo de separación de 250 ml.

- Embudo buchner
- Kitasato de 250mL
- Gradilla
- Espátula
- Termómetro
- Probeta de 100 ml
- Torundas
- Jeringas de 10 ml
- Jeringas de 1 ml
- Cánula
- Pie de rey

2.4.3. Reactivos

- Ácido fórmico
- Ácido clorhídrico 37°
- Metanol 99.83°
- Etanol 96°
- Etanol 70°
- Etanol 40°
- Etanol 38°
- Metanol 98°
- Hexano
- Cloroformo
- Acetato de etilo
- Agua destilada
- Ácido acético glacial
- Poliamida
- Diclorometano
- Hidróxido de amonio
- Hidróxido de amonio al 10%
- Soluciones de ácido gálico
- Nitrito de Sodio 5%

- Tricloruro de aluminio 10%
- Hidróxido de sodio 1M
- Soluciones de quercetina
- Carbonato de sodio al 20%
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 20%
- Solución de DPPH* (60 uM)
- Solución de carragenina al 1%
- Solución de Diclofenaco Sódico
- Alcohol antiséptico

2.5. Técnicas y métodos

La metodología aplicada en la investigación se resume en la Figura 1-2 donde se explica los procedimientos y técnicas empleadas para el control de calidad de las tinturas; identificación cualitativa de metabolitos de la fracción flavónica y alcaloidea de las drogas crudas; análisis cuantitativo de fenoles y flavonoides totales mediante espectrofotometría, evaluación de las actividades: antioxidante in vitro y antiinflamatoria in vivo.

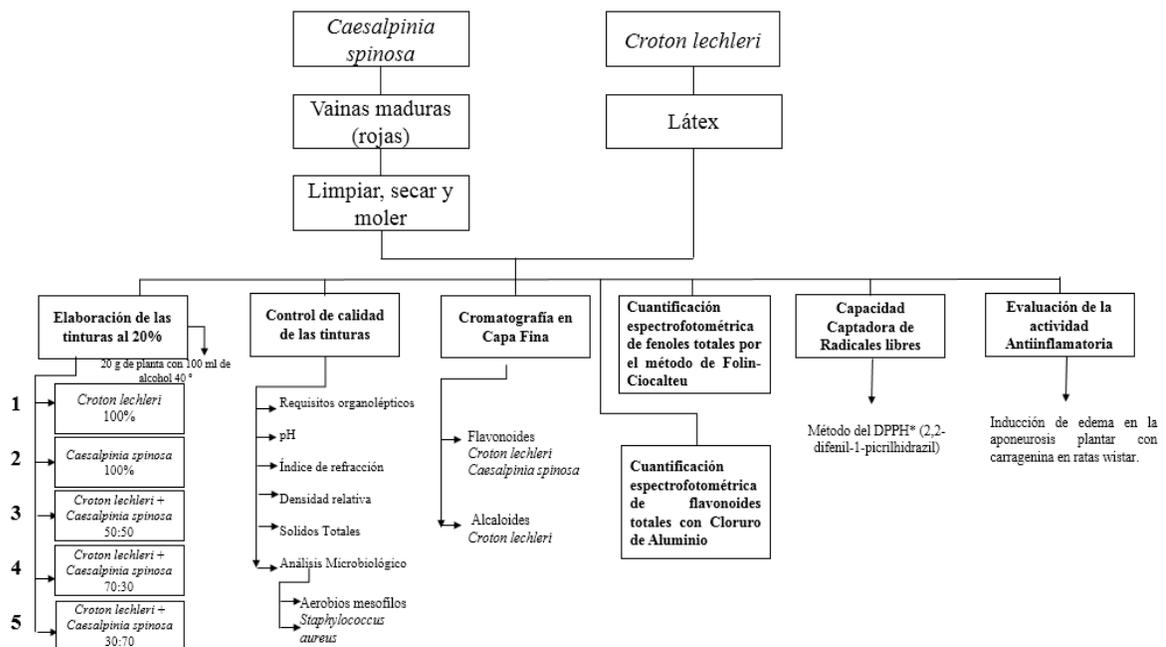


Figura 1-2: Protocolo de la investigación

Elaborado por: (Chávez, 2016)

2.5.1. Acondicionamiento de material vegetal

2.5.1.1. Secado

Para la elaboración de la tintura se utilizó únicamente las vainas de la *Caesalpinia spinosa* para ello se extrajeron las semillas que contienen las vainas para desecharlas, estas vainas se lavaron y secaron bajo sombra a temperatura ambiente y en un lugar seco durante una semana.

2.5.1.2. Molienda

Después del secado, se molió en un molino cuchilla giratoria marca Arthur H. Thomas CO para obtener partículas de 2.0-3.0 mm.

2.5.2. Control de calidad de tinturas

2.5.2.1. Determinación de los requisitos organolépticos.

- **Determinación de olor:** Se tomó una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo. Se percibió el olor y se determinó si corresponde con la característica del producto.
- **Determinación del color:** Se tomó un tubo de ensayo bien limpio y seco y se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

2.5.2.2. Determinación de la densidad relativa.

Se determinó mediante gravimetría, según lo establece las Normas Ramales para drogas crudas y extractos y tinturas, 1992. Primero se pesó el picnómetro de capacidad 10 mL vacío y seco, posteriormente se llenó con la tintura a ensayar es importante mantener el ensayo a temperatura de 25 °C (± 1 °C) durante 15 min y ajustar la tintura al nivel empleado, si es preciso, una tira de papel para extraer el exceso y secar exteriormente el picnómetro.

Se pesó cuidadosamente el picnómetro con la tintura y se repitió la operación con el agua destilada a 25 °C, después de limpiar el picnómetro. El ensayo se llevó a cabo por triplicado. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

La densidad relativa a 25 °C se calculó con la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M} \quad \text{Ecuación: 1}$$

Donde:

M₁: peso del picnómetro con la tintura (g)

M₂: peso del picnómetro con el agua (g)

M: peso del picnómetro vacío (g).

2.5.2.3. *Determinación del índice de refracción.*

Esta determinación se efectuó en un refractómetro de Abbé. Se colocó sobre el prisma de medición una gota de agua destilada con una varilla de vidrio, se ajustó el equipo, seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se colocó una gota de la tintura sobre el prisma de medición, se cerró el termoprismo y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se procedió de la misma forma que con el agua. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

2.5.2.4. *Determinación del pH de extractos y tinturas*

La determinación se realizó en un pHmetro 211 microprocessor pH Meter para ello se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH Posteriormente se determinó el valor del pH de la muestra, introduciendo el electrodo en la tintura a analizar. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

2.5.2.5. *Determinación de los sólidos totales.*

La determinación se realizó por métodos gravimétricos, cuyo fundamento es la medición de la variación de masa, a causa de la pérdida de sustancias volátiles por acción del calor. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

Se tomaron 5,0 mL de la tintura y se la colocó en una cápsula previamente tarada a 105 °C, se evaporó sobre baño de agua hasta que el residuo esté aparentemente seco. Se pasó entonces hacia una estufa y se dejó hasta peso constante (aproximadamente 3 h). Se retiró la cápsula de la estufa y se colocó en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente.

La cantidad de sólidos totales, expresado en %, R, se calcula por la siguiente fórmula:

$$St = \frac{Pr - P}{V} \times 100 \quad \text{Ecuación: 2}$$

Donde:

P_r= masa de la cápsula más el residuo (g)

P= masa de la cápsula vacía (g)

V= volumen de la tintura de ensayo.

100= factor matemático para el cálculo.

2.5.3. *Análisis microbiológico*

2.5.3.1. *Recuento de Aerobios mesófilos en 3M Placas Petrifilm™*

Se colocó la placa Petrifilm en una superficie plana y nivelada. Posteriormente se levantó la lámina semitransparente superior, con la micropipeta perpendicular a la placa Petrifilm, se colocó 1 ml de la tintura a analizar en el centro de la película cuadrículada inferior, se liberó la película superior dejando que caiga sobre la dilución, con el lado rugoso hacia abajo se colocó el dispensador o esparcidor sobre la película superior cubriendo totalmente la muestra. Luego se presionó suavemente el dispensador o esparcidor para distribuir la muestra sobre el área circular. Luego se esperó que se solidifique el gel

en aproximadamente 1 minuto. Finalmente se incubó las placas a 35 °C durante 48 horas. (Universidad Autónoma de México)

2.5.3.2. Recuento de Staphylococcus aureus en 3M Placas Petrifilm™

Se procedió de la misma manera que la metodología para Recuento de Aerobios mesófilos, modificando el tiempo de incubación a 24 horas y a una temperatura de 35 °C. En el supuesto que se presenten colonias de *Staphylococcus aureus* su identificación es sencilla por lo que se manifiestan con un color rojo violeta. (Guía de Interpretación)

2.5.4. Cromatografía en capa fina

2.5.4.1. Compuestos fenólicos

Cinco mL de las tinturas madres se extrajeron en tubo de tapa rosca con 10 mL de etanol al 70% y 10 mL de n- hexano durante 15 minutos en el vórtex. Luego utilizando un embudo de separación se extrajo la fracción etanólica.

Cromatografía en columna

Como se muestra en la Figura 2-2, para la purificación de la fracción fenólica de las tinturas madres se procedió a realizar cromatografías en columna para cada una de las tinturas utilizando como fase móvil metanol y como soporte poliamida, en primera instancia se dejó eluir la fracción etanólica anteriormente obtenida y después la fase móvil. Se recolectó la solución metanólica que eluyó de la columna en un vaso de precipitación para una posterior concentración en el Rotavapor a una temperatura de 60°C.

