



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA  
DE *Campyloneurum amphostenon* MEDIANTE INHIBICIÓN DE  
EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATAS  
*Rattus norvegicus*”**

Trabajo de titulación presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA:** NANCY ALEXANDRA VARGAS MAJI

**TUTORA:** Dra. SUSANA ABDO, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2017

© 2017, NANCY ALEXANDRA VARGAS MAJI

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: “DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE *Campyloneurum amphostenon* MEDIANTE INHIBICIÓN DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATAS *Rattus norvegicus*” de responsabilidad de la señorita egresada Nancy Alexandra Vargas Maji, 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**

BQF. Diego Vinueza Tapia., M.Sc.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Nancy Alexandra Vargas Maji, declaro que el contenido y los resultados expuestos en esta Tesis de Grado son de mi total responsabilidad y el patrimonio intelectual de la misma pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

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

Riobamba, 18 de abril del 2017

---

**NANCY ALEXANDRA VARGAS MAJI**

**060405054-2**

## **DEDICATORIA**

A Dios, que me ha regalado la vida y ha sabido guiarme, darme sabiduría y fuerza para no decaer ante las adversidades.

A mis padres Alfonso y Emperatriz que gracias a su esfuerzo diario, su amor, su apoyo incondicional han sido fuente de inspiración para poder culminar con éxito esta etapa de mi vida.

A mi hermana Paola por ser mi fuente de apoyo, mi consejera y por compartir la alegría de la vida y a la vez conocimientos de nuestras carreras, para ti todo el amor y agradecimiento.

A mis amigas quiénes han formado una parte fundamental de mi vida y con las cuales he compartido momentos memorables durante esta etapa universitaria.

Alexandra

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por haberme dado la vida a mis padres por haber depositado toda su confianza en mí, y por ser el pilar fundamental de mi vida.

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 académica.

A mi tutora de Tesis Dra. Susana Abdo, por su excelente colaboración y asesoramiento en la dirección del presente proyecto de investigación.

Al BQF. Diego Vinuesa por el apoyo brindado, la experiencia impartida y por la colaboración excepcional en el desarrollo de la presente investigación.

A toda mi familia por su apoyo incondicional.

A mis amigos quiénes han sabido apoyarme y están dispuestas a brindarme su apoyo incondicional, mi eterna gratitud hacia ustedes.

Alexandra

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE GRÁFICAS</b> .....	xi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	xiii
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	xv
<b>RESUMEN</b> .....	xvii
<b>SUMMARY</b> .....	xviii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I</b> .....	5
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	5
<b>1.1. Inflamación</b> .....	5
<i>1.1.1. Definición</i> .....	5
<i>1.1.2. Respuesta Inflamatoria</i> .....	6
<i>1.1.3. Signos Clínicos de la Inflamación</i> .....	7
<i>1.1.4. Mediadores de la inflamación</i> .....	8
<i>1.1.5. Tipos de inflamación</i> .....	9
<i>1.1.5.1. Inflamación Aguda</i> .....	9
<i>1.1.5.2. Inflamación Crónica</i> .....	9
<i>1.1.6. Fases de la Inflamación</i> .....	10
<b>1.2. Antiinflamatorios</b> .....	11
<i>1.2.1. Definición</i> .....	11
<i>1.2.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)</i> .....	11
<i>1.2.2.1. Mecanismo de acción</i> .....	12
<i>1.2.2.2. Reacciones adversas más frecuentes</i> .....	13
<i>1.2.2.3. Uso Clínico</i> .....	13
<i>1.2.2.4. Medicamentos representativos</i> .....	14

<b>1.2.3. Antiinflamatorios esteroideos</b> .....	14
1.2.3.1. <i>Mecanismo de acción</i> .....	15
1.2.3.2. <i>Reacciones adversas</i> .....	15
1.2.3.3. <i>Medicamentos representativos</i> .....	15
<b>1.3. Diclofenaco sódico</b> .....	16
1.3.1. <i>Mecanismo de acción</i> .....	16
1.3.2. <i>Farmacocinética</i> .....	17
1.3.3. <i>Posología</i> .....	17
1.3.4. <i>Reacciones adversas</i> .....	17
<b>1.4. Biodiversidad en el Ecuador</b> .....	17
1.4.1. <i>Fitoterapia</i> .....	18
<b>1.5. Familia Polypodiaceae</b> .....	20
1.5.1. <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	20
1.5.1.1. <i>Hábitat</i> .....	20
1.5.1.2. <i>Descripción Botánica</i> .....	21
1.5.1.3. <i>Usos Medicinales</i> .....	22
1.5.1.4. <i>Composición Química</i> .....	22
1.5.1.5. <i>Experimentos in vitro</i> .....	24
1.5.1.6. <i>Experimentos in vivo</i> .....	24
<b>CAPÍTULO II</b> .....	26
<b>2. MARCO METODOLÓGICO</b> .....	26
<b>2.1. Lugar de investigación</b> .....	26
<b>2.2. Materiales, equipos y reactivos para la determinación de la actividad antiinflamatoria.</b> ..	26
2.2.1. <i>Materia prima</i> .....	26
2.2.2. <i>Reactivo Biológico</i> .....	27
2.2.2.1. <i>Descripción de animales de experimentación</i> .....	27
2.2.2.2. <i>Condiciones ambientales</i> .....	28
2.2.3. <i>Equipos, materiales y reactivos</i> .....	28
<b>2.3. Métodos y Técnicas</b> .....	32



2.3.1. Comprobación Taxonómica.....	32
2.3.2. Material vegetal.....	32
2.3.3. Obtención del extracto Etanólico blando para evaluación antiinflamatoria.....	32
2.3.4. Control de Calidad del material vegetal.....	33
2.3.5. Control de Calidad del extracto Etanólico.....	33
2.3.6. Tamizaje Fitoquímico.....	34
2.4. Análisis Cromatográfico en Capa Fina (CCF).....	36
2.4.1. Análisis Cromatográfico para Flavonoides.....	36
2.4.2. Análisis Cromatográfico para Terpenos.....	37
2.5. Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresados como porcentaje de Quercetina.....	38
2.6. Cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.....	39
2.7. Capacidad captadora de radicales libres <i>in vitro</i> . Método DPPH•.....	40
2.8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria.....	41
2.8.1. Análisis estadístico.....	44
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>45</b>
<b>3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
3.1. Control de Calidad del material vegetal.....	45
3.2. Rendimiento de extracción del rizoma de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	46
3.3. Control de Calidad del extracto etanólico de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	47
3.3.1. Requisitos organolépticos de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	47
3.3.2. Parámetros físico-químicos del extracto etanólico de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	48
3.4. Tamizaje Fitoquímico.....	48
3.5. Análisis Cromatográfico en Capa Fina (CCF).....	52
3.5.1. Análisis Cromatográfico para Flavonoides.....	52
3.5.2. Análisis Cromatográfico para Terpenos.....	56
3.6. Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresados como porcentaje de Quercetina.....	58

<b>3.7. Cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC)</b> .....	59
<b>3.8. Capacidad captadora de radicales libres <i>in vitro</i>. Método DPPH</b> .....	60
<b>3.9. Evaluación de la actividad antiinflamatoria</b> .....	62
<b>3.9.1. Resultados de la administración de los extractos</b> .....	62
<b>3.9.2. Análisis estadístico</b> .....	63
<b>CONCLUSIONES</b> .....	70
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	71
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1-3</b> Porcentaje de inflamación de cada uno de los tratamientos administrados en las diferentes horas.....	64
<b>Gráfica 2-3</b> Porcentajes de inflamación de cada uno de los tratamientos a la séptima hora.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b> Proceso inflamatorio como consecuencia de una herida.....	06
<b>Figura 2-1</b> Biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos e inhibición de la COX por los AINEs.....	12
<b>Figura 3-1</b> Estructura Química del Diclofenaco.....	16
<b>Figura 4-1</b> Rizoma de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	20
<b>Figura 5-1</b> Estructura química de Selligueain de <i>Polypodium</i> .....	23
<b>Figura 1-2</b> Extracción sucesiva de metabolitos secundarios con solventes de polaridad creciente.....	34
<b>Figura 1-3</b> Cromatografía en capa fina de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	53
<b>Figura 2-3</b> Cromatografía en capa fina de <i>Eupatorium glutinosum</i> .....	55
<b>Figura 3-3</b> Cromatografía en capa fina de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1</b> Criterios diagnósticos de Respuesta Inflamatoria.....	07
<b>Tabla 2-1</b> Mediadores de la Respuesta Inflamatoria.....	08
<b>Tabla 3-1</b> Taxonomía de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	21
<b>Tabla 1-2</b> Tamizaje Fitoquímico de los diferentes extractos obtenidos.....	35
<b>Tabla 2-2</b> Modelo experimental para la evaluación de la Actividad Antiinflamatoria.....	43
<b>Tabla 1-3</b> Resultados del control de calidad del material vegetal de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	45
<b>Tabla 2-3</b> Extracto obtenido de la droga vegetal (DV) de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	46
<b>Tabla 3-3</b> Resultados de los requisitos organolépticos del extracto etanólico de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	47
<b>Tabla 4-3</b> Resultados del control de calidad de los parámetros físico-químicos del extracto etanólico de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	48
<b>Tabla 5-3</b> Resultados de Tamizaje Fitoquímico de <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	48
<b>Tabla 6-3</b> Resultados de Tamizaje Fitoquímico de <i>Eupatorium glutinosum</i> .....	51
<b>Tabla 7-3</b> Posibles compuestos fenólicos identificados mediante CCF para <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	53
<b>Tabla 8-3</b> Posibles compuestos fenólicos identificados mediante CCF para <i>Eupatorium glutinosum</i> .....	55
<b>Tabla 9-3</b> Posibles compuestos terpénicos identificados mediante CCF para <i>Campyloneurum amphostenon</i> .....	57
<b>Tabla 10-3</b> Resultados de la cuantificación de flavonoides totales.....	58
<b>Tabla 11-3</b> Resultados de la cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Cicalteau.....	59
<b>Tabla 12-3</b> Resultados de la capacidad captadora de radicales libres.....	61
<b>Tabla 13-3</b> Resultados de inflamación de los diferentes tratamientos expresados como área de inflamación en cm <sup>2</sup> .....	62

<b>Tabla 14-3</b> Resultados de la determinación de la actividad antiinflamatoria expresada en porcentaje de inflamación para cada tratamiento.....	63
<b>Tabla 15-3</b> Análisis estadístico de correlación entre el tiempo y los tratamientos.....	65