Finalmente 20 a 30 µL de la fracción metanólica de las tinturas fueron aplicadas sobre la placa de Sílica gel con indicador fluorescente 254 nm utilizando la siguiente fase móvil:

Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100, 11, 11, 26). (Wagner & Bladt, 2001, pp. 230)

2.5.4.2. Alcaloides

Para la tintura de *Croton lechleri* por su de alcaloides se consideró importante la identificación de los mismos mediante cromatografía en capa fina, para ello se procedió a purificar la tintura para obtener la fracción alcaloidea de la siguiente manera:

En un mortero se colocó 2 mL de la tintura con 2 mL de solución de amonio al 10% y 7 g de óxido de aluminio, se homogenizó hasta la formación de una pasta, la mezcla se empacó en una columna (porosa frita), finalmente se agregó 10 mL de cloroformo como eluyente. De 20 a 30 μ L de la fracción clorofórmica recolectada fue aplicada en una placa de Silica gel con indicador fluorescente 254 nm utilizando la siguiente fase móvil:

Diclorometano, metanol, hidróxido de amonio (8:2:0,1). (Wagner & Bladt, 2001, pp. 3-4)

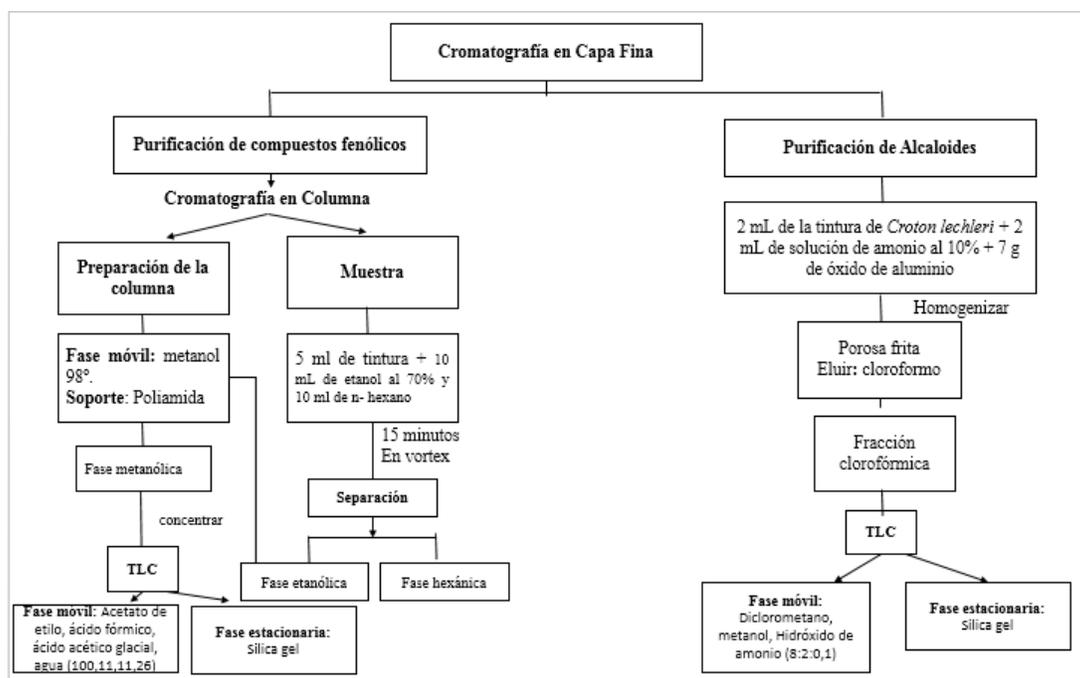


Figura 2-2: Esquema de la cromatografía en Capa Fina de las Tinturas Madres

Elaborado por: (Chávez, 2016)

2.5.5. Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

La concentración de fenoles totales de cada una de las tinturas fue medida por espectrofotometría, el fundamento de la técnica se basa en una reacción colorimétrica de óxido-reducción en el que el agente oxidante fue el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Como se aprecia en la Figura 3-2. Se preparó una curva de calibración para lo que se utilizó una solución estándar de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.

En cuanto al procedimiento se realizó el mismo tanto para el tratamiento de las tinturas y de las soluciones estándar.

- Dos mL de las muestras y de la solución estándar de ácido gálico se mezclaron 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 20%.
- Cinco minutos después, se añadió 0,5 ml de solución de Na_2CO_3 al 20% y 5 ml de agua destilada.
- Se deja reposar la mezcla durante una hora protegiendo de la luz y a temperatura ambiente.
- Realizar las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.
- Trazar la curva de calibración (Concentración Vs Absorbancias). (Shao-hua & Lean-teik, 2012, pp. 122-127)

Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por ml de tintura, por 100 gramos de planta y en porcentaje.

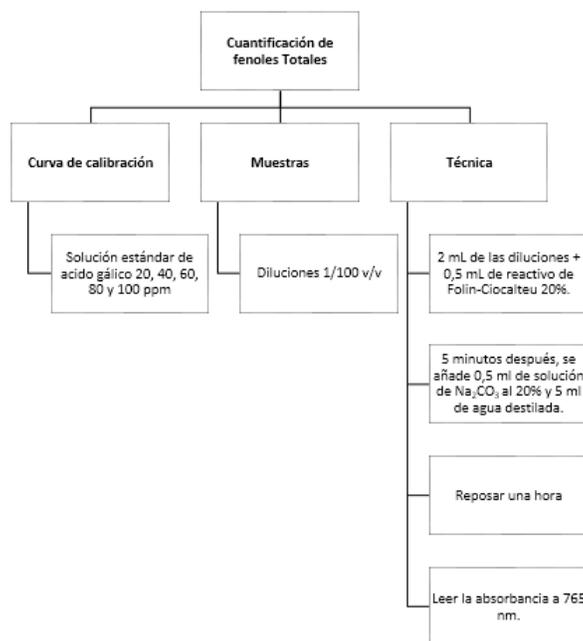


Figura 3-2: Esquema de la cuantificación de Fenoles totales. Método Folin - Ciocalteu

Elaborado por: (Chávez, 2016)

2.5.6. *Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico*

La cuantificación de flavonoides totales para cada una de las tinturas analizadas se realizó mediante espectrofotometría utilizando cloruro de aluminio.

En la figura 4-2 se muestra en primera instancia preparación de una curva de calibración, para ello se utilizó como solución patrón quercetina a concentraciones comprendidas entre 20 y 100 ppm.

- Un ml de la muestra o de las soluciones patrones se añadió 4ml de agua destilada y 0.3 ml de NaNO_2 al 5%.
- Después de 5 minutos se añadió 0.3 ml de AlCl_3 al 10%,
- Seis minutos después se añadió 2ml de NaOH 1M.
- Se mezcló y se dejó en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente bajo sombra.

- La absorbancia de la mezcla se leyó a 510 nm.

Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por ml de tintura, por 100 gramos de planta y en porcentaje. (Boukhris, Simmonds, Sayadi, & Bouaziz, 2012)

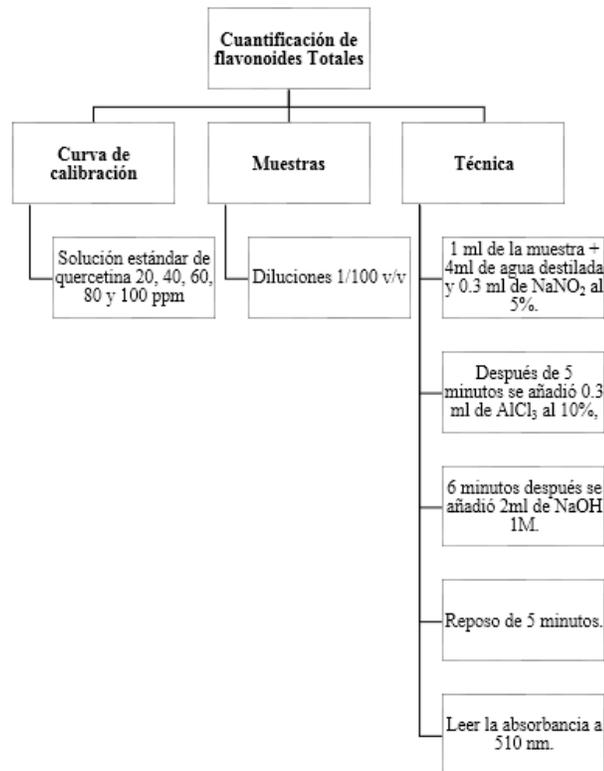


Figura 4-2: Esquema de la cuantificación de Flavonoides totales.

Elaborado por: (Chávez, 2016)

2.5.7. Capacidad captadora de radicales libres *in vitro*. Método DPPH*

La capacidad antioxidante de las tinturas se evaluó mediante el ensayo del radical estable DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil libre).

El DPPH* es un radical libre que se puede obtener directamente disolviendo el reactivo en un solvente orgánico (metanol). La reducción del DPPH* se monitorea por la disminución de la absorbancia a una longitud de onda característica, en su forma de radical libre el DPPH* absorbe a 515 nm y cuando

sufre una reducción por la acción de un antioxidante, esta absorción desaparece. La disminución del radical DPPH* proporciona un índice para evaluar la capacidad antioxidante del compuesto que se está evaluando. (Tovar, 2013)

El modelo de la actividad antioxidante que ejerce un compuesto sobre el radical se explica a continuación:



Figura 5-2: Modelo de la actividad antioxidante que ejerce un antioxidante sobre el radical DPPH*

Fuente: (Tovar, 2013)

Un átomo de hidrógeno proveniente del antioxidante es aceptado por parte de la molécula de DPPH*, lo que resulta en una reducción del DPPH* a DPPH₂, por lo tanto mientras la concentración del radical disminuye la forma reducida DPPH₂ aumenta produciéndose un cambio de color de púrpura a amarillo y la absorbancia de la solución decrece. (Mishra et al., 2012, 1036-1043)

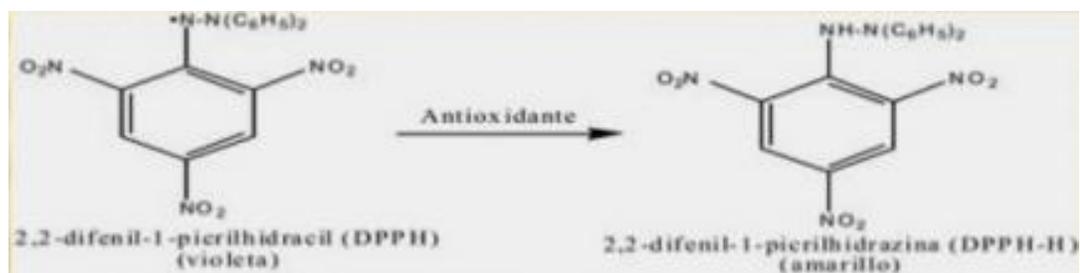


Figura 6-2: Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante.

Fuente: (Tovar, 2013)

El ensayo del DPPH* se basó en el método propuesto por Brand-Williams. En la figura 5-2 se muestra como fueron ensayadas varias concentraciones de tinturas redisueltas en metanol al igual que las de la solución patrón, dichas concentraciones son seleccionadas con el fin de obtener porcentajes de inhibición comprendidas entre 0% y 100%. De cada tintura o solución estándar (ácido gálico) se tomó una alícuota de 100 μL y se mezcló con 3,9 ml DPPH* en metanol (60 μm) la mezcla fue agitada vigorosamente, se dejó en reposo bajo sombra durante 60 minutos, transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 515 nm.