## ÍNDICE DE ANEXOS

**ANEXO A:** Identificación taxonómica de los rizomas *Campyloneurum amphostenon*

**ANEXO B:** Materia prima *Campyloneurum amphostenon*

**ANEXO C:** Maceración y Sonicación del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon*

**ANEXO D:** Concentración del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon*

**ANEXO E:** Obtención de extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon*

**ANEXO F:** Control de Calidad del material vegetal

**ANEXO G:** Screening Fitoquímico

**ANEXO H:** Cromatografía en Capa Fina de *Campyloneurum amphostenon*

**ANEXO I:** Flavonoides y terpenos presentes en *Campyloneurum amphostenon*

**ANEXO J:** Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides y fenoles totales de *Campyloneurum amphostenon*

**ANEXO K:** Preparación del reactivo de Folin- Ciocalteu

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

**ANEXO M:** Ambientación de los animales de experimentación

**ANEXO N:** Preparación de las suspensiones de *C. amphostenon* a administrar

**ANEXO O:** Administración intragástrica de las suspensiones de *C. amphostenon*

**ANEXO P:** Inducción del edema plantar con carragenina al 1%

**ANEXO Q:** Mediciones del área de la pata inflamada

**ANEXO R:** Curva de calibración para Quercetina usada en la cuantificación de flavonoides.

**ANEXO S:** Curva de calibración para Ácido Gálico usada en la cuantificación de fenoles.

**ANEXO T:** Curva de calibración para Ácido Gálico usada en la Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH\*

**ANEXO U:** Prueba post HOC: basado en la prueba de Tukey B para la primera hora

**ANEXO V:** Prueba post HOC: basado en la prueba de Tukey B para la segunda hora

**ANEXO W:** Prueba post HOC: basado en la prueba de Tukey B para la tercera hora

**ANEXO X:** Prueba post HOC: basado en la prueba de Tukey B para la séptima hora

**ANEXO Y: Volumen de dosificación de los diferentes tratamientos**



## RESUMEN

Se determinó la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon* a tres niveles de dosis. Los rizomas fueron el material de partida sobre los cuáles se realizó el control de calidad, seguidamente se preparó un extracto etanólico a partir de aquellos, que fue concentrado hasta obtener un extracto blando, este se analizó por cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente se cuantificaron los flavonoides totales por el método de quelación con Cloruro de Aluminio, fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu y actividad antioxidante *in vitro* por el método de captación de radicales libres con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. La actividad antiinflamatoria del extracto blando fue evaluada en el modelo animal *Rattus norvegicus*, mediante el método de inducción de edema plantar por carragenina, a las dosis de: 300 mg/kg, 100 mg/kg y 25 mg/kg, considerando como control positivo diclofenaco sódico 100 mg/kg. En la identificación de los grupos fitoquímicos presentes en *C. amphostenon* se identificó alcaloides, compuestos terpénicos, saponinas, fenoles, flavonoides y antocianinas. Por CCF se identificaron presumiblemente kaempferol,  $\beta$ -sitosterol y campesterol. La concentración de flavonoides y fenoles totales presentaron relación directa con la capacidad antioxidante del extracto. En la evaluación de la actividad antiinflamatoria, se destaca el grupo tratado con la dosis de 100 mg/kg de extracto, presentando un porcentaje de inflamación de  $49.04\% \pm 0.04$ ; valor ligeramente superior con respecto al grupo tratado con diclofenaco sódico que presentó un porcentaje de inflamación de  $48.89\% \pm 0.05$ . En función de los resultados se puede establecer que *C. amphostenon* presenta una actividad antiinflamatoria representativa, similar a la de diclofenaco sódico (fármaco sintético); y además, es evidente la relación proporcional de la capacidad antiinflamatoria de *C. amphostenon* y la dosis administrada de extracto. Se recomienda ampliar la investigación tomando como base otros modelos de inflamación, para elucidar los mecanismos moleculares de actuación de los componentes presentes en el extracto de *C. amphostenon* y establecer la dosis efectiva de administración.

**Palabras Clave:** <TECNOLOGÍA Y CIENCIAS MÉDICAS>, <FARMACOLOGÍA>, <FITOQUÍMICA>, <CALAGUALA (*Campyloneurum amphostenon*)>, <EXTRACTO ETANÓLICO>, <FLAVONOIDES TOTALES >, < FENOLES TOTALES >, <RATA (*Rattus norvegicus*)>, <ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA>.

## SUMMARY

The anti-inflammatory activity of the ethanol extract of *Campyloneurum amphostenon* was determined at three dose levels. The rhizomes were the starting material on which quality control was carried out, followed by preparation of an ethanol extract from them, which was concentrated to a soft extract, which was analyzed by thin layer chromatography (TLC). Total flavonoids were quantified by the method of chelation with aluminum chloride, total phenols by the Folin-Ciocalteu method and *in vitro* antioxidant activity by the free radical scavenging method with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. The anti-inflammatory activity of the soft extract was evaluated in the animal model *Rattus norvegicus*, using the method of induction of plantar edema by carrageenan, at doses of: 300 mg/kg, 100 mg/kg and 25 mg/kg, considering as a positive control diclofenac sodium 100 mg/kg. In the identification of the phytochemical groups present in *C. amphostenon*, alkaloids, terpenic compounds, saponins, phenols, flavonoids and anthocyanins were identified. Presumably kaempferol,  $\beta$ -sitosterol and campesterol were identified by TLC. The concentration of flavonoids and total phenols were directly related to the antioxidant capacity of the extract. In the evaluation of the anti-inflammatory activity, the group treated with the dose of 100 mg/kg of extract stands out, presenting a percentage of inflammation of  $49.04\% \pm 0.04$ ; a slightly higher value than the group treated with diclofenac sodium, which presented a percentage of inflammation of  $48.89\% \pm 0.05$ . Depending on the results can be established that *C. amphostenon* presents representative anti-inflammatory activity, similar to the diclofenac sodium (synthetic drug); and in addition, the proportional relation of the anti-inflammatory capacity of *C. amphostenon* and the administered dose of extract is evident. It is recommended to expand the research based on other inflammation models, to elucidate the molecular mechanisms of action of the components present in the extract of *C. amphostenon* and to establish the effective dose of administration.

**Palabras Clave:** <TECHNOLOGY AND MEDICAL SCIENCES>, <PHARMACOLOGY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <CALAGUALA (*Campyloneurum amphostenon*)>, <ETHANOLIC EXTRACT >, <TOTAL FLAVONOIDS >, <TOTAL PHENOLS>, <RAT (*Rattus norvegicus*)>, <ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY >.

## INTRODUCCIÓN

Desde hace algunos años existe una tendencia mundial en la retoma y desarrollo del uso de las plantas medicinales y terapias alternativas con fines terapéuticos en lo que se ha llamado la Revolución Verde de la Medicina. (García et al., 2002: pp.214-216) La OMS apoya el uso de estas medicinas tradicionales y alternativas siempre y cuando éstas han demostrado su utilidad para el paciente y representen un riesgo mínimo, llegando a alcanzar la fitoterapia un 80% de preferencia para la atención primaria de salud por parte de los pacientes. (OMS, 2004, <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>)

Durante varios años de investigación se ha demostrado que diversas plantas poseen distintas actividades medicinales tales como: antifúngicas, antimicrobianas, fotoprotectoras, entre otras. Si una planta ha sido utilizada tradicionalmente para tratar la tos, bronquitis, reumas o úlceras de la piel, puede ser un indicativo de que esta planta tenga propiedades antiinflamatorias y la misma debe ser analizada para corroborar los saberes ancestrales de los pueblos andinos.

La inflamación es una de las manifestaciones más comunes de muchas enfermedades que afligen a millones de personas en el mundo, implica una compleja matriz de activación enzimática, liberación mediadora y extravasaciones de fluido, migración celular, descomposición y reparación de tejidos. (Ramkumar et al., 2012: pp. 947-952) Para mitigar esta manifestación los fármacos de elección son los AINEs, por sus acciones farmacológicas son los agentes más vendidos a nivel mundial, se estima que en EE.UU se prescribe al menos 216 millones de dosis al día, con una media de consumo de 100 comprimidos de aspirina por persona. (Rodríguez y Valdés, 2014: pp. 4-8) Anualmente cerca de 70 millones de prescripciones se realizan en los Estados Unidos, 20 millones en el Reino Unido y 25 millones en España, (Salazar et al., 2009:pp. 47-50) lo que redondea un costo superior a los 1.000 millones de dólares por año, llegando a la totalidad de las ventas mundiales próximas a los 6.000 millones de dólares desde 1995 hasta la fecha. (Rodríguez y Valdés, 2014: pp. 4-8) Estas cifras son subestimadas, ya que están basadas en datos de prescripciones dispensadas, que no encierran a los AINEs de venta libre y de uso común, como son la aspirina, ibuprofeno y naproxeno, (Salazar et al., 2009:pp. 47-50) ya que más de 30.000 millones de tabletas de venta libre son comercializadas anualmente. (Rodríguez y Valdés, 2014: pp. 4-8)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) han sido el fármaco de elección para tratar inflamaciones, ya que estos inhiben la enzima ciclooxigenasa (COX) facilitando el paso de ácido araquidónico a endoperóxido PGG<sub>2</sub>, disminuyendo la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, como resultado de esta acción se tiene la reducción de la concentración tisular de compuestos capaces de sensibilizar o activar los nociceptores periféricos. Algunos AINEs también han mostrado capacidad para inhibir a la enzima lipooxigenasa, con un papel importante en el metabolismo del ácido araquidónico, que pasa a la síntesis de hidroxiácidos y leucotrienos (factores quimiotácticos) contribuyendo al dolor y a la inflamación, entre ellos sobresalen el diclofenaco y la indometacina. (Ortiz et al., 2007: pp.148-149)

Sin embargo, el consumo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) es la segunda causa más frecuente de úlcera péptica, y representa un riesgo significativo para el desarrollo de complicaciones gastrointestinales, mismas que constituyen un problema sanitario de primer orden, si se tiene en cuenta que más de 30 millones de personas en el mundo consumen estos fármacos diariamente, a pesar de que los eventos gastrointestinales graves no son comunes, continúan siendo un problema de salud pública debido al gran número de pacientes que consumen estos medicamentos. (Salazar, 2009:pp. 47-50) Recientemente hay una gran prevalencia de enfermedades inflamatorias debido a la automedicación de los pacientes, por lo que se hace necesario introducir una terapia que sea más eficaz y fiable. A pesar de los progresos realizados en la investigación médica durante las últimas décadas, el tratamiento de muchas enfermedades graves sigue siendo problemático. Las enfermedades inflamatorias siguen siendo uno de los principales problemas de salud del mundo. (Ramkumar et al., 2012: pp. 947-952)