La inhibición de los radicales libres DPPH* en porcentaje (%I) se calculó de la siguiente manera:

$$\%I = \frac{A_{control} - A_{muestra}}{A_{control}} \quad \text{Ecuación: 3}$$

En dónde.

%I = porcentaje de inhibición

A control= la absorbancia de la reacción control que contiene todos los reactivos, excepto el extracto de prueba.

A muestra= absorbancia del extracto de ensayo.

Los resultados se expresan como Concentración Inhibitoria Media (CIM), la concentración de la tintura necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH* en un 50%. La CIM fue calculada a partir del programa estadístico B LeSq. Los valores más bajos de CIM indican una mayor actividad antioxidante. Se calculó el CIM de ácido gálico, antioxidante puro, que fue utilizado como control positivo.

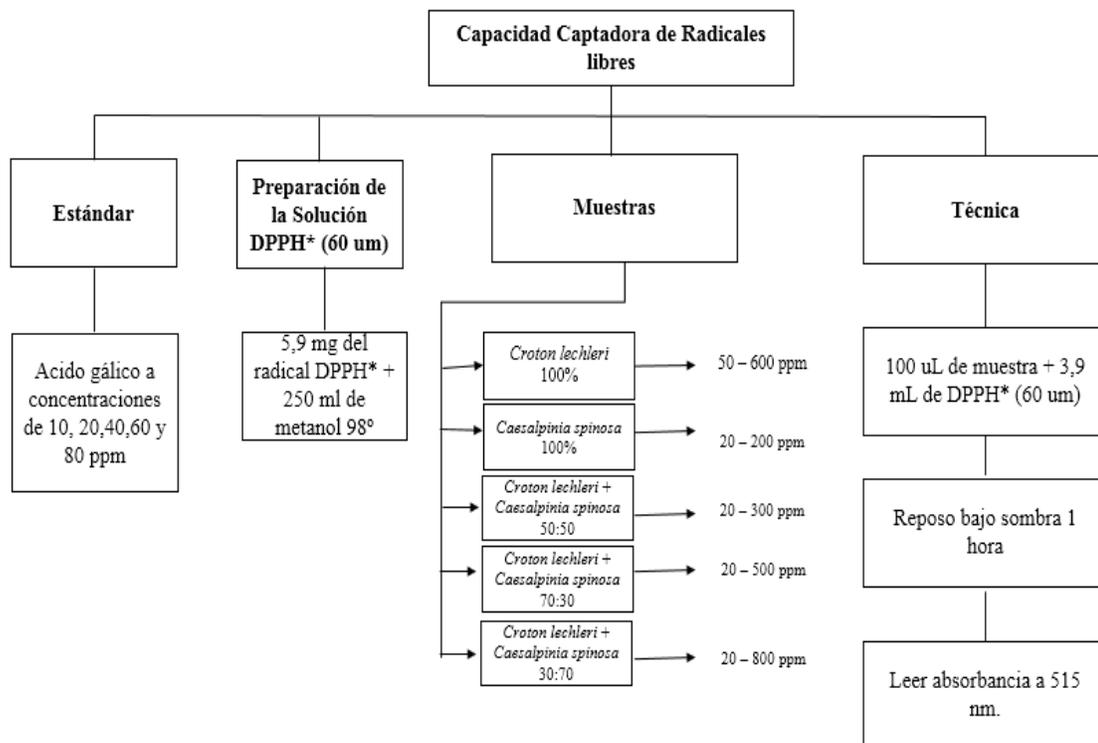


Figura 7-2: Esquema de la Capacidad Captadora de Radicales libres

Elaborado por: (Chávez, 2016)

2.5.8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

El método utilizado para la evaluación de la actividad antiinflamatoria fue la prueba de edema plantar con carragenina propuesto por Winter. Se fundamenta en la inyección de carragenina bajo la aponeurosis plantar de la pata posterior derecha de la rata, lo que le provocará una reacción inflamatoria a ser ensayada por las sustancias antiinflamatorias en cuestión. (Poma et al., 2011, pp. 29-33).

Como se muestra en la Figura 6-2, el experimento se distribuyó en 2 etapas:

- **Etap 1:** es la etapa de ambientación en la que los animales que conforman cada uno de los grupos experimentales fueron sometidos a las mismas condiciones de temperatura, humedad, período de fotoluminiscencia, alimentación, además que los animales se ambientan al investigador, manipulación y a la técnica que se aplicara para que se llevara cabo en la investigación. Esta fase tuvo una duración de 7 días.

- **Etapa 2:** En esta etapa los modelos de animales participan en el diseño experimental. En la siguiente tabla se indica el protocolo utilizado, cabe destacar que los ensayos se realizaron por triplicado.

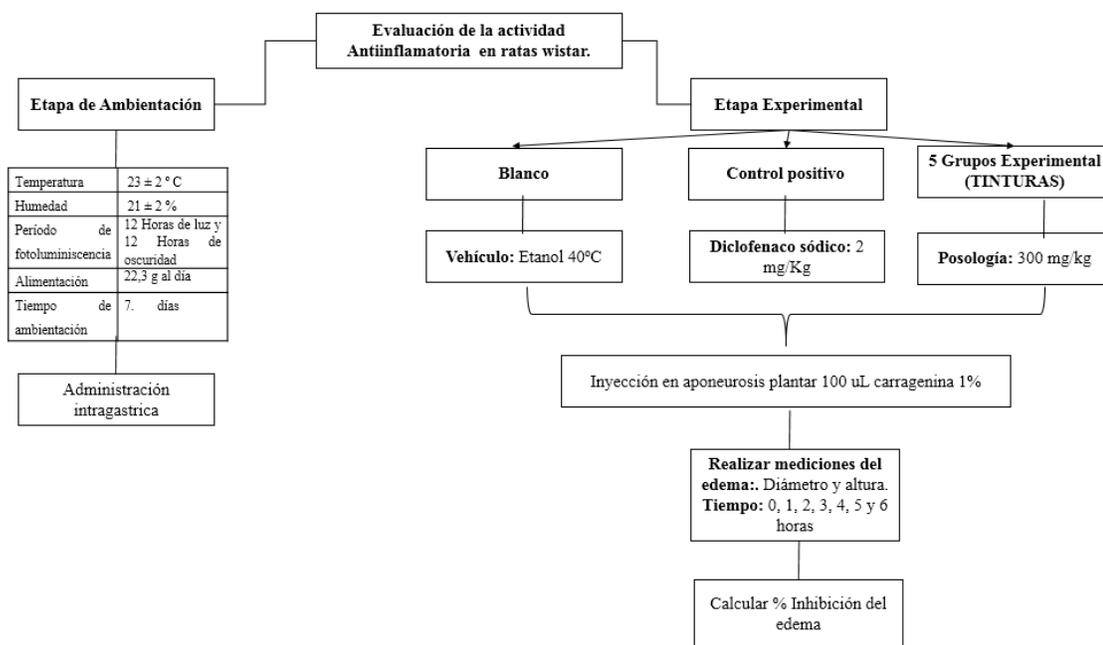


Figura 8-2: Esquema de la Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria en ratas wistar.

Elaborado por: (Chávez, 2016)

A continuación en la tabla 1-2 se explica el modelo utilizado para la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*.

Tabla 3-2: Protocolo de la evaluación de la Actividad Antiinflamatoria “*in vivo*”.

CÓDIGO	GRUPO	TRATAMIENTO	POSOLOGÍA	NÚMERO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACION
P	Control Positivo	Edema plantar + Fármaco estándar (Diclofenaco 50 mg)	2mg/Kg	3
B	Blanco	Edema plantar + vehículo	-----	3
SD.	Grupo Investigativo 1	Edema plantar + tintura de <i>Croton lechleri</i> al 100%	300 mg/kg (0,5 ml)	3
G.	Grupo Investigativo 2	Edema plantar + Tintura de <i>Caesalpinia spinosa</i> al 100%	300 mg/kg (0,5 ml)	3
SD1.G1	Grupo Investigativo 3	Edema plantar + <i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 50:50	300 mg/kg (0,5 ml)	3
SD2.G2	Grupo Investigativo 4	Edema plantar + <i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 70:30	300 mg/kg (0,5 ml)	3
SD3.G3	Grupo Investigativo 5	Edema plantar + <i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 30:70	300 mg/kg (0,5 ml)	3

Elaborado por: (Chávez, 2016)

Condiciones de los animales

- Por lo menos 12 horas de ayuno
- Los grupos experimentales deben estar conformados por animales con pesos similares.

Cada una de las tinturas fueron administradas por vía intragástrica 30 minutos antes de la inducción del edema. Transcurrido ese tiempo se inyectó la carragenina al 1% (0.05mL en la aponeurosis plantar

de la pata posterior derecha). Las mediciones de las patas con el edema se realizaron a las 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 horas después de la inducción de la inflamación, se tomará mediciones de diámetro y altura del edema utilizando un pie de rey. Se calculó el volumen de cada medición y se realizó el promedio de las tres réplicas.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Control de calidad

Los requisitos organolépticos son un indicador de calidad y estabilidad de las tinturas muy importantes, ya que a través de los sentidos se puede determinar si la tintura es apta o no para su utilización.

Como se muestra en la tabla 1-3, se pudo observar que todas las tinturas presentaron el color correspondiente a las drogas utilizadas, en las tinturas mixtas el color preponderante corresponde a la droga que se encuentra en mayor proporción en la tintura. Respecto al olor de la tintura es característico de la droga y en las mezclas el olor a su vez corresponde al componente mayoritario.