Desde hace muchos siglos, las drogas de origen vegetal han sido un pilar fundamental para el tratamiento de enfermedades y dolencias humanas, debido a los problemas suscitados con los fármacos de síntesis y la gran acogida de la fitoterapia en los últimos años, el farmacéutico ha optado por brindarle al paciente medicamentos naturales, ofreciendo productos de alta calidad y con efectos secundarios mínimos sobre la salud del mismo. Es así que se optó por estudiar los compuestos presentes en *Campyloneurum amphostenon* conocido como calaguala que según la medicina tradicional de Perú y Honduras ha sido utilizado ampliamente por sus propiedades curativas, tales como: antiinflamatorio natural, remedio efectivo para tratar trastornos del sistema respiratorio como tos, bronquitis, asma y gripe. (Soltieva, 2015, p. 02) Por otra parte, los campesinos ecuatorianos han utilizado *C. amphostenon* por su acción antirreumática, antisifilítica y sudorífica. Se la emplea por vía tópica para lesiones contusas, úlceras de la piel, psoriasis y eczemas. (Casapía, 2011, <http://www.casapia.com/Paginacast/Paginas/MenudeInformaciones/PlantasMedicinales/Calaguala.htm>)

Se han realizado estudios para verificar la actividad biológica antiinflamatoria de varias especies emparentadas con *C. amphostenon*, pertenecientes a la familia *Polypodiaceae*. Manna y colaboradores realizaron estudios acerca de los efectos inhibitorios del extracto metanólico de *Polypodium leucotomos* sobre la activación de NF-kB (factor de necrosis tumoral) inducida por agentes inflamatorios (forbol y lipopolisacárido) demostrando que bloquea la activación de NF-kB por la inhibición de la fosforilación y degradación del mismo, lo que a su vez proporciona a la molécula la capacidad de suprimir la inflamación y la tumorigénesis, como estudio complementario realizaron la elucidación estructural mediante resonancia magnética nuclear (RMN), el cual reveló que *P. leucotomos* contiene un glucósido (kaempferol-3-O- $\beta$ -xylopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-arabinopiranosido), dos glucósidos flavonoides: rutina y kaempferol 3-O- $\alpha$ -p-arabinopiranosido y el ácido cumárico. (Manna et al., 2003a: pp.171-180)

Subarnas y colaboradores aislaron la proantocianidina sellegueain A, a partir del helecho *Polypodium feei* mediante diferentes técnicas cromatográficas, la cual al realizar un estudio de la actividad antiinflamatoria y analgésica usando carragenina y ácido acético respectivamente, se determinó que posee actividad analgésica y antiinflamatoria gracias a la inhibición selectiva que ejerce este compuesto en la síntesis de prostaglandinas. (Subarnas et al., 2000b: pp. 401-405)

Mientras que Zattra y colaboradores realizaron un estudio *in vivo*, en el cual demostraron que el extracto de *P. leucotomos* inhibe la COX-2 inducida por radiación ultravioleta, mediante la exposición prolongada a la luz UV en ratones, obteniendo como resultado de este ensayo que el extracto puro de *P. leucotomos* activa el gen p53 y reduce la inflamación aguda por inhibición selectiva de la Cox-2. (Zattra et al., 2009: pp. 1952-1961)

Por lo mencionado anteriormente, es relevante el hecho de que especies de la familia *Polypodiaceae* han sido asociadas con diversas actividades biológicas, entre ellas destacable su potencial antiinflamatorio, y en este sentido la investigación se torna de interés, no solo en el ámbito científico sino de rescate y revalorización del conocimiento ancestral sobre el uso de plantas nativas del Ecuador.

El objetivo de esta investigación es determinar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon* mediante inhibición de edema plantar inducido por carragenina en ratas (*Rattus norvegicus*). Para lo cual se sigue un protocolo establecido, procediendo en primer lugar a obtener el extracto etanólico de *C. amphostenon* a partir de su rizoma, seguidamente se evalúa la calidad de la materia prima y del extracto etanólico. Luego se identifican los metabolitos secundarios de tipo flavónico y terpénico provenientes de las drogas

vegetales mediante cromatografía en capa fina (CCF). Posteriormente se cuantifica el contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de *C. amphostenon* mediante técnicas espectrofotométricas y finalmente se evalúa la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *C. amphostenon*, a tres niveles de dosis, mediante edema plantar inducido por carragenina, sobre el modelo animal que es la rata de laboratorio *Rattus norvegicus*.

# CAPÍTULO I

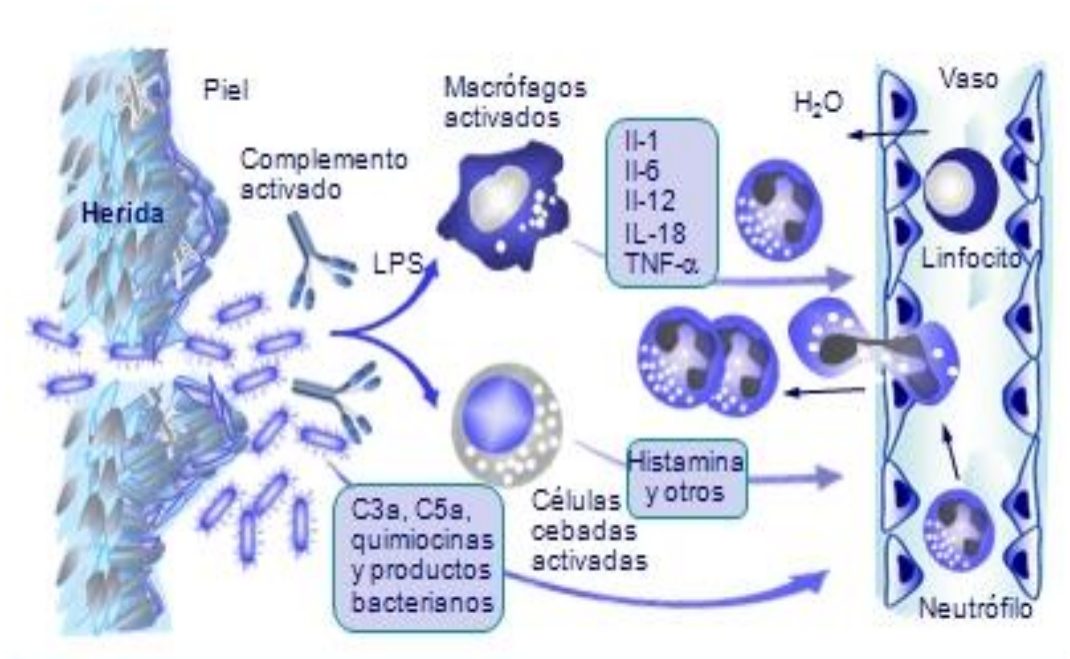
## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Inflamación

#### *1.1.1. Definición*

Es la respuesta fisiológica del organismo al daño físico que provoca reacciones humorales, vasculares y celulares en el sitio de la lesión, la inflamación desencadena complejos acontecimientos que curan y reconstruyen el tejido dañado siendo un proceso inmediato y continuo. (Montero et al., 20001: p.79)

Se define a la inflamación como una respuesta propia del sistema inmunológico hacia el daño causado a sus tejidos o células vascularizadas por bacterias o cualquier otro agente de naturaleza física, química, biológica o mecánica. A pesar de ser una reacción dolorosa, la inflamación es una respuesta reparadora, misma que implica un gasto de energía metabólica considerable, (García, 2008, p. 91) por esta razón cabe destacar que la inflamación no es una enfermedad, sino una respuesta inespecífica que da como resultado un efecto favorable y saludable en el organismo. (León et al., 2015a: p.48)



**Figura 1-1** Proceso inflamatorio como consecuencia de una herida.

Fuente: (Peña, 2014)

### ***1.1.2. Respuesta Inflamatoria***

La respuesta inflamatoria está relacionada con el proceso de reparación de células o tejidos dañados, es de gran utilidad para atenuar, destruir o localizar el agente inflamatorio iniciando rápidamente una serie de eventos que determinan la cura o reconstrucción de la célula o tejido lesionado. De no existir esta respuesta inflamatoria las infecciones se propagarían incontroladamente, las heridas no curarían y los órganos que sufran lesiones presentarían supuraciones permanentes; es por esta razón que la inflamación es considerada una respuesta de carácter protector y no una enfermedad. (León et al., 2015b: p.48)

El proceso inflamatorio expone al cuerpo a niveles prolongados de especies reactivas de oxígeno (ROS), dando lugar a la acumulación de daño oxidativo en los tejidos. Una clase de receptores ligados a la regulación de la inflamación y la angiogénesis son los receptores activados por peroxisoma proliferador (PPAR) mismos que regulan la expresión de muchos genes, incluyendo la COX-2, la óxido nítrico sintasa y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), entre otros, además estimula el crecimiento y el desarrollo de las células tumorales. La inflamación también expone al cuerpo a niveles prolongados de ROS, causando una acumulación de daño oxidativo en los tejidos. Los compuestos pro-oxidantes son parte de la respuesta inmune contra los patógenos. (Gomes et al., 2013: pp. 1-9)



La respuesta inflamatoria conforma un mecanismo de defensa inespecífico que puede ser evaluada gracias a los siguientes criterios:

**Tabla 1-1:** Criterios diagnósticos de Respuesta Inflamatoria

<b>Criterio</b>	<b>Valores</b>
Frecuencia Cardíaca	Más de 90 latidos por minuto
Frecuencia Respiratoria	Más de 20 respiraciones por minuto
Temperatura	Más de 38 grados o menos de 36 grados
Leucocitos	Leucocitosis de más de 12,000/mm <sup>3</sup> o leucopenia menor de 4,000/mm <sup>3</sup> , o bien más de 10% de bandas

**Fuente:** (Duarte et al., 2009, p. 226)

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

### ***1.1.3. Signos Clínicos de la Inflamación***

Celsus (escritor romano del siglo I d.c.) fue el primero en definir los cuatro signos principales de la inflamación, a lo que Virchow agregó el quinto signo clínico, por lo que actualmente se conocen cinco signos principales para detectar la inflamación:

- Rubor: coloración roja por el aumento del flujo sanguíneo
- Tumor: hinchazón, debido al aumento del líquido intersticial.
- Calor: se produce por un aumento del flujo sanguíneo y por constricción de las vénulas en el área de lesión.
- Dolor: se debe a la liberación de sustancias que activan los receptores, ejemplo: las prostaglandinas.
- Impotencia funcional: es una respuesta sistémica del organismo estrechamente relacionada con el estrés, de intensidad variable. (Peña, 2014)

#### 1.1.4. Mediadores de la inflamación

La inflamación estará bajo el control de los mediadores que liberen las células que intervienen en la respuesta inflamatoria, estos mediadores son los siguientes:

**Tabla 2-1:** Mediadores de la Respuesta Inflamatoria

<b>Mediador</b>	<b>Acción</b>
Histamina y serotonina (aminas vasoactivas)	Incremento de la permeabilidad
Bradicinina	Incremento de la permeabilidad y dolor
C3a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad opsonina
C5a (producto del complemento, anafilotoxinas)	Incremento de la permeabilidad, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Prostaglandinas (metabolitos del ácido araquidónico)	Vasodilatación, fiebre, activa a otros mediadores
Leucotrieno B <sub>4</sub> (metabolitos del ácido araquidónico)	Quimiotaxis, adhesión y activación leucocitaria
Leucotrieno C <sub>4</sub> , D <sub>4</sub> , E <sub>4</sub> (metabolitos del ácido araquidónico)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, vasoconstricción
Metabolitos del oxígeno (radicales libres)	Incremento de la permeabilidad, lesión endotelial y tisular
Factor activador de plaquetas (PAF)	Incremento de la permeabilidad, broncoconstricción, cebado de leucocitos
Interleucina-1 (IL-1) y Factor de necrosis tumoral (TNF) (citocinas)	Reacciones de fase aguda, activación endotelial, Quimiotaxis
Óxido Nítrico	Incremento de la permeabilidad, vasodilatación, citotoxicidad

**Fuente:**(León et al., 2015c: p.49)

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

### ***1.1.5. Tipos de inflamación***

Los dos tipos de inflamación son: aguda y crónica. La inflamación aguda presenta una evolución breve con características propias como exudación de proteínas plasmáticas y líquido, acompañado de la migración de leucocitos. La inflamación crónica es de larga duración, caracterizándose por la proliferación de vasos sanguíneos y necrosis tisular. (León et al., 2015b: p.48)

#### ***1.1.5.1. Inflamación Aguda***

Esta inflamación es de origen infeccioso, con una evolución breve y consta de tres fases:

1. Fase inmediata o nerviosa: generalmente esta fase produce dolor patológico debido al aumento de la sensibilidad del sistema nervioso causada por el acúmulo de sustancias que posteriormente producirá necrosis. En esta etapa se origina primeramente vasoconstricción, muy seguida de vasodilatación causando calor y enrojecimiento debido al aumento del flujo sanguíneo.
2. Fase intermedia o inmune: una vez producida la vasodilatación el siguiente paso es el aumento de la permeabilidad vascular, este es el que origina el edema y a su vez el paso de leucocitos hacia el foco de infección.
3. Fase tardía o endócrina: si la evolución es favorable el tejido lesionado recupera la normalidad morfológica y funcional generalmente por cicatrización. (Arias et al., 1999a: pp. 287-295)

#### ***1.1.5.2. Inflamación Crónica***

Este tipo de inflamación suele iniciar aun cuando no exista lesión alguna y no termina cuando debería terminar. (Instituto Nacional del Cáncer, 2015) La inflamación crónica es el resultado del aumento de la respuesta inflamatoria debido al fracaso de la resolución de la infección, es de larga duración en la que se produce simultáneamente destrucción e infiltración tisular por parte

de las células inflamatorias y la curación. Cuando la inflamación es causada por la resistencia de un microorganismo las células que impregnan el tejido serán los linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, en tanto si la inflamación es inducida por un autoantígeno se producirá la infiltración prolongada de linfocitos T. (Arias et al., 1999b: pp. 297)

La inflamación crónica puede causar a largo plazo daños en el ADN y progresivamente causar cáncer, es así que si una persona sufre de enfermedades inflamatorias crónicas del intestino como por ejemplo la enfermedad de Crohn ésta tendrá un mayor riesgo de desarrollar cáncer de colon. (Instituto Nacional del Cáncer, 2015)

### ***1.1.6. Fases de la Inflamación***

Se ha dividido a la inflamación en cinco etapas:

1. Liberación de mediadores: son moléculas de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por mastocitos gracias a la acción de estímulos determinados.
2. Efecto de los mediadores: al ser liberados, los mediadores provocan cambios vasculares y efectos quimiotácticos, mismos que favorecen la llegada de células inmunes y moléculas al foco infeccioso.
3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco infeccioso: la mayoría procedente de la sangre y en menor cantidad aquellas que son cercanas al foco.
4. Regulación del proceso inflamatorio: al igual que la mayoría de las respuestas inflamatorias, la inflamación integra un conjunto de mecanismos inhibidores que finalizan o equilibran el proceso.
5. Reparación: en esta fase van a participar distintas clases de fenómenos que van a establecer la reparación parcial o total de los tejidos dañados por agentes agresores o por la misma respuesta antiinflamatoria. (González et al., 2010)

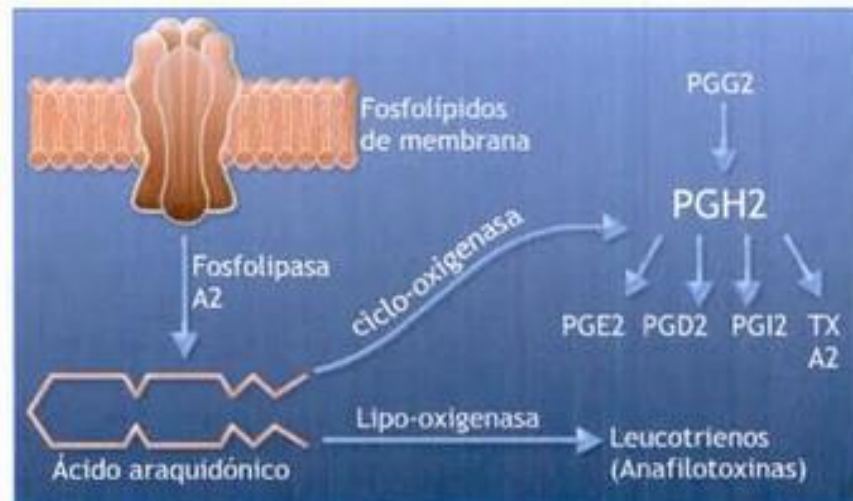
## ***1.2. Antiinflamatorios***

### ***1.2.1. Definición***

Son sustancias capaces de aliviar o mitigar las manifestaciones de alarma propiciadas por el organismo frente a manifestaciones de dolor, fiebre o tumoración que en conjunto conforman la inflamación. Gracias al avance de la ciencia se ha podido desarrollar fármacos específicos y selectivos para atenuar este tipo de manifestaciones de la inflamación, entre los cuales se destacan dos grupos importantes: los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y los antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides. (Mendoza, 2008a: pp. 290-291)

### ***1.2.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)***

Son un grupo de fármacos pertenecientes a diferentes clases químicas como por ejemplo: derivados del ácido salicílico, del indol, del p-aminofenol entre otros, y recientemente se han sintetizado los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 como los coxibs. Sin embargo, este tipo de fármacos tienen en común el ser ácidos orgánicos débiles, presentando un pKa de 3 a 5 además de inhibir selectivamente a la ciclooxigenasa (COX), sintetasa de tromboxanos o sintetasa de prostaglandinas lo cual permite apreciar su utilidad terapéutica tanto como analgésicos, antiinflamatorios o antipiréticos. (Mendoza, 2008b: pp. 291)



**Figura 2-1** Biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos e inhibición de la COX por los AINEs.

**Fuente:** (Mendoza, 2008c: pp. 291)

#### 1.2.2.1. Mecanismo de acción

Los AINEs actúan inhibiendo la producción de prostaglandinas, esto se logra a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa la cual facilita la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas. Al ser liberados los fármacos antiinflamatorios no esteroideos en los tejidos lesionados desaparecen los distintos efectos producidos por la inflamación como dolor, fiebre y tumefacción, esto se debe principalmente a la reducción de la síntesis de prostaglandinas y a la activación de la acción antiinflamatoria sobre las fibras sensitivas por parte de los AINEs. (De Ahumada et al., 2002a: p. 136)

### *1.2.2.2. Reacciones adversas más frecuentes*

Los efectos indeseables que representan los AINEs dependen en gran medida del fármaco que se esté utilizando, sin embargo existen dos riesgos representativos por causa de la medicación de estos fármacos:

- **Riesgo Cardiovascular:** este tipo de medicamentos pueden representar un alto grado de riesgo de fenómenos trombóticos cardiovasculares, de ictus y de infarto de miocardio que pueden ser mortales. Este riesgo va aumentando con relación a la duración del tratamiento teniendo un mayor riesgo aquellos pacientes que sufran de enfermedades cardiovasculares.
- **Riesgo gastrointestinal:** la inflamación, úlceras, perforación gástrica e intestinal, hasta hemorragias son algunos de los riesgos más representativos que se presentan al ingerir AINEs, estas manifestaciones clínicas pueden aparecer en cualquier momento del tratamiento y sin síntomas de alerta. Los adultos mayores son aquellos que presentan un riesgo elevado de sufrir efectos graves gastrointestinales. (Lorenzo et al., 2008a: p. 518)

### *1.2.2.3. Uso Clínico*

- Los AINEs se utilizan para afecciones leves o moderadas tales como: cefalea, odontalgia, mialgia. En los últimos años se ha desarrollado preparados farmacéuticos combinando un analgésico opiáceo con un antiinflamatorio, un ejemplo de esta mezcla es la codeína. En los dolores menstruales no es aconsejable el uso de la aspirina ya que por su actividad antiagregante plaquetaria puede aumentar o prolongar la hemorragia.
- Se utiliza también en procesos de tipo reumático como la artritis reumatoide.
- Para el tratamiento de cuadros febriles, sin importar su etiología.
- Gracias a su acción de antiagregante plaquetaria se utiliza la aspirina como profilaxis cardiovascular, siempre y cuando se lo administre a dosis bajas. (De Ahumada et al., 2002b: p. 137)

#### *1.2.2.4. Medicamentos representativos*

Los principales AINEs que se conocen en el mercado son:

- Derivados del Salicilato: Ácido Acetilsalicílico
- Derivados del p-aminofenol: Acetaminofén
- Derivados del Indol y Ácido Indenacético: Indometacina
- Derivados del Ácido Arilpropiónico: Naproxeno, Ibuprofeno
- Derivados del ácido enólico: Peroxicam, Meloxicam

#### *1.2.3. Antiinflamatorios esteroideos*

También conocidos como glucocorticoides, son hormonas producidas por las glándulas suprarrenales. Estos fármacos tienen un rol importante en la acción antiinflamatoria debido a que inhiben la producción de varios factores celulares como las citocinas o reactantes de la fase aguda los cuales son críticos en la generación de la inflamación, dando como resultado la disminución de la liberación de factores quimiotácticos y vasoactivos. (Betés et al., 2008a: p. 130)



#### *1.2.3.1. Mecanismo de acción*

Estos fármacos actúan atravesando la membrana citoplasmática e interactuando con receptores específicos que se encuentran en el citoplasma de las células de los tejidos diana. La clave para que estos fármacos sean potentes antiinflamatorios radica en la inducción de la expresión de la macrocortina o lipocortina que es una proteína que inhibe la fosfolipasa A<sub>2</sub> interfiriendo con la producción de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos (sustancias proinflamatorias), de esta manera se disminuye su síntesis y su liberación. (Betés et al., 2008b: p. 130)

#### *1.2.3.2. Reacciones adversas*

Debido a la acción de estos medicamentos sobre varios tejidos del cuerpo humano, se presentan efectos adversos a diferentes niveles, como por ejemplo:

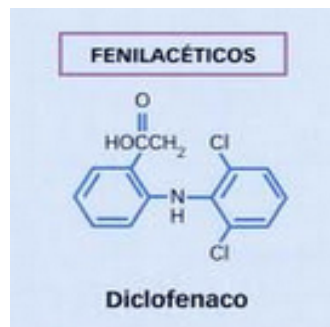
- Gastrointestinales: úlcera péptica
- Músculo esquelético: osteoporosis, miopatía
- Cardiovasculares: hipertensión
- Metabólicos: diabetes
- Renales: Insuficiencia Renal Crónica, nefritis aguda
- Psiquiátricos: fármaco dependencia, ansiedad. (Betés et al., 2008c: p. 131)

#### *1.2.3.3. Medicamentos representativos*

El antiinflamatorio esteroideo mas reconocido es la prednisona.

### 1.3. Diclofenaco sódico

El diclofenaco es un AINE perteneciente a la familia de los derivados del ácido fenilacético, con una potencia parecida a la de los derivados de ácidos propiónicos. Además de ser antiinflamatorio es uricosúrico y posee una actividad selectiva para inhibir la COX-2. (Lorenzo et al., 2008b: p.527)



**Figura 3-1** Estructura Química del Diclofenaco

**Fuente:** (Lorenzo et al., 2008, p. 527)

#### *1.3.1. Mecanismo de acción*

El principal mecanismo de acción es la inhibición selectiva de la COX-2, y en menor grado inhibir la síntesis de las prostaglandinas las mismas que contribuyen en el desarrollo de la inflamación, dolor y fiebre. (Lorenzo et al., 2008c: p.527)

### ***1.3.2. Farmacocinética***

Tras su administración se acumulará en el líquido sinovial, luego se metabolizará en el hígado gracias a la acción de la enzima CYP2C. Se elimina por la orina en un 65% y por la bilis en un 35% tras sufrir glucoronidación y sulfación. (Lorenzo et al., 2008d: p.527)

### ***1.3.3. Posología***

- Antiinflamatorio: para el tratamiento de artritis y artrosis se administra en dosis de 100-200 mg/día dos veces al día o cuatro veces al día dependiendo de la afección.
- Analgésico: 50mg cada ocho horas en procesos postoperatorios, para cólicos renales se administra 75mg por vía intramuscular. (Lorenzo et al., 2008e: p.527)

### ***1.3.4. Reacciones adversas***

Los efectos gastrointestinales son los más frecuentes, cifrando un 20% y hasta un 2% se ven obligados a abandonar el tratamiento. Además se ha reportado que se produce un ligero aumento de transaminasas hepáticas en el 15% de los pacientes siendo éstas reversibles. (Lorenzo et al., 2008f: p.527)

## **1.4. Biodiversidad en el Ecuador**

La flora del Ecuador es reconocida desde hace tiempo gracias a varias publicaciones, pero no es hasta que Jergensen y colaboradores publican en el año 1999 el *Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador* donde se da a conocer la gran diversidad de la flora presente en nuestro país, reportando más de 16 000 especies, número que ha ido incrementándose apreciablemente gracias a varias investigaciones. (De la Torre et al., 2008a:p.1)

Ecuador ha sido reconocido últimamente por su riqueza en flora, especialmente porque un gran número de las plantas reportadas han sido registradas como plantas útiles (5172), de estas

aproximadamente un 60% son utilizadas con fines medicinales, el 55% se utiliza como fuente para la construcción, el 30% son comestibles y un 20% son utilizadas para fines sociales. (De la Torre et al., 2008b:p.2)

La economía del país depende en gran medida de la naturaleza debido a que es proveedora de recursos importantes para el desarrollo y bienestar social, Ecuador ha ocupado el 17<sup>avo</sup> puesto en relación a los países megadiversos del mundo por lo que es vital saber aprovechar este recurso natural de manera adecuada mediante su conservación y uso sustentable, es así que en el Programa de Gobierno de la República del Ecuador específicamente en el apartado *Revolución Ecológica* se propone como prioridad la conservación y el uso sostenible del patrimonio natural y los recursos naturales. (SENPLADES, 2009a)

Como se mencionó anteriormente Ecuador es un país megadiverso, por lo que se puede utilizar esta cualidad para transformar la matriz productiva, suponiendo una interacción con lo científico-técnico y así produciendo cambios estructurales que encaminen las formas tradicionales de producción, diversificando la matriz productiva en nuevos sectores como el de la Fitoterapia y poniendo énfasis en la conformación de nuevas industrias con alta productividad, sostenibles y diversos, y por ende de inclusión económica. (SENPLADES, 2009b)

#### ***1.4.1. Fitoterapia***

La Fitoterapia es una ciencia que estudia el uso de productos de origen vegetal que serán utilizados con fines terapéuticos, gracias al avance científico este conocimiento se dejó de lado, sin embargo debido a la gran incidencia de efectos adversos de medicamentos de síntesis, desarrollo de nuevos métodos analíticos para el control de calidad y el desarrollo de nuevas formas de preparación y administración de fitomedicamentos se ha logrado que la Fitoterapia surja nuevamente, por ejemplo, en Alemania el uso de fitomedicamentos tuvo un aumento apreciable entre 1970 y 1997 del 4% y un 92% dependiendo de las patologías. (Cañigueral et al., 2003, pp. 265-276)

En el Plan Nacional del Buen Vivir, el objetivo 3 establece que el derecho a una vida digna incluye la salud, una buena alimentación y un ambiente sano, por lo que al introducirnos en la Fitoterapia se incluye una buena salud al alcance de todo ciudadano garantizando condiciones de salud óptimas y a la vez conservando la naturaleza intangible cumpliendo a la vez el objetivo 7 de conservación del patrimonio natural. (SENPLADES, 2009c)

En nuestro país la Fitoterapia aún no ha tenido un auge tangible por lo que varias instituciones públicas y privadas realizan estudios clínicos y pre-clínicos para demostrar su eficacia frente a diversas patologías, a lo que los pacientes han ido mostrando una excelente aceptación, acercando de esta manera a la Fitoterapia a la atención primaria de salud. (Vanaclocha et al., 200, pp. 1-5)

Como ejemplo se menciona el estudio de la actividad antiinflamatoria y antioxidante de plantas usadas en la medicina tradicional ecuatoriana, mismo que se realizó en la Universidad Central del Ecuador en convenio con la Universidad Complutense de Madrid (España), Heras y colaboradores evaluaron los extractos etanólicos de 15 especies de plantas, representando a ocho familias diferentes, utilizados en la medicina tradicional de Ecuador para actividades antiinflamatorias y antioxidantes. Los extractos de *Conyza floribunda*, *Eupatorium articulatum*, *Eupatorium glutinosum*, *Bonafousia longituba*, *Bonafousia sananho*, *Tagetes pusilla* y *Piper lenticellosum* mostraron una actividad antiinflamatoria significativa in vivo en el modelo de edema plantar inducido por carragenina en ratones. Los extractos también se ensayaron in vitro por su capacidad para inhibir la peroxidación de lípidos y para eliminar radicales superóxido e hidroxilo. El extracto de *E. articulatum* posee ambas actividades. Los extractos de *Baccharis trinervis*, *E. articulatum* y *Phytolacca rividoides* fueron activos como antioxidantes. (Heras et al, 1998: pp. 161-166)

Se observó que dos especies del género *Eupatorium* presentaron actividad antiinflamatoria considerable, este género se ha utilizado por sus propiedades medicinales durante muchas décadas. Se han descrito varios productos naturales bioactivos en los extractos de spp. y el género parece ser una fuente biológica prometedora para el plomo de nuevos fármacos y productos de valor agregado. *Eupatorium glutinosum*, nombre vernáculo 'Matico Serrano' se ha utilizado durante mucho tiempo en la medicina tradicional. Es un semi arbusto que crece a una altitud de unos 3000 m en Ecuador y Perú. Una decocción de hojas y ramas de la planta se ha utilizado como astringente, antirreumático, antimicrobiano, y para curar úlcera estomacal, diarrea y cefalea, también se ha documentado que las hojas son utilizadas como emplastos para tratar pequeñas heridas, picaduras de insectos e inflamaciones de la piel. (Seedi et al., 2002: pp. 293-296) La separación cromatográfica del extracto hexanólico obtenido a partir de las hojas de *Eupatorium glutinosum* dio como resultado la identificación de Triterpenos dammaradienyl acetato,  $\alpha$  amirenona y unos pocos diterpenos labdanes en curso de investigación, posiblemente éstos compuestos son aquellos que le otorgan la actividad terapéutica. (Vidari et al., 1997: pp. 233)

## 1.5. Familia *Polypodiaceae*

Con cerca de 1500 especies, las cosmopolitas *Polypodiaceae* se encuentran entre las más grandes familias de helechos. La mayoría de las especies son epífitas y representan la cuarta Familia de plantas vasculares epifíticas. La prominencia de la familia fue durante una radiación cenozoica en la que los helechos leptosporangiados se diversificaron en diversos nichos y en distintos bosques dominados por angiospermas, la familia incluye una amplia variedad de géneros que incluyen: *Grammitis* (400), *Polypodium* (150), *Pleopeltis* (50), *Campyloneurum* (50). (Sundue et al., 2014: pp. 4-7)