Por otro lado se evaluó también la transparencia siendo únicamente la tintura de *Croton lechleri* la que presentó opacidad, esta característica se atribuye a que esta tintura fue elaborada con látex del vegetal siendo de densidad alta además que el contenido de antocianos le confiere opacidad a la tintura. (Ubillas et al., 1994 pp. 77-106)

Otro parámetro evaluado fue la separación de capas, de manera que para todas las tinturas fue negativo, concluyendo así que las tinturas están formadas por una sola fase y se garantiza la estabilidad física de las mismas. El último parámetro analizado fue el sabor, mismo que para todas las tinturas fue amargo y astringente puesto que los componentes mayoritarios tanto para *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa* son los compuestos fenólicos. (Ubillas et al., 1994 pp. 77-106) y (Chambi et al., 2013, pp. 168-175)

Tabla 1-3: Resultados de los requisitos organolépticos de las tinturas de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa*

PARÁMETRO	TINTURAS				
	<i>Croton lechleri</i> 100%	<i>Caesalpinia spinosa</i> 100%	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 50:50	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 70:30	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 30:70
OLOR	Picante característico	Picante característico	Característico o a <i>Croton lechleri</i>	Característico o a <i>Croton lechleri</i>	Característico a <i>Caesalpinia spinosa</i>
COLOR	Rojo oscuro	Café claro	Café oscuro	Café oscuro	Café claro
TRANSPARENCIA	Opaco	Transparente	Transparente	Transparente	Transparente
PRESENCIA DE PARTÍCULAS	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
SEPARACIÓN EN CAPAS	No	No	No	No	No
SABOR	Amargo – Astringente	Amargo - Astringente	Amargo - Astringente	Amargo – Astringente	Amargo - Astringente

Elaborado por: (Chávez, 2016)

3.2. Control de calidad físico de las tinturas de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa*

Los resultados de control de calidad físico de las tinturas se muestran y detallan a continuación:

En relación al pH, en todas las tinturas se obtuvieron valores entre 3,173 y 3,790, siendo el menor para la tintura de *Croton lechleri* + *Caesalpinia spinosa* 70:30 y mayor para la tintura de *Croton lechleri*, siendo mínimas las variaciones. Los valores ácidos se atribuyen a la composición mayoritaria de compuestos fenólicos en las drogas estudiadas. (Alonso, 2004, pp. 649-650)

En lo que concierne al índice de refracción y densidad relativa, las variaciones entre tinturas fueron mínimas, tal como se muestran en la tabla 2-3.

En lo que respecta al contenido de sólidos totales existe una diferencia muy marcada de la tintura madre de *Caesalpinia spinosa*, la que presenta un contenido de 12,477 % superando significativamente a las demás tinturas, y la concentración menor presentó la tintura madre de *Croton lechleri* con un porcentaje de 4,263, por lo que se concluye que la presencia de *Caesalpinia spinosa*

determina la concentración de sólidos en las tinturas mixtas. No obstante todas las tinturas cumplen con la especificación de la Farmacopea Francesa de 1989, la que establece que el contenido de sólidos totales debe ser mayor a 1,20.

Tabla 2-3: Resultados del control de calidad de las tinturas de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa*.

TINTURAS					
PARÁMETRO	<i>Croton lechleri</i> 100%	<i>Caesalpinia spinosa</i> 100%	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 50:50	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 70:30	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 30:70
PH	3,790 ± 0,010	3,337 ± 0,031	3,207 ± 0,032	3,173 ± 0,006	3,260 ± 0,010
ÍNDICE DE REFRACCIÓN	1,354 ± 0,001	1,374 ± 0,001	1,365 ± 0,001	1,361 ± 0,001	1,369 ± 0,001
DENSIDAD RELATIVA	0,979 ± 0,001	0,998 ± 0,003	0,987 ± 0,004	0,986 ± 0,000	0,990 ± 0,003
SÓLIDOS TOTALES	4,263 ± 0,061	12,477 ± 0,149	8,538 ± 0,050	6,779 ± 0,033	10,094 ± 0,074

Elaborado por: (Chávez, 2016)

3.3. Análisis Microbiológico

Mediante el análisis microbiológico realizado a las cinco tinturas, se pudo comprobar la estabilidad microbiológica que presentaron durante el periodo de la investigación.

Se investigó la presencia de microorganismos provenientes del medio ambiente como es el caso de aerobios mesófilos y *Staphylococcus aureus*, obteniéndose resultados satisfactorios al no existir ninguna unidad formadora de colonia para ambos casos. Se atribuye dicho resultado al contenido alcohólico que poseen las tinturas, y a su vez a la responsable recolección, almacenamiento y molienda de la materia prima. Sin embargo para asegurar la estabilidad de las tinturas para periodos de tiempo prolongados es necesario realizar este control de manera mensual.

Tabla 3-3: Resultados del análisis microbiológico de las tinturas de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa*.

TINTURA	<i>Aerobios mesófilos</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Croton lechleri</i> 100%	Ausencia	Ausencia
<i>Caesalpinia spinosa</i> 100%	Ausencia	Ausencia
<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 50:50	Ausencia	Ausencia
<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 70:30	Ausencia	Ausencia
<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 30:70	Ausencia	Ausencia

Elaborado por: (Chávez, 2016)

3.4. Cromatografía en capa fina (TLC)

3.4.1. Compuestos fenólicos

Una vez que se concentró la fracción metanólica recolectada de la cromatografía en columna se procedió a identificar los metabolitos secundarios utilizando cromatografía en capa fina. La fase móvil que se utilizó por mostrar una mejor resolución para identificación de compuestos fenólicos tanto de *Croton lechleri* como *Caesalpinia spinosa* fue: Acetato de etilo, ácido acético, ácido fórmico, agua (100:11:11:26). Se reveló al UV corto a 254 nm.

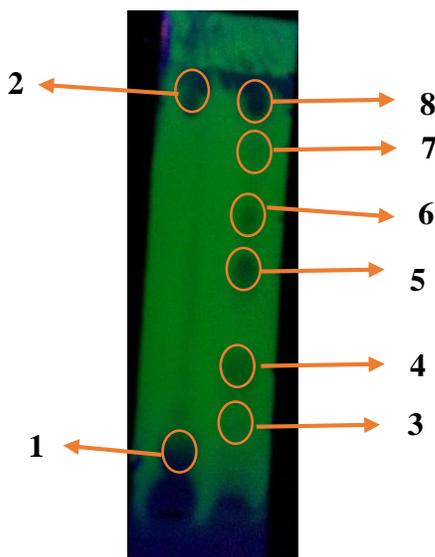


Figura 1-3: Cromatografía en capa fina de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa*.

Elaborado por: (Chávez, 2016)

Mediante Cromatografía en Capa Fina de la porción fenólica de la tintura de *Croton lechleri* fueron separados 2 compuestos con los siguientes Rf: 0,12 y 0,89. De la porción fenólica de la tintura de *Caesalpinia spinosa* se separaron 6 compuestos con los siguientes Rf: 0,21, 0,27, 0,49, 0,67, 0,83, 0,87.

Tabla 4-3: Posibles compuestos fenólicos identificados mediante TLC de *Croton lechleri*.

TINTURA	Compuesto	Rf	POSIBLE COMPUESTO IDENTIFICADO
<i>Croton lechleri</i>	1	0,12	-
	2	0,89	Ácido caféico

Elaborado por: (Chávez, 2016)

Según el Rf obtenido para la fracción fenólica de *Croton lechleri* el posible compuesto identificado es el ácido caféico cuyo Rf es igual 0,89 el mismo que coincide con fuentes bibliográficas según Wagner & Bladt, 2001, en donde se establecen que el ácido caféico presenta un Rf de 0,9 además que presentan al UV zonas fluorescentes de color azul. A pesar de que no se han realizado investigaciones para la identificación de compuestos fenólicos para *Croton lechleri*, Júnior y colaboradores en el año 2013 analizaron los componentes mayoritarios mediante HPLC de la especie *Croton campestris* y reveló la presencia de los siguientes compuestos fenólicos: ácido cafeico y ácido clorogénico y los siguientes flavonoides: quercetina, rutina, isoquercetina y kaempferol. (Júnior, et al., 2014, pp. 469-477)

Tabla 5-3: Posibles compuestos fenólicos identificados mediante TLC de *Caesalpinia spinosa*.

TINTURA	Compuesto	Rf	POSIBLE COMPUESTO IDENTIFICADO
<i>Caesalpinia spinosa</i>	3	0,21	-
	4	0,27	-
	5	0,49	Ácido clorogénico
	6	0,67	-
	7	0,83	Ácido isoclorogénico
	8	0,87	Ácido caféico

Elaborado por: (Chávez, 2016)

Según los Rf obtenidos para la fracción fenólica de *Caesalpinia spinosa* los posibles compuestos identificados son: ácido caféico, ácido isoclorogénico, ácido clorogénico, cuyos Rf son 0,87; 0,83 y 0,49 los mismos que coinciden con fuentes bibliográficas según Wagner & Bladt, 2001, en donde se

establecen que los Rf para los ácidos fenólicos identificados son: 0,9; 0,8 y 0,5 respectivamente. A pesar que no existe bibliografía acerca de los ácidos fenólicos identificados para la especie *Caesalpinia spinosa*.

Koteswara y colaboradores, en el año 2005 identificaron 5 flavonoides de la especie *Caesalpinia pulcherrima*, y evaluaron la actividad antiinflamatoria de estos compuestos. Los flavonoides identificados son: 5,7-dimetoxiflavanona; 5,7-dimetoxi-3,4-metildioxiflavanona; Isobonducellin; 2 hidroxí-2, 3, 4,6-tetrametoxichalcona y bonducellin. (Koteswara et al., 2005, pp. 249-253)

3.4.2. Compuestos alcaloideos

Se realizó TLC de alcaloides para *Croton lechleri* la fase móvil que tuvo mejor resolución para su identificación fue: Diclorometano, Metanol, NH₄OH (8:2:0.1). Se reveló con: Dragendroff y NaNO₂ al 10% y al UV cercano a 254nm.

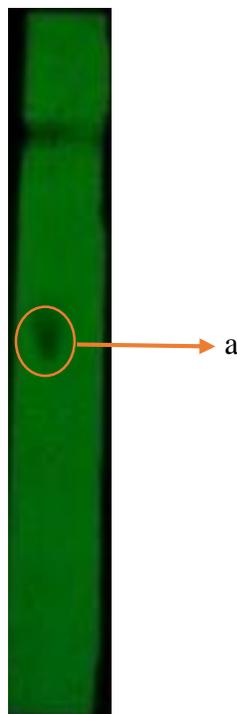


Figura 2-3: Cromatografía en capa fina de la fracción alcaloidea de *Croton lechleri*

Elaborado por: (Chávez, 2016)

Mediante Cromatografía en Capa Fina de la porción alcaloidea de la tintura de *Croton lechleri* se separó un compuesto con un Rf de 0,49 de acuerdo con datos bibliográficos correspondería al alcaloide taspina como lo menciona Arbildo y colaboradores en su trabajo de tesis titulado

"RENDIMIENTO DE TASPINA AISLADA DE 2 MUESTRAS DE *Croton lechleri* (SANGRE DE GRADO) DE LAS CUENCAS DEL BAJO NANAY Y ALTO NAPO RESPECTIVAMENTE", quienes aseguran que el Rf correspondiente a Taspina es de 0,5 puesto que realizó el análisis para las 2 muestras y obtuvo el mismo Rf de la solución de taspina purificada. (Arbildo et al., 2014, pp. 81-82).