### 1.5.1. *Campyloneurum amphostenon*



**Figura 4-1** Rizoma de *Campyloneurum amphostenon*.

**Elaborado por:** (Nancy Vargas, 2017)

*Campyloneurum amphostenon* pertenece a la familia *Polipodyaceae*, es epífita por excelencia, constituido por un rizoma rastrero delgado que tiene un sabor dulce-agrio, sin olor que mide de tres a cinco mm de diámetro, constituido por filopodios separados unos de otros a más de 5 mm., se caracteriza por las escamas del rizoma dispersas, de base codiforme mayor de 1.5 mm de ancho y por las hojas que están constituidas principalmente con menos de 5 aréolas entre la costa y el margen. Esta especie es de amplia distribución, principalmente se extiende desde el sur de México hasta el Perú. (León, 2016a)

#### 1.5.1.1. Hábitat

Este helecho crece en áreas montañosas, hallándose el centro de diversificación en la región andina. Crecen en lugares protegidos del sol preferentemente en bosques húmedos, medrando la corteza de los árboles y ramas de otros vegetales o en rocas, sobre un suelo rico en humus, distribuyéndose desde Costa Rica, Panamá, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia. (León, 2016b)

#### 1.5.1.2. Descripción Botánica

**Tabla 3-1:** Taxonomía de *Campyloneurum amphostenon*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Pteridophyta
<b>Clase</b>	Polypodiopsida
<b>Orden</b>	Polypodiales
<b>Familia</b>	Polypodiaceae
<b>Género</b>	Campyloneurum
<b>Epíteto específico</b>	amphostenon
<b>Autor</b>	(Kunze ex Klotzsch) Fée

**Fuente:** (Universidad Nacional de Colombia, 2016)

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

### 1.5.1.3. Usos Medicinales

En Honduras los helechos de la familia *Polypodiaceae* han sido utilizados tradicionalmente con fines medicinales tales como: úlcera péptica, problemas renales entre otras afecciones de dolor articular. (Liu et al., 1998a: pp. 187-194)

Los indígenas nativos de Honduras han venido utilizando los rizomas de Calaguala, específicamente la especie *Polypodium leucotomos* en infusiones para el tratamiento de tumoraciones malignas (Horvath et al., 1967a: pp. 1256-1258), enfermedades que afectan la piel como la psoriasis y dermatitis atópica (Portillo et al., 1985, pp. 10-16).

En indonesia el rizoma del helecho *Polypodium feei* se ha utilizado tradicionalmente para el tratamiento de la hipertensión y reumatismo. (Subarnas et al., 2000a: pp. 401-405)

### 1.5.1.4. Composición Química

Los estudios para identificar los compuestos químicos se ha realizado en algunas de las especies de la familia *Polypodiaceae*, pero éstos aún son incompletos.

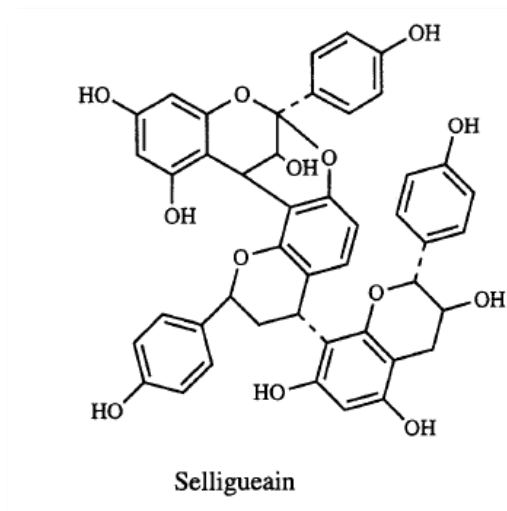
Manna y colaboradores realizaron una elucidación estructural por Resonancia Magnética Nuclear en el extracto metanólico de *Polypodium leucotomos* el cual reveló que la calagualina (principio activo de la calaguala) contiene:

- Un glucósido: (kaempferol-O-b-xylopyranosyl-(1-2)-b-D-arabinopyranoside),
- Dos flavonoides glucosídicos: rutina y kaemferol3-O-a-p-arabinopyranoside
- La fracción de proantocianida selligueain
- Y el ácido cumarínico. (Manna et al., 2003c: pp. 171-180)



Liu y colaboradores identificaron por medio de la técnica de HPLC compuestos del *P. decumanum*:

- Ácidos Grasos Poliinsaturados: ácido linoléico, linolénico y araquidónico.
- Triterpenos
- La fracción de selligueain. (Liu et al., 1998b: pp. 187-194)



**Figura 5-1** Estructura química de Selligueain de *Polypodium*

**Fuente:** (Liu et al., 1998, p. 189)

Yao y colaboradores realizaron una investigación fitoquímica de un helecho nativo de China (*Polypodium hastatum*), se aislaron tres glucósidos flavonoides, un esteroide y una cumarina sobre la base de análisis espectroscópico incluyendo UV, MS, y NMR, y propiedades químicas y físicas:

- $\beta$  – sitosterol
- Cumarina
- Juglanina
- kaempferol-7-O- $\alpha$  -L-rhamnopyranoside
- (+)-afzelechin-5-O-  $\beta$  -D-apiofuranoside (nuevo glicósido flavonoide). (Yao et al., 2012: pp. 275-278)

#### 1.5.1.5. Experimentos *in vitro*

Para los estudios químicos se han preparado dos tipos de extractos de este rizoma: una fracción que es hidrosoluble y otra fracción liposoluble, a la mezcla de estas dos fracciones Horvath lo denominó calagualina y a su vez le dio el nombre de principio activo de este tipo de helechos siendo ésta una saponina formada por un cetosteroide y una desoxihexosa. (Horvath et al., 1967b: pp. 1256-1258)

Estudios acerca de los efectos inhibitorios del extracto metanólico de *Polypodium leucotomos* sobre la activación de NF- $\kappa$ B (factor de necrosis tumoral) inducida por agentes inflamatorios (forbol y lipopolisacárido) han demostrado que bloquea la activación de NF- $\kappa$ B por la inhibición de la fosforilación y degradación del mismo, lo que a su vez proporciona a la molécula la capacidad de suprimir la inflamación y la tumorigénesis. (Manna et al., 2003b: pp. 171-180)

#### 1.5.1.6. Experimentos *in vivo*

Se han realizado experimentos *in vivo* que han demostrado la eficacia de especies de la familia *Polypodiaceae* como antiinflamatorio, entre las más importantes tenemos a las siguientes:

En Indonesia se aisló la proantocianidina sellegueain A, a partir del helecho *Polypodium feei* mediante diferentes técnicas cromatográficas, la cual al realizar un estudio de la actividad antiinflamatoria y analgésica usando carragenina y ácido acético respectivamente, se determinó que posee actividad analgésica y antiinflamatoria gracias a la inhibición selectiva que ejerce este compuesto en la síntesis de prostaglandinas, concretamente la fracción de la proantocianidina ejerce un efecto inhibitorio en la ciclooxigenasa y de este modo inhibe a la vez la progresión de la inflamación y calma el dolor producido por la misma. (Subarnas et al., 2000b: pp. 401-405)

Zattra y colaboradores realizaron un estudio *in vivo*, en el cual demostraron que el extracto de *P. leucotomos* inhibe la COX-2 inducida por radiación ultravioleta, mediante la exposición prolongada a la luz UV de ratones, a los cuales se les dividió en dos grupos, al grupo 1 se administró el extracto de *P. leucotomos* puro, mientras que al grupo 2 se administró el extracto de *P. leucotomos* mezclado con el vehículo, se obtuvo como resultado de este ensayo que el

extracto puro de *P. leucotomos* activa el gen p53 y reduce la inflamación aguda por inhibición selectiva de la Cox-2. (Zattra et al., 2009: pp. 1952-1961)

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Lugar de investigación

- Comprobación e identificación taxonómica: Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).
- Control de calidad de la droga: Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).
- Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria: Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

#### 2.2. Materiales, equipos y reactivos para la determinación de la actividad antiinflamatoria.

##### 2.2.1. *Materia prima*

La materia prima utilizada fue rizomas de *Campyloneurum amphostenon*, que se recolectaron en la parroquia Yaruquies al occidente de la ciudad de Riobamba, a los márgenes del río Chibunga en la provincia de Chimborazo, verificándose específicamente las coordenadas geográficas (Latitud: 1°41'12"S ) y (Longitud: 78°39'17"W).

### **2.2.2. Reactivo Biológico**

Para la investigación de la actividad antiinflamatoria se utilizó como reactivo biológico ratas albinas (*Rattus norvegicus*) que según la Organización Panamericana de la Salud expresó en su XI reunión realizada en 1980 que “los países que han logrado un gran avance en el control de las enfermedades humanas y animales son los que han establecido entidades que se dedican al desarrollo de la Ciencia de los Animales de Laboratorio”. (Barassi et al., 1996a: pp. 531-532).

Para trabajar con los animales de experimentación se aplicó los “Principios de Técnicas de Experimentación Humanitarias” descritas por W. M. Russel y R. L. Burch, para mantener y utilizar en condiciones dignas y óptimas a los animales de laboratorio, obedeciendo las tres R que regulan la experimentación con animales de laboratorio, y son las siguientes:

1. Reemplazo de aquellos procedimientos que utilizan animales por otros que no sean útiles.
2. Reducción en el número de animales de experimentación utilizados.
3. Refinamiento de los métodos utilizados. (Capó, 2005a: p.29)

#### **2.2.2.1. Descripción de animales de experimentación**

- Peso promedio: 200-250g
- Edad: 2-3 meses
- Sexo: Hembras
- Lugar de nacimiento: Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSPI).

#### 2.2.2.2. *Condiciones ambientales*

- Temperatura:  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$
- Humedad Relativa:  $45\pm 5\%$
- Fotoperíodo: 12 horas luz – 12 horas oscuridad
- Agua y comida: ad libitum
- Cama con tamo esterilizado: cambio cada 48 horas.
- Tiempo de ambientación: 15 días

#### 2.2.3. *Equipos, materiales y reactivos*

##### EQUIPOS

- Molino Arthur H. Thomas
- Balanza analítica Radwag S 220.R2
- Rotavapor BUCHI CH-9230 FLAWIL-SCHWEIZ
- Sonicator Cole-Parmer
- Estufa RE 115
- Mufla SNOL 8,2
- Refractómetro de Abbé
- Espectrofotómetro Cole-Parmer
- Vórtex
- Centrífuga Clay Adams
- Desecador
- Cámara UV
- pH-metro (HANNA INSTRUMENT)
- Bomba de vacío

- Cámara fotográfica (Samsung)
- Computadora HP
- Congelador

## MATERIALES

- Vasos de precipitación de 50, 100,250 y 500 mL
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Cápsulas de porcelana
- Crisoles
- Espátula
- Probetas de 50 y 100 mL
- Balón esmerilado de 500 mL
- Balones aforados de 10, 25, 50, 100 y 250 mL
- Trípode
- Varilla de agitación
- Reverbero
- Matraces
- Embudo simple
- Termómetro
- Picnómetro
- Piseta
- Pinzas para cápsulas
- Pinzas de tubos
- Desecador
- Cuba cromatográfica
- Capilares

- Micropipeta automática de 100 $\mu$ L
- Micropipeta automática de 1000 $\mu$ L
- Tubos de vidrio de 10 mL
- Puntas azules estériles
- Puntas amarillas estériles
- Embudo de separación de 250mL
- Embudo buchner
- Kitasato de 100mL
- Frascos de vidrio ámbar
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Cánula
- Jeringuillas de 1, 3,5 y 10 mL
- Algodón
- Guantes, mascarilla, zapatones
- Cámara fotográfica
- Soporte universal

## REACTIVOS

- Etanol 96%
- Éter dietílico
- Agua destilada
- Agua purificada
- Ácido clorhídrico
- Ácido sulfúrico
- Cloroformo



- Ácido fórmico
- Ácido acético glacial
- Acetato de etilo
- Cloruro de Aluminio
- Polietilenglicol
- Metanol
- 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<sup>•</sup> (60 uM)
- Solución de carragenina al 1%
- Solución de Diclofenaco Sódico
- Solución de Carboximetilcelulosa al 10%
- Alcohol antiséptico
- Vaselina
- Placas de Sílica gel 60 F254 (Merck)

## **2.3. Métodos y Técnicas**

### **2.3.1. Comprobación Taxonómica**

La identificación taxonómica de los rizomas de Calaguala (*Campyloneurum amphostenon*) se realizó en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) por el Ing. Jorge Caranqui quién certificó el ejemplar. (Ver Anexo A)

### **2.3.2. Material vegetal**

Se descartó las hojas y los rizomas deteriorados, se lavó el material vegetal recolectado con abundante agua y luego se procedió al secado de los rizomas en una estufa con circulación de aire a una temperatura de 40°C durante tres días, hasta alcanzar una humedad relativa de 11%. Posteriormente se molió los rizomas secos en un molino con cuchilla giratoria y se almacenó en una funda plástica a temperatura ambiente.

### **2.3.3. Obtención del extracto Etanólico blando para evaluación antiinflamatoria**

Para la obtención del extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon* se utilizó como único solvente alcohol etílico al 96%. Se pesó 305,2 g del material vegetal seco y molido, el cual se colocó en un matraz erlenmeyer de 3000 mL con 1750 mL de solvente, luego se dejó macerar por 48 horas protegido de la luz y a temperatura ambiente con agitación ocasional (2 o 3 veces al día), metodología basada en la Farmacopea Brasileña.

Transcurrido este tiempo se procedió a filtrar el contenido de la maceración al vacío con la ayuda de un kitasato y un embudo Buchner, luego se concentró la muestra en el rotavapor a una temperatura no mayor de 60°C, este proceso tiene como finalidad aumentar el contenido de sólidos del extracto ya que a mayor concentración de éstos se logrará obtener un determinado contenido del residuo seco. A pesar de ser una técnica útil, la concentración viene a ser una etapa con un grado de dificultad elevada debido a que se corre el riesgo de degradación de

sustancias termolábiles por lo que la mayoría de extractos son evaporados a temperaturas relativamente bajas o al vacío. (Sharapin et al., 2000d: p.54).

Una vez obtenido el extracto blando, éste fue recogido en un frasco ámbar y congelado para su posterior utilización.

#### **2.3.4. Control de Calidad del material vegetal**

El Control de Calidad se realizó para confirmar la identidad y pureza de *C. amphostenon*, estos parámetros se ejecutaron en base a las técnicas establecidas por la Farmacopea Brasileña y la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP) 309 de Cuba, realizando las siguientes pruebas:

- Determinación de Cenizas Totales
- Determinación de Cenizas Solubles en agua
- Determinación de Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico
- Determinación del contenido de Humedad: método gravimétrico

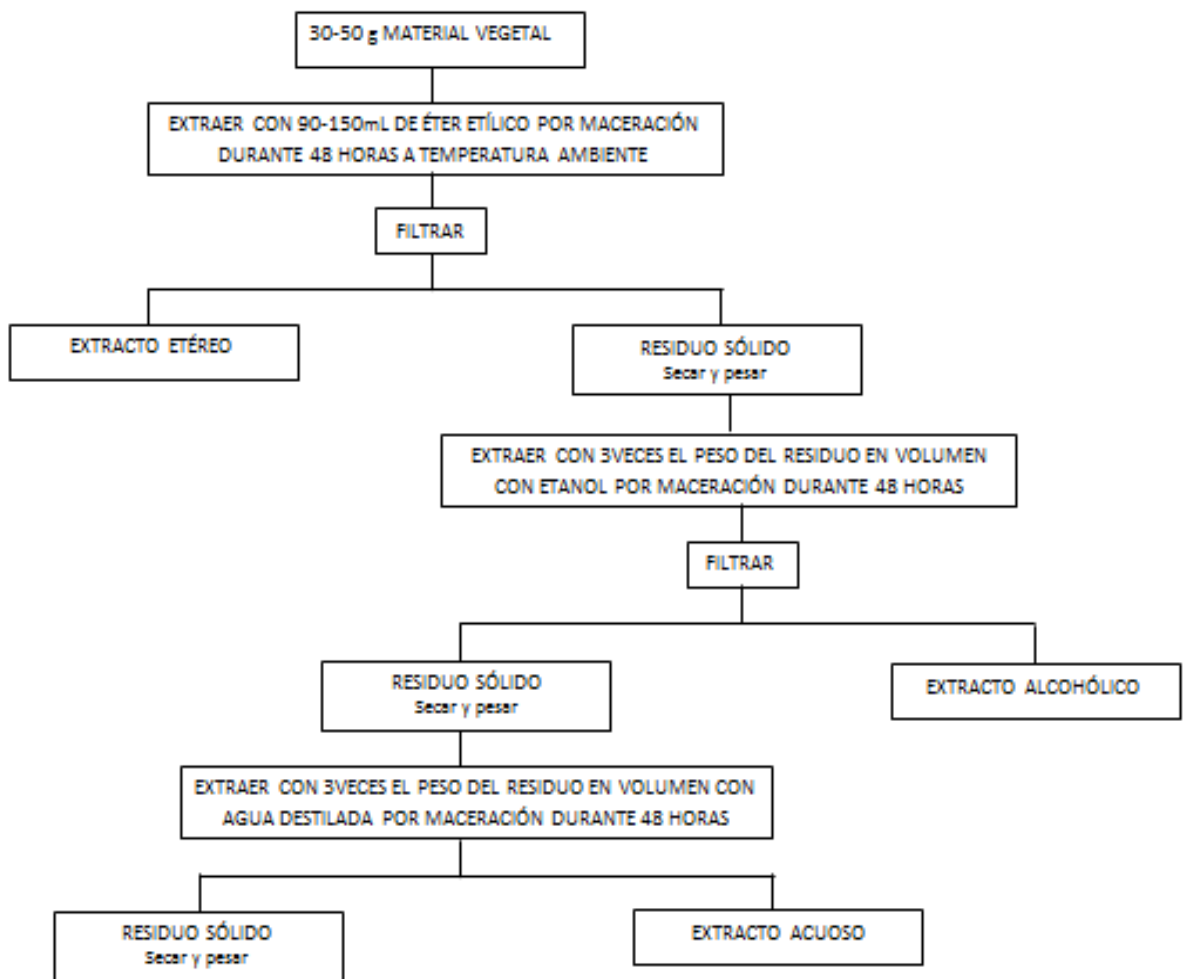
#### **2.3.5. Control de Calidad del extracto Etanólico**

El control de calidad del extracto Etanólico se realizó en base a las Normas Ramales de Salud Pública de Drogas Crudas 312 de Cuba, y se efectuaron las siguientes pruebas:

- Requisitos Organolépticos: color, olor, turbidez, aspecto.
- Determinación del pH

### 2.3.6. Tamizaje Fitoquímico

Este análisis se realizó en base a las Normas Ramales de Salud Pública de Drogas Crudas 309 de Cuba y a las técnicas descritas por Martínez en su libro Farmacognosia y Química de los Productos Naturales (Martínez, 2001, pp. 170-171), identificando reacciones de coloración, precipitación y fluorescencia, las cuales permitieron identificar determinados compuestos característicos de la planta (flavonoides, alcaloides, saponinas, terpenos, etc.)



**Figura 1-2** Extracción sucesiva de metabolitos secundarios con solventes de polaridad creciente

**Fuente:**(Martínez, 2001, pp. 170-171)

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

**Tabla 1-2:** Tamizaje Fitoquímico de los diferentes extractos obtenidos

EXTRACTO ETÉREO		EXTRACTO ALCOHÓLICO		EXTRACTO ACUOSO	
Metabolito	Ensayo	Metabolito	Ensayo	Metabolito	Ensayo
Aceites y grasas	Sudan	Catequinas	Catequinas	Fenoles y Taninos	Cl <sub>3</sub> Fe
Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner	Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner	Alcaloides	Dragendorff Mayer Wagner
Lactonas y Cumarinas	Baljet	Resinas	Resinas	Azúcares reductores	Fehling
Triterpenos-Esteroides	Liebermann-Buchard	Triterpenos-Esteroides	Liebermann-Buchard	Flavonoides	Shinoda
		Lactonas y Cumarinas	Baljet	Saponinas	Espuma
		Azúcares reductores	Fehling	Polisacáridos	Mucílagos
		Saponinas	Espuma	Principios Amargos	Principios Amargos
		Fenoles y Taninos	Cl <sub>3</sub> Fe		
		Aminoácidos	Nihidrina		
		Quinonas	Borntrager		
		Flavonoides	Shinoda		
		Flavonoides	Antocianidina		

**Fuente:** (NRSP, 1991, PP.30-40)

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

## 2.4. Análisis Cromatográfico en Capa Fina (CCF)

### 2.4.1. Análisis Cromatográfico para Flavonoides

La detección de flavonoides se realizó en base al protocolo establecido para Cromatografía de Capa Fina de Wagner H. 2001.