3.5. Cuantificación de Fenoles Método de Folin - Ciocalteu

Para la cuantificación de fenoles totales de las tinturas se elaboró una curva de calibración de una solución estándar de ácido gálico, obteniendo una ecuación de la recta de: $y = 0,0008x + 0,0957$ y un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9966$.

Se realizaron diluciones de las tinturas con la finalidad de que las absorbancias obtenidas se encontrasen dentro de la curva de calibración. Las interpolaciones en la curva de calibración para las diluciones se encuentran representadas en el ANEXO P. En la Tabla 6-3 se muestran los resultados expresados en mg equivalentes de ácido gálico por ml de tintura, por 100 g de planta y en porcentaje.

Tabla 6-3: Resultados de la cuantificación de fenoles mediante el método de Folin-Cicalteu.

	TINTURAS	mg equivalentes de ácido gálico/ml de tintura	mg equivalentes de ácido gálico/100 g planta	Porcentaje
1	<i>Croton lechleri</i> 100%	9,621 ± 0,072	4810,417 ± 36,084	4,810 ± 0,036
2	<i>Caesalpinia spinosa</i> 100%	9,079 ± 0,072	4539,583 ± 36,084	4,539 ± 0,036
3	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 50:50	6,204 ± 0,072	3102,083 ± 36,084	3,102 ± 0,036
4	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 70:30	6,079 ± 0,260	3039,583 ± 130,104	3,039 ± 0,130
5	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 30:70	3,454 ± 0,072	1727,083 ± 36,084	1,727 ± 0,036

Elaborado por: (Chávez, 2016)

El contenido de fenoles totales de cada una de las tinturas analizadas varía en un rango de 1,727 a 4,810%, como se observa en la Tabla 6-3 el porcentaje más alto corresponde a la tintura madre de *Croton lechleri* con un porcentaje de 4,810%. Sin embargo, las tinturas 2, 3 y 4 correspondientes a la

tintura madre de *Caesalpinia spinosa* y a 2 mezclas respectivamente, presentan un rango de 4,539 a 3,039% sin mayor variación. No obstante la tintura 5 correspondiente a la mezcla de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa* (30:70) presentó la menor concentración de fenoles con un porcentaje de 1,727%, lo que lleva a la conclusión que el contenido de *Croton lechleri* en la tintura determina una mayor concentración de fenoles totales.

Lopes y colaboradores en el año 2014, realizaron una investigación acerca de la actividad antioxidante y mutagénica del látex de *Croton lechleri* en sistemas biológicos, en la que se indica que el contenido de componentes polifenólicos representa el 90% del peso seco del látex, incluido proantocianidinas, catequinas, epicatequinas galocatequinas y epigalocatequinas, lo cual corrobora que la tintura de *Croton lechleri* posea un mayor contenido de compuestos fenólicos sobre las demás tinturas analizadas. (Lope et al., 2014, pp. 437-435)

Chambi y colaboradores en el año 2013, indican que el contenido de fenoles totales en las vainas de la *Caesalpinia spinosa* corresponde a 55,1 gramos EAG/ 100 gramos de planta, correspondiente a: galotaninos y ácido gálico, los cuales representan el 95% del total de compuestos fenólicos presentes en las vainas de guarango y que el 5% restante puede corresponder a elagitaninos. En la tintura madre de *Caesalpinia spinosa* se cuantificaron 9,079 mg GAE/ml de tintura equivalente a 4,539 g GAE/100 gramos de planta, esta variación en contenido se atribuye a la técnica de extracción de metabolitos secundarios ya que al tratarse de una tintura el contenido de alcohol no debe superar los 40 °C y por esta razón la extracción de los componentes activos del vegetal es menor. (Chambi et al., 2013, pp. 168-175)

3.6. Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales de las diferentes tinturas se elaboró una curva de calibración de una solución estándar de quercetina, obteniendo una ecuación de la recta de: $y = 0,001x + 0,0015$ y un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9948$.

Se realizaron diluciones de las tinturas con la finalidad de que las absorbancias obtenidas se encontrasen dentro de los límites de la curva de calibración. Las interpolaciones en la curva de calibración para las diluciones se encuentran representadas en el ANEXO Q. En la Tabla 7-3 se muestran los resultados expresados en mg equivalentes de quercetina por ml de tintura, por 100 g de planta y en porcentaje.

Tabla 7-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides Totales.

	Tinturas	mg equivalentes de quercetina/ml de tintura	mg equivalentes de quercetina/100 g planta	Porcentaje
1	<i>Croton lechleri</i> 100%	10,350 ± 0,750	5175,000 ± 375,000	5,750 ± 0,375
2	<i>Caesalpinia spinosa</i> 100%	9,100 ± 0,500	4550,000 ± 250,000	4,550 ± 0,250
3	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 50:50	3,050 ± 0,000	1525,000 ± 0,000	1,525 ± 0,000
4	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 70:30	3,350 ± 0,000	1675,000 ± 0,000	1,675 ± 0,000
5	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 30:70	5,450 ± 0,000	2725,000 ± 0,000	2,725 ± 0,000

Elaborado por: (Chávez, 2016)

En lo que concierne a la cuantificación de flavonoides totales de las tinturas analizadas, la tintura madre de *Croton lechleri* presenta mayor cantidad de flavonoides con una concentración de 10,35 mg equivalentes de quercetina/ ml de tintura y 5,175 g equivalentes de quercetina / 100 gramos de planta. Seguido en orden descendente por la tintura de *Caesalpinia spinosa* y las mezclas 5, 4 y 3 respectivamente.

No existen referencias bibliográficas acerca de la cuantificación de flavonoides totales de *Croton lechleri* sin embargo, Júnior y Colaboradores, en el año 2014, cuantificaron flavonoides mediante HPLC de la especie *Croton campestris* utilizando como estándares ácidos fenólicos entre los que se mencionan: ácido cafeico y ácido clorogénico y como flavonoides: quercetina, rutina, isoquercetina y kaempferol. En esta investigación se obtuvo como resultado de la cuantificación de cada uno de los flavonoides analizados una concentración total de 99,48 mg/g de látex y un porcentaje de 9,92 %, esta concentración nos lleva a la conclusión de que la especie *Croton lechleri* al presentar el 5,750 % posee un menor contenido de flavonoides que *Croton campestris*. (Júnior et al., 2014, pp. 469-477)

En lo que concierne a la cuantificación de flavonoides para *Caesalpinia spinosa* no se existe bibliografía referente a dicha especie, no obstante Koteswara y colaboradores en el año 2005 cuantificaron 5 flavonoides presentes en *Caesalpinia pulcherrima* cuyos resultados fueron relativamente bajos con una concentración de 0,02% de los flavonoides analizados, lo que nos lleva

a la conclusión que la especie de esta investigación supera la concentración de *Caesalpinia pulcherrima*. (Koteswara et al., 2005, pp. 249-253).

3.7. Capacidad Captadora de Radicales libres

La capacidad antioxidante para cada una de las tinturas de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa* se determinó mediante el método del DPPH* puesto que posee ciertas ventajas sobre los otros métodos como ABTS Y DMPD al ser este reproducible, fácil de realizar, no emplea mucho tiempo y su costo no es elevado.

Para medir la capacidad captadora de radicales libres en primera instancia se debe determinar la cinética de reacción de cada una de las tinturas analizadas. Los resultados se expresaron como capacidad inhibitoria media.

En la tabla 7-3 se muestran las concentraciones inhibitorias medias para cada tintura, además de los límites superior e inferior donde fluctúan los resultados.

Tabla 8-3: Resultados de la capacidad captadora de radicales libres expresada como concentración inhibitoria media y los límites superior e inferior.

TINTURAS		Concentración inhibitoria media (µg/mL)	Rango	
			Límite inferior µg/mL	Límite superior µg/mL
Estándar de ácido gálico		34,4003	20,0578	59,4612
1	<i>Croton lechleri</i> 100%	267,4044	190,9413	377,4124
2	<i>Caesalpinia spinosa</i> 100%	120,0073	101,5076	142,2358
3	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 50:50	172,7431	150,7246	198,0977
4	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 70:30	140,7189	110,4726	179,4025
5	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 30:70	113,1744	89,1722	143,9595

Elaborado por: (Chávez, 2016)

Se evaluó la actividad antioxidante a través del cálculo de la concentración inhibitoria media (CIM) que es definida como la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH* al 50%.

La capacidad antioxidante depende de la estructura de los compuestos analizados puesto que mientras más grupos hidroxilos presenten los ácidos fenólicos y flavonoides, mejor será su capacidad antioxidante, por ello los monofenoles presentan una menor capacidad antioxidante que los polifenoles. (Shahidi, 1997). El ácido gálico posee en su estructura 3 grupos hidroxilos, lo que implica una concentración inhibitoria media baja y por ende una mejor capacidad antioxidante en comparación de otros ácidos fenólicos.

En esta investigación, se obtuvo que la tintura 5 correspondiente a: *Croton lechleri* + *Caesalpinia spinosa* 30:70 presentó una mejor CIM que fue de 113,1744 ya que mientras más bajo es la CIM mejor capacidad antioxidante posee la droga analizada. Así, el ácido gálico utilizado en este ensayo como estándar de referencia presentó una CIM de 34,4003.

Chambi y colaboradores, en el año 2013 evaluaron la capacidad antioxidante del extracto hidrolizado de *Caesalpinia spinosa*, donde obtuvieron ácido gálico y ácido elágico como resultado de hidrólisis de galotaninos y elagitaninanos, de los compuestos hidrolizados evaluaron la actividad antioxidante mediante los siguientes métodos: [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (ABTS), Potencial total reactivo antioxidante (TRAP) y Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC). Obtuvieron resultados muy satisfactorios, con una CIM de 25,6 µg/mL incluso similar a la CIM del ácido gálico por sí solo, que fue de 25,5 µg/mL. (Chambi et al., 2013, pp. 168-175).

En lo que concierne la especie *Croton lechleri* Lopes y colaboradores en el año 2004, evaluaron la actividad antioxidante de esta especie a través del método TRAP, basado en quimioluminiscencia, obteniendo como resultado el índice de TRAP 935.4 ± 141 µM, medidos como equivalentes de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid). Estos resultados indican que la droga analizada contiene una alta concentración de compuestos con actividad antioxidante en comparación con Trolox. (Lopes et al., 1997, pp. 103-108)

En esta investigación se comprobó que la especie *Caesalpinia spinosa* posee una actividad antioxidante superior a la especie *Croton lechleri*, sin embargo la combinación de ambas drogas ofrecen resultados más satisfactorios. Se debe tomar en cuenta que al evaluar la droga únicamente en tintura con alcohol etílico de 40° la extracción de los componentes con capacidad antioxidante es menor frente a un extracto etanólico de mayor concentración de alcohol.

3.8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria “in vivo”.

El ensayo consistió en la medición del edema plantar durante 6 horas, de manera que una vez finalizado se procedió a calcular el volumen del edema en cada intervalo de tiempo utilizando la fórmula que se muestra a continuación:

$$V = \pi \times r^2 \times h \quad \text{Ecuación: 4}$$

Donde:

V = *volumen*

π = 3,1416

r = *radio*

h = *altura*

Después se calcula la eficacia antiinflamatoria para lo que se utilizó la siguiente fórmula.

$$EA = \left(\frac{\left(\frac{B}{Bo} - \frac{V}{Vo} \right)}{\frac{B}{Bo}} \times 100 \right) \quad \text{Ecuación: 5}$$

Donde:

EA = *Eficacia antiinflamatoria*

$\frac{B}{Bo}$ = Es el incremento del volumen del blanco debido a la inflamación, con respecto al volumen inicial (Bo) del mismo

$\frac{V}{Vo}$: Es el incremento estandarizado de volumen inflamado, pero tratado con un agente antiinflamatorio

Entendiéndose como eficacia antiinflamatoria a la disminución porcentual del volumen causado por la inflamación, para cada momento de observación experimento. (Poma et al., 2011, 29-33)

Tabla 9-3: Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria expresada en eficacia inflamatoria para cada tintura y el control positivo.

EFICACIA ANTIINFLAMATORIA %						
Tiempo (horas)	Diclofenaco sódico 50mg	<i>Croton lechleri</i> 100%	<i>Caesalpinia spinosa</i> 100%	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 50:50	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 70:30	<i>Croton lechleri</i> + <i>Caesalpinia spinosa</i> 30:70
0	0.000	2.253	0.000	0.000	0.000	8.837
1	3.191	16.809	15.886	7.570	10.825	14.120
2	11.521	24.124	13.678	10.395	24.958	27.915
3	33.632	47.604	33.873	32.600	31.648	38.785
4	32.434	45.160	37.121	22.091	28.338	35.739
5	52.377	48.754	42.174	30.985	39.995	43.091
6	47.722	43.331	53.421	24.796	30.778	40.652

Elaborado por: (Chávez, 2016)

Mediante el programa estadístico SPSS se aplicó el Test ANOVA de un factor, para verificar si existe diferencia entre los tratamientos, obteniéndose un valor p de 0,676, el mismo que es mayor 0,05 (nivel de significancia) por tanto se acepta la hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$), concluyendo que no hay diferencia significativa entre los tratamientos con relación a la eficacia antiinflamatoria. La tabla ANOVA de un factor para el tratamiento se muestra en el ANEXO R.

En lo que respecta al intervalo de tiempo comprendido de 0 a 6 horas, de la misma manera se aplicó el test ANOVA de un factor, en donde se obtuvo un valor p de 0,00 el mismo que es menor a 0,05 por tanto se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los tiempos con relación a la eficacia antiinflamatoria son significativamente diferentes para lo que se aplica el test de TukeyB para determinar de qué manera influye el tiempo con relación a la eficacia antiinflamatoria. La tabla ANOVA de un factor para el tiempo se muestra en el ANEXO S.

El test de TukeyB, indica que existen 3 grupos homogéneos en lo que al tiempo respecta. El primero grupo corresponde el tiempo comprendido entre 0 – 1 hora correspondiente a la etapa de inducción de la inflamación en donde la eficacia antiinflamatoria es nula, el segundo grupo comprende 1 – 2 horas donde la inflamación alcanza su máxima expresión, en donde la eficacia antiinflamatoria es baja y el tercer grupo en un lapso de tiempo de 3 a 6 horas correspondiente a la eficacia antiinflamatoria final del ensayo. La Tabla de grupos homogéneos del Test TukeyB se muestra en el ANEXO T.

A pesar de que no existe diferencia significativa entre los tratamientos de tinturas, basándose en la eficacia antiinflamatoria final se puede apreciar en la Tabla 7-4 que la tintura 2 que corresponde a la tintura madre de *Caesalpinia spinosa* presentó una mayor eficacia con respecto a las demás tinturas debido a sus componentes polifenólicos y su estrecha relación con la actividad antioxidante *in vitro* anteriormente evaluada en la que la tintura 5 cuya composición mayoritaria de *Caesalpinia spinosa* mostró una mejor actividad antioxidante. (Koteswara et al., 2005, pp. 249-255)

Sin embargo ninguna tintura analizada presenta una buena actividad antiinflamatoria puesto que Poma y colaboradores establecen que para que una sustancia presente una eficacia antiinflamatoria alta deben presentar un porcentaje de eficacia antiinflamatoria del 70%. (Poma, et al., 2011)

En lo que concierne a la especie *Croton lechleri* a pesar de que no existe bibliografía de la actividad antiinflamatoria de esta especie otras especies han sido estudiadas como: *Croton Urucurana* cuya composición fitoquímica es similar a la especie *lechleri*, esta demostró actividad antiinflamatoria con la inhibición del edema plantar inducido con carragenina en ratones. (Woff, et al., 2015, pp. 1-23).

Croton celtidifolius fue analizado por Nardi y colaboradores en el año 2003, en donde demostraron la capacidad antiinflamatoria de esta especie en los extractos crudos, fracción acuosa, acetato de etilo, fracción butánolica las mismas que contenían una mezcla de proantocianidinas, alcanzando una reducción del edema plantar en ratas para todos los extractos y subextractos. (Nardi et al., 2003, pp. 176-184)

CONCLUSIONES

- Con cromatografía en capa fina, se identificaron posibles ácidos fenólicos: ácido caféico, ácido clorogénico y ácido isoclorogénico presentes en *Caesalpinia spinosa* y en *Croton lechleri* se identificó únicamente ácido caféico y el alcaloide taspina.
- Por espectrofotometría UV se cuantificó fenoles y flavonoides totales; siendo la tintura de *Croton lechleri*, la que presentó mayor contenido para ambos metabolitos; $9,621 \pm 0,072$ mg EAG/mL de tintura y $10,350 \pm 0,750$ mg EQ/mL de tintura.
- Con el ensayo de la capacidad captadora de radicales libres por el método del DPPH* se determinó que la CIM de las tinturas son altas en comparación con la CIM del estándar de ácido gálico por ello la actividad antioxidante es baja.
- Con la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* se concluye que las tinturas presentaron una baja eficacia antiinflamatoria por administración intragástrica, los rangos de eficacia antiinflamatoria de las tinturas fueron entre 25 y 50% valores bajos en relación al 70% en el que se evidencia una buena eficacia antiinflamatoria

RECOMENDACIONES

- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de extractos etanólicos de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa*.
- Realizar estudios de toxicidad para cada una de las tinturas analizadas.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de una fracción purificada de taspina de *Croton lechleri*.
- Analizar la actividad antioxidante del extracto hidrolizado de *Caesalpinia spinosa* rica en polifenoles.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] **AGENCIA ESPAÑOLA DE PRODUCTOS SANITARIOS Y MEDICAMENTOS.** *Ficha técnica diclofenaco llorens 75 mg.* [en línea]. España. 2013. [Consulta: 22 de febrero de 2016]. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/57589/FT_57589.pdf
- [2] **ALLAICA, Pamela. & ABDO, Susana.** *Comparación del efecto cicatrizante de tinturas elaboradas a base de guarango (Caesalpinia spinosa) y sangre de drago (Croton lechleri) aplicados en ratones (Mus musculus)* [en línea] (Tesis). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador.2015. pp. 54-67. [Consulta: 15 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/4009>
- [3] **ALONSO, Ángel.; ORTIZ, Elizabeth.; DOMÍNGUEZ, Fabiola.; LÓPEZ, Gabriela.; CHÁVEZ, Marco.; ORTIZ, A. & GARCÍA, Angel.;** “Antitumor effect of Croton lechleri Mull. Arg. (Euphorbiaceae)”. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 140 (2012), (México) pp. 438– 442.
- [4] **ARBILDO TELLO, Lindbergh. & PEREZ MACEDO, Jorge.** Rendimiento de taspina aislada de 2 muestras de *Croton lechleri* (sangre de grado) de las cuencas del Bajo Nanay y Alto Napo respectivamente. [en línea]. (Tesis). Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Perú. 2014. pp. 45-47. [Consulta: 11 de diciembre de 2015]. Disponible en: <http://dspace.unapiquitos.edu.pe/bitstream/unapiquitos/325/1/TESIS%20DE%20SUSTENTACION.pdf>.
- [5] **BOADA, María.; COLOM, Ana. y CASTELO, Nila.** *La Experimentación Animal.* [en línea]. España. [Consulta: 16 de agosto de 2015]. Disponible en: http://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2011/80084/la_experimentacion_animal.pdf
- [6] **BOUKHRIS, M.; SAYAD, S. & BOUAZIZ M.** “Chemical Composition and Biological Activities of Polar Extracts and Essential Oil of Rose-scented Geranium, Pelargonium graveolens“. *Phytotherapy Research*, vol. 8, nº 27 (2013) pp. 1206-1213
- [7] **CAI, Y., EVANS, M., ROBERTS, J., PHILLIPS, M y ZENK, H.** “Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*”. *Phytochemistry*, vol. 30, nº. 6 (1991), (Great Britain) pp. 2033-2040

[8] **CATELLI, Pierina.** *Inflamación*. [en línea]. México. 2009. [Consulta: 10 de marzo de 2016]. Disponible en: http://exa.unne.edu.ar/bioquimica/inmunoclinica/documentos/Clase_1-09-09_Inflamacion.pdf.

[9] **CHAMBI, Flor.; CHIRINOS, Rosana.; PEDRESCHI, Ronima.; BETALLELUZ-PALLARDEL, Indira.; DEBASTE, Frederic. & CAMPOS, David.** “Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods”. *Elsevier*, vol. 47, (2013), (Perú) pp. 168–175.

[10] **DESMARCHELIER, G.; WITTING, S.; COUSSIO, J. & CICCIA, G.** “Effects of Sangre de Drago from *Croton lechleri* Muell.-Arg. On the production of active oxygen radicals”. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 58 (1997), (Argentina) pp. 103- 108.

[11] *Factores causales de la inflamación*. [en línea]. España. [Consulta: 22 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/inmunologia/tema25/etexto25.htm>

[12] **FARMACOPEA FRANCESA.** 10^{ma} ed. París: Moulins-Lés-Metz: L'Adrapharm/Moisonneuve, 1989.

[13] *Fisiopatología de la Inflamación*. [en línea]. España. [Consulta: 11 de enero de 2015]. Disponible en: <http://www.idermnumbert.com/archivos/fisiopatologia.pdf>

[14] **FRANCO, Luis.; CASTRO, Jenny.; OCAMPO, Janet.; BOLÍVAR, Indira. y DÍAZ, Fredyc.** “Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. [en línea], 2013, (Cuba) vol.18 no.1, [Consulta: 28 de febrero de 2016]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000100006

[15] **GARCÍA, Pedro.** “Inflamación”. *Revista.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.* [en línea], 2008, (España), vol. 102 (1), pp 91-159 España. [Consulta: 20 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>

[16] **GONZÁLEZ, R., MARTÍNEZ, M., GARCÍA, E. y GUIADO, R.** *El proceso inflamatorio*. [en línea]. [Consulta: 22 de febrero de 2016]. Disponible en: <https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/266/1994-5.pdf?sequence=1>

[17] **GOR, A. & SAKSENA M.** “Analizan la Incidencia de Reacciones Adversas Asociadas con Antiinflamatorios no Esteroides en Pacientes con Trastornos Musculoesqueléticos”. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, vol. 1, (2011), pp. 26-29.

[18] **HIDROBO UNDA, Gabriela, & NIETO, Carlos.** *Desarrollo de un Método de Extracción, a Escala de Laboratorio, de gomas provenientes de la semilla de Guarango (Caesalpinia spinosa), para aplicación en la Industria alimenticia*. [en línea] (Tesis). (Pregrado). Escuela Politécnica Nacional. Quito-Ecuador.2011. pp. 39-52. [Consulta: 15 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/4067/1/CD-3796.pdf>

[19] *Inflamación*. [en línea]. Alicante. [Consulta: 28 de febrero de 2015]. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/25826/1/INFLAMACI%C3%93N1213.pdf>

[20] *Inflamación*. [en línea]. Venezuela. [Consulta: 22 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.webdelprofesor.ula.ve/odontologia/carjav/documentos/guiainflamacion.pdf>

[21] **JÚNIOR, Francisco.; OLIVEIRA, Dayanne.; AUGUSTI, Aline.; LINDE, Margareth.; KAMDEM, Jean. & ECHEVERRIA, Giulianna.** “Protective effects of *Croton campestris* A.St-Hillin different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins”. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 153 (2014), (Brazil) pp. 469–477

[22] **KOTESWARA, Yerra., FANG, Shih-Hua. & TZENG, Y.** “Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*”. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 100 (2005), (Taiwán) pp. 249–253.

[23] **LOPES, María.; SAFFI, Jenifer.; ECHEVERRIGARAY, Sergio.; HENRIQUES, Joao. & SALVADORA, Mirian.** “Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems”. *Elsevier Journal of Ethnopharmacology*. vol. 95, (2004), (Brazil) pp. 437–445.

[24] **MARTINEZ, Jesús. & PULIDO, María.** *La Capacidad antioxidante de la dieta española.* [en línea]. España. [Consulta: 17 de marzo de 2016]. Disponible en: http://www.nutricion.org/recursos_y_utilidades/pdf/instrucciones_rueda_antiox.pdf

[25] **MIRANDA, Migdalia.** *Métodos de análisis de drogas y Extractos.* [en línea]. Habana: 2002. [Consulta: 13 de agosto de 2015]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/251683530/Metodos-de-Analisis-de-Drogas-y-Extractos-de-Dra-Migdalia-Miranda-Martinez>

[26] **MISHRA, Krishnanand. OJHA.; Himanshu. & KUMAR, Nabo.** “Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH_ assay:A critical review and results”. *Food Chemistry*, vol. 130 (2012), (India) pp. 1036–1043

[27] **NARDI, G.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA, J.; ARRUDA, D.; TIMBOLA, A.; PIZZOLATTI, M.; CKLESS, K. & RIOBERIO, R.** “Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark”. *Phytomedicine*, vol. 10 (2003), (United States of America) pp. 176–184.

[28] NRSP 309. Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, MINSAP. (1992)

[29] **NORGREEN. S.A.** *Prospecto de Diclofenaco Sódico.* [en línea]. México. [Consulta: 22 de febrero de 2016]. Disponible en: http://www.norgreen.com/prospectos/prospecto_diclofenac.pdf

[30] **OBANDO BARRERA, Lucio.** Estudio de los alcaloides de *Croton Draconoides* “sangre de grado”, su actividad cicatrizante y el diseño de una forma farmacéutica. [En línea] (Tesis) (Pregrado). Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú. 2015. pp. 23-45. [Consulta: 11 de diciembre de 2015]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4262>.

[31] **PIETERS, Luc.** *La sangre de drago una droga tradicional de Sudamérica.* [en línea]. Quito: Abya-Yala, 1998. [Consulta: 13 de agosto de 2015]. Disponible en: <https://repository.unm.edu/bitstream/handle/1928/11039/La%20Sangre%20de%20drago.pdf?sequence=1>

[32] **POMA, E.; REQUIS, E.; GORDILLO, G & FUERTES, M.** “Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (Guanábana) de Cuzco”, *Ciencia e Investigación*, vol. 14, n° 2 (2011), pp. 29-33.

[33] **PROTOSCOLOS TERAPEUTICOS DEL ECUADOR.** *Posología de Diclofenaco Sódico*, MINSAP. (2012).

[34] *Radicales libres y Antioxidante*. [en línea]. España. [Consulta: 17 de marzo de 2016]. Disponible en:

<http://www.federacioncafe.com/Documentos/CafeYSalud/CafeYAntioxidantes/Radicales%20libres.pdf>

[35] *Respuesta inflamatoria aguda loco-regional postraumática i (inflamación)*. [en línea]. Madrid. [Consulta: 28 de febrero de 2016]. Disponible en: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/420-2014-03-20-04%20Inflamacion.pdf>.

[36] **SHAI, F.** *Natural antioxidants*. Illinois-Estados Unidos:AOCPress, 1997, p. 102

[37] **SHARAPIN, Nicolai; et al.** *Fundamentos de tecnología de productos terapéuticos*. 1era Edición. Bogotá. Colombia, 2000, pp. 61-69.

[38] **SHAO-HUA Huang & LEAN-TEIK Ng.** “Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan”. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 26, n° 1 (2012), (Taiwan) pp. 122-127.

[39] **RISCO, Ester.; ROSER, Vila.; HENRIQUES, Amelia. & CAÑIGUER, Salvador.** “Bases Químicas y Farmacológicas de la utilización de la sangre de drago”. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 140 (2012), (España) pp. 438– 442.

[40] **RODRÍGUEZ, E & VALDÉS, L.** “Consumo de Antiinflamatorios No Esteroideo en Hospital Manuel Fajardo en periodo 2012-2013”. [en línea].Cuba. [Consulta: 21 de agosto de 2015]. Disponible en: http://uvsfajardo.sld.cu/sites/uvsfajardo.sld.cu/files/consumo_de_antiinflamatorios.pdf.

[41] SCHEIBMEIR, Heath.; CHRISTENSEN, Katie.; WHITAKER, Sally.; JEGAETHESAN, Jay.; CLANCY, Richard. & PIERCE, Janet. “A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses”. *Intensive and Critical Care Nursing*, vol. 21, (2005), (United State of America) pp. 24–28.

[42] TOVAR, Jennifer & MARINO, Oscar. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera. [en línea]. (Tesis). Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología Química, Escuela de Tecnología Química. Pereira. 2013. [Consulta: 12 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/3636/1/54763T736.pdf>

[43] *Tres M Placas Petrifilm™ para el Recuento de Aerobios*. [En línea]. México. [Fecha de consulta: 05 de enero de 2016]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/PetrfilmAerobiccount_19100.pdf

[44] *Tres M Placas Petrifilm™ Staph Express para Recuento de Staphylococcus aureus*. [en línea]. [Consulta: 13 de agosto de 2015]. Disponible en: <http://multimedia.3m.com/mws/media/467012O/3m-petrfilm-staph-express-interpretation-guide-spanish.pdf>

[45] UBILLAS, S.; JOLAD, R.; BRUENING, M.; KERNAN, S. y KING, D. [et al.]. “SP-303, an Antiviral Oligomeric Proanthocyanidin from the Latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago)”. *Phytomedicine*, vol. 1 (1994), (United State of America) pp. 77-106

[46] VALLS, Victoria. *El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal. Vitaminas y Polifenoles*. [en línea]. Valencia. [Fecha de consulta: 17 de marzo de 2016]. Disponible en: http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_agosto_03/Funcionales/vegetales, vitaminas, polifenoles.pdf

[47] VENEREO, Justo. “Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes”. *Revista Cubana de medicamentos* [en línea], 2002, (Cuba) vol 31 (2), pp. 126-133. [Consulta: 20 de febrero de 2016]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_2_02/MIL09202.pdf

[48] **WAGNER, H. & BLADT, S.** *Plant Drug Analysis: A thin layer Chromatography Atlas*. 2^a ed. Springer, 2001, pp. 230.

[49] **WAGNER, H. & BLADT, S.** *Plant Drug Analysis: A thin layer Chromatography Atlas*. 2^a ed. Springer, 2001, pp. 3-4

[50] **WANG, T., JÓNSDÓTTIR, R., & ÓLAFSDÓTTIR, G.** “Total phenolic compounds: radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds”. *Food Chemistry*, vol. 16 (2009), pp. 240–248.

[51] **WOLFF, K.; LOUSADA, L.; MALANGE, K.; DO PRADO, R.; FIGUEIREDO, P. & RODRIGUES, F.** “Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark”. *Journal of Ethnopharmacology*. (2016), pp. 1-23.

ANEXOS

ANEXO A: Materia vegetal *Caesalpinia spinosa* y látex de *Croton lechleri*



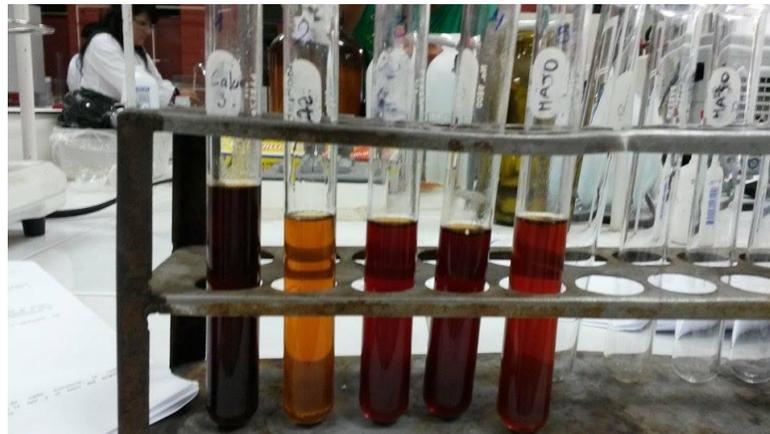
ANEXO B: Maceración y Sonicación de las tinturas



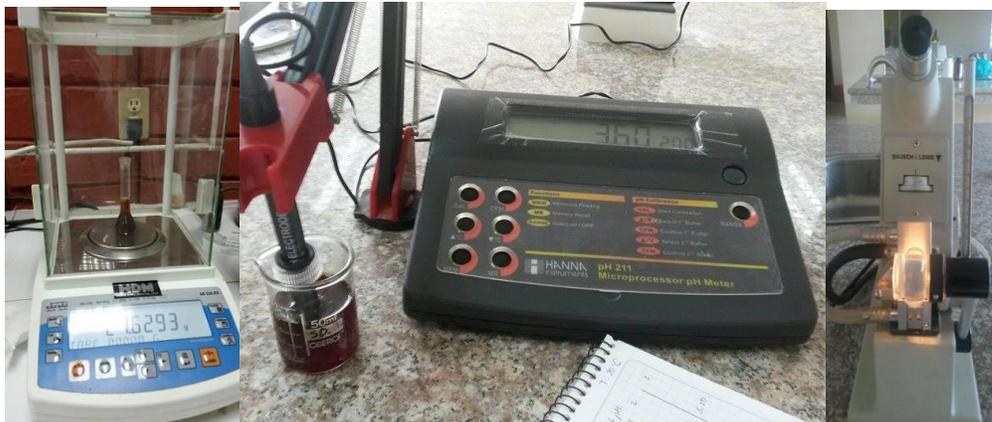
ANEXO C: Elaboración de las 5 Tinturas a base de *Caesalpinia spinosa* y látex de *Croton lechleri*



ANEXO D: Análisis Organoléptico.



ANEXO E: Determinación de la densidad relativa, solidos totales, determinación del pH e índice de refracción.



ANEXO G: Análisis Microbiológico en cabina de flujo laminar.



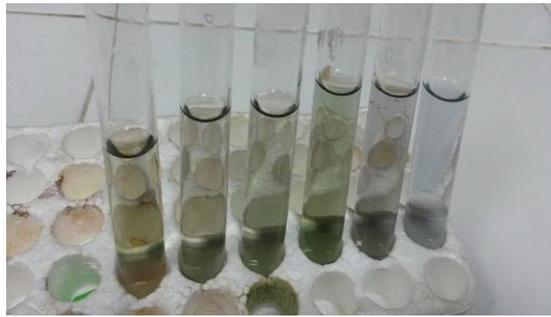
ANEXO G: Cromatografía en columna para las fracciones etanólica de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa*



ANEXO H: Cromatografía en Capa Fina para la fracción metanólica de *Croton lechleri* y *Caesalpinia spinosa* y la fracción alcaloidea de *Croton lechleri*.



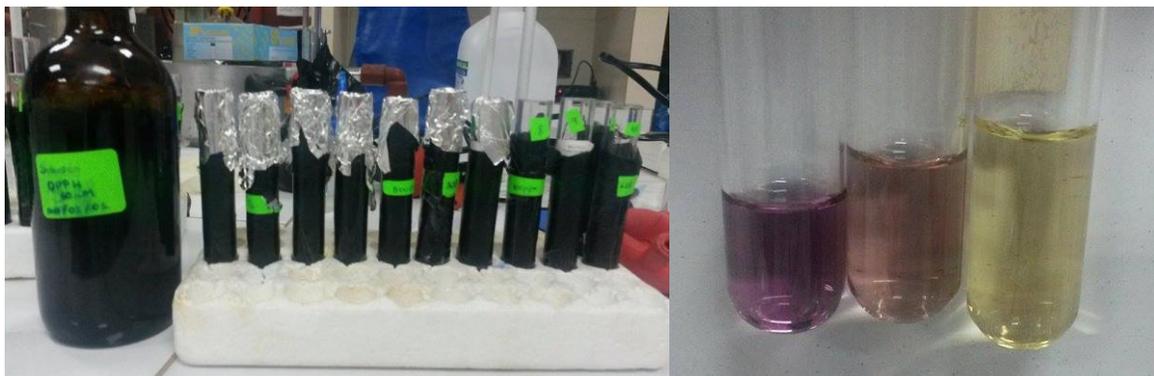
ANEXO I: Cuantificación de fenoles totales mediante de espectrofotometría. Método Folin-Ciocalteu



ANEXO J: Cuantificación de flavonoides totales con cloruro férrico mediante de espectrofotometría.



ANEXO K: Determinación de la capacidad captadora de electrones por el método del DPPH*



ANEXO L: Materiales utilizados para la evaluación de la actividad Antiinflamatoria



ANEXO M: Administración intragástrica de las tinturas.



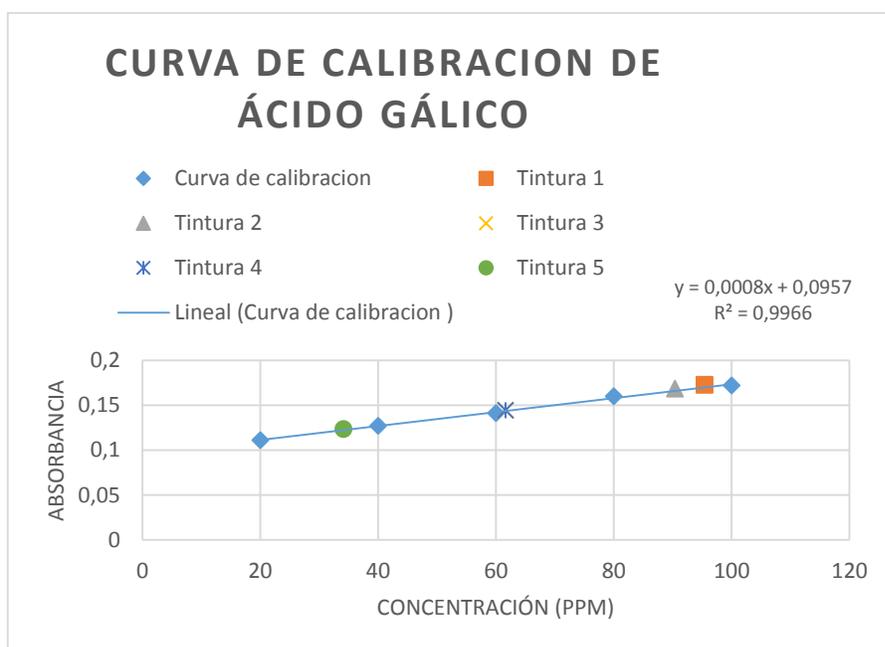
ANEXO N: Inducción del edema plantar con carragenina al 1%



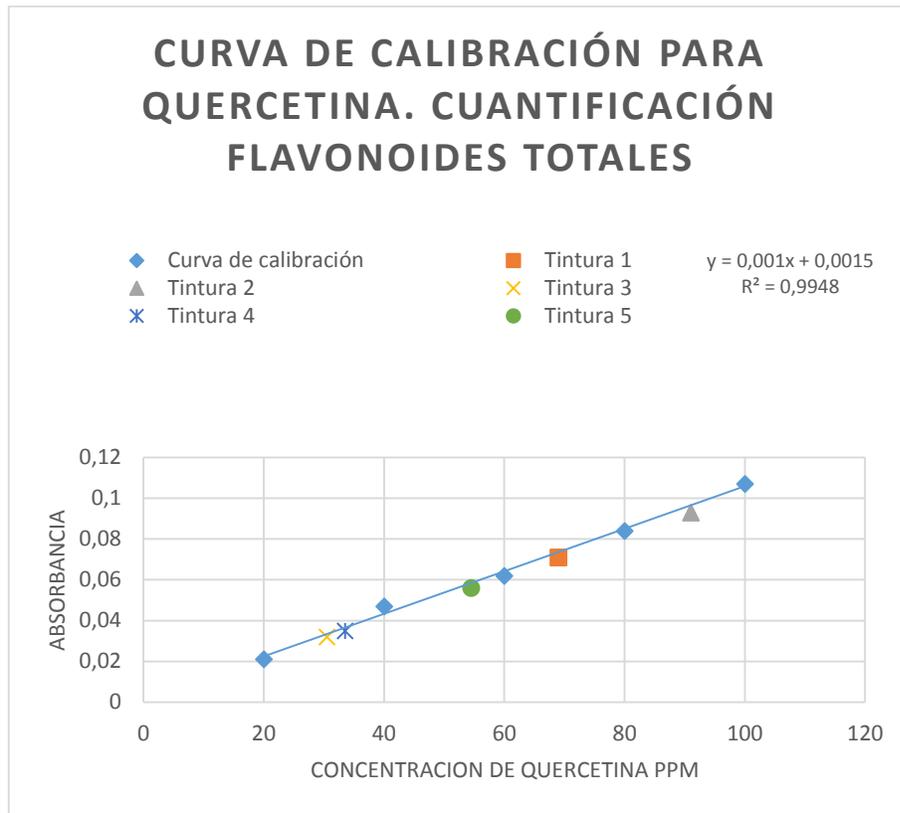
ANEXO O: Mediciones de diámetro y altura del edema generado.



ANEXO P: Curva de calibración para ácido gálico usada en la cuantificación de fenoles.



ANEXO Q: Curva de calibración para quercetina usada en la cuantificación de flavonoides.



ANEXO R: Tabla del TEST ANOVA de un factor para los tratamientos aplicados.

ANOVA

eficacia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	873,722	5	174,744	,633	,676
Dentro de grupos	9937,732	36	276,048		
Total	10811,453	41			

ANEXO S: Tabla del TEST ANOVA de un factor para los tiempos del ensayo.

ANOVA

Eficacia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	8973,658	6	1495,610	28,483	,000
Dentro de grupos	1837,795	35	52,508		

Total	10811,453	41			
-------	-----------	----	--	--	--

ANEXO T: Tabla de subconjuntos homogéneos del test de TukeyB para el tiempo

Subconjuntos homogéneos

Eficacia antiinflamatoria

Tukey B^a

Tiempo	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0	6	1,84833		
1	6	11,40017	11,40017	
2	6		18,76517	
4	6			33,48050
3	6			36,35700
6	6			40,11667
5	6			42,89600

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

ANEXO U: Evaluación de la eficacia antiinflamatoria con respecto al tiempo de ensayo

Evaluación de la actividad antiinflamatoria