**Muestra:** Extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon* a 20 000ppm.

**Adsorbente:** Sílica gel 60 F254 (Merck)

**Sistema de solventes:** acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:26)

**Revelador:** AlCl<sub>3</sub>

**Potenciador de fluorescencia:** Polietilenglicol (PEG)

**Visualización:** Lámpara UV largo (254nm)

Para el análisis cromatográfico se procedió de la siguiente manera:

- Se pesó 20mg del extracto etanólico blando obtenido y se reconstituyó con 10mL del solvente utilizado (alcohol etílico al 96%).
- Se aplicó de 20 a 30 µL de la solución etanólica en una placa de cromatografía de Sílica gel con la ayuda de un capilar.
- Luego se introdujo la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las tres cuartas partes de la placa.
- Se retiró la placa de la cuba cromatográfica, se dejó secar y luego se observó en la lámpara UV, si no se logra apreciar ningún compuesto fluorescente se procede a revelar la placa.
- Si no se observa ningún compuesto fluorescente luego de revelar la placa, se procede a utilizar un potenciador de fluorescencia, finalmente se calculan los Rf. (Wagner y Bladt, 2001b: pp.195-196)

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{Distancia recorrida del solvente}}$$

#### 2.4.2. Análisis Cromatográfico para Terpenos

La detección de terpenos se realizó en base al protocolo establecido para Cromatografía de Capa Fina de Arai y colaboradores, quiénes aislaron Triterpenoides a partir de dos tipos de helechos pertenecientes a la familia *Polypodiaceae*. (Arai et al., 1991a: pp. 3369-3377)

**Muestra:** Extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon* a 20 000ppm.

**Adsorbente:** Sílica gel 60 F254 (Merck)

**Sistema de solventes:** n-hexano-acetato de etilo (8:2)

**Revelador:** Vainillina-Ácido Sulfúrico

**Visualización:** Vis

Para el análisis cromatográfico se procedió de la siguiente manera:

- Se pesó 20mg del extracto etanólico blando obtenido y se reconstituyó con 10mL del solvente utilizado (alcohol etílico al 96%).
- Se aplicó de 20 a 30  $\mu$ L de la solución etanólica en una placa de cromatografía de Sílica gel con la ayuda de un capilar.
- Luego se introdujo la placa en la cuba cromatográfica, hasta que el solvente recorra las tres cuartas partes de la placa.
- Se retiró la placa de la cuba cromatográfica, se dejó secar y luego se observó en el Vis, si no se logra apreciar ningún tipo de coloración se procede a revelar la placa y calentarla en un reverbero para apreciar las coloraciones propias de los terpenos.
- Finalmente se calculan los  $R_f$ . (Arai et al., 1991b: pp. 3369-3377)

## 2.5. Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresados como porcentaje de Quercetina.

La cuantificación de flavonoides totales en extracto etanólico blando fue determinado mediante espectrofotometría UV-visible utilizando cloruro de aluminio, según el método propuesto por Boukhris y colaboradores con ligeras modificaciones.

Primeramente se preparó una curva de calibración utilizando como patrón quercetina en concentraciones de 20-40-60-80 y 100 ppm.

Una vez realizada esta curva de calibración se procede a realizar el ensayo:

- Se tomaron 100µL de la muestra (extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon* de 1000ppm) y de las soluciones patrones de quercetina.
- Se agregó 300µL de NaNO<sub>2</sub> al 5% y 4mL de agua destilada.
- Se dejó en reposo cinco minutos y luego se agregó a la mezcla 300µL de AlCl<sub>3</sub> al 10%.
- Se dejó en reposo por seis minutos y se agregó 2mL de NaOH 1M
- Se dejó en reposo cinco minutos protegido de la luz y registrar la absorbancia a una  $\lambda$  de 510nm.

Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por mL de extracto y en porcentaje. (Boukhris et al., 2012: pp.1-8)



## **2.6. Cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.**

La cuantificación de fenoles totales en el extracto etanólico fue determinado mediante espectrofotometría UV-visible basado fundamentalmente en una reacción colorimétrica de óxido-reducción utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu como agente oxidante.

Se preparó una curva de calibración utilizando como patrón una solución estándar de ácido gálico en concentraciones de 20-40-60-80 y 100 ppm.

Se procedió a realizar el siguiente procedimiento tanto para las soluciones estándar como para la muestra (extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon* de 1111ppm):

- Se mezcló 2mL de las muestras a ensayar con 0,5mL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 20%.
- Se dejó en reposo cinco minutos y luego se añadió 0,5mL de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% y 5mL de agua destilada.
- Se dejó en reposo la mezcla durante una hora a temperatura ambiente y protegiéndola de la luz.
- Se registró la absorbancia de las muestras de ensayo a una  $\lambda$  de 510nm.

Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por mL de extracto y en porcentaje. (Shao y Lean, 2012, pp. 122-127)

## 2.7. Capacidad captadora de radicales libres *in vitro*. Método DPPH•

El ensayo de DPPH• es una técnica que permite evaluar la actividad de eliminación de radicales libres, este método fue descrito en primera instancia por Blois en el año de 1958 mismo que con el tiempo ha sufrido ligeras modificaciones para poder obtener resultados confiables. El DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en su forma radical absorbe a 517nm, pero al reducirse por un antioxidante o una especie radical su absorción irá disminuyendo progresivamente, por lo que, una menor absorbancia de la mezcla de reacción indica una mayor actividad de eliminación de radicales libres. (Öztürk et al., 2010a: pp. 31-38)

El efecto de eliminación del radical DPPH• se evaluó siguiendo el procedimiento descrito por Öztürk y colaboradores, con ligeras modificaciones.

El estándar o patrón se realizó con ácido gálico a concentraciones de 10-20-40-60-80 y 100 ppm, la solución de DPPH• se obtuvo a partir de la mezcla de 5,9mg del radical DPPH• + 250mL de metanol al 98%, la muestra se preparó a partir del extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon* a una concentración de 1000ppm.

Luego se procedió a realizar el siguiente ensayo:

- Se tomó 100µL de la muestra (extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon* de 1000ppm) o de la solución estándar y se mezcló con 3,9mL de DPPH• en metanol (60 µm). Se realizó una curva de calibración con el patrón.
- Se agitó la mezcla con la ayuda de un vórtex y se dejó en reposo protegido de la luz durante una hora.
- Transcurrido el tiempo establecido se midió la absorbancia a una  $\lambda$  de 515nm en el siguiente orden: a) Metanol (para encerrar el equipo), b) Muestra de DPPH\*, c) Blanco (3,9mL Metanol+ 100µL solvente del extracto), d) Patrón (estándares de ácido gálico), e) Muestra de *Campyloneurum amphostenon* de 1000ppm.

Los resultados fueron expresados como concentración inhibitoria media ( $\mu\text{g/mL}$ ) y porcentaje de Actividad Captadora de Radicales Libres. (Öztürk et al., 2010b: pp. 31-38)

## 2.8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

El modelo animal utilizado fueron ratas hembras albinas (*Rattus norvegicus*) con un peso corporal (p.c.) entre 200-250g, en una edad comprendida de 2 a 3 meses, las cuales se ambientaron a las condiciones del Bioterio (temperatura constante de  $25\pm 2^\circ\text{C}$ , humedad relativa de  $45\pm 5\%$ , fotociclo de 12 horas luz/oscuridad) para su adaptación por un período de 15 días. Los animales de experimentación fueron alimentados con dieta estándar y agua a libre demanda.

Luego del período de ambientación, se pesaron las ratas para colocarlas en jaulas individuales y distribuidas aleatoriamente en los grupos de tratamiento. La inducción de la inflamación se llevó a cabo utilizando la prueba de edema plantar inducido por carragenina descrita por Winter (Winter et al., 1962: pp. 544-547), misma que consiste en la administración de la solución de carragenina por vía subcutánea en la aponeurosis de la pata derecha de la rata, provocando de esta manera una reacción inflamatoria.

Para la ejecución de la evaluación de la actividad antiinflamatoria se utilizaron lotes de cuatro ratas para cada ensayo, el extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon* a probar fue administrado en tres diferentes dosis, mientras que el blanco, el diclofenaco sódico y el extracto estándar (*Eupatorium glutinosum*) fueron administrados en una única dosis, mismos que se adaptaron a un vehículo apropiado que fue la carboximetilcelulosa (CMC) al 10%, solvente que permitió una dispersión homogénea de los extractos siendo su forma farmacéutica una suspensión que se administró por vía oral con la ayuda de jeringas adaptadas con una cánula para ser utilizada como sonda gástrica.

Los grupos de tratamiento fueron:

- Blanco: vehículo, solución de Carboximetilcelulosa al 10%.
- Grupo Control Positivo 1: Diclofenaco sódico, 100mg/Kg
- Grupo Control Positivo 2: Extracto etanólico blando de *Eupatorium glutinosum*, 100mg/Kg

- Grupo experimental 1: Extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon*, 300mg/Kg
- Grupo experimental 2: Extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon*, 100mg/Kg
- Grupo experimental 3: Extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon*, 25mg/Kg

Media hora después de la administración del extracto, se indujo el edema en la pata derecha de la rata inyectando 0,1mL de solución acuosa de carragenina al 1%. Las mediciones de las patas inflamadas se obtuvieron a partir del programa ImageJ (Anexo Q) el cual proporciona un área exacta y por lo tanto resultados confiables, para esto se fotografiaron las patas inflamadas de las ratas a la 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 horas después de la inducción de la inflamación, utilizando una cámara Samsung colocada a la misma altura para cada fotografía de las patas inflamadas y así obtener resultados confiables.

Los resultados se expresan como porcentaje de inflamación utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inflamación} = \frac{A_t - A_o}{A_o} \times 100$$

Dónde:

$A_t$ = área de la pata inflamada a un tiempo x

$A_o$ = área normal (antes de la aplicación de la carragenina)

A continuación se explica el modelo experimental utilizado para evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon*, *in vivo*, fotografiando para cada hora el área de la inflamación en la región plantar de la rata.

**Tabla 2-2:** Modelo experimental para la evaluación de la Actividad Antiinflamatoria.

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>REPETICIONES</b>			
<b>T1</b>	R1	R2	R3	R4
<b>T2</b>	R1	R2	R3	R4
<b>T3</b>	R1	R2	R3	R4
<b>T4</b>	R1	R2	R3	R4
<b>T5</b>	R1	R2	R3	R4
<b>T6</b>	R1	R2	R3	R4

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

Dónde:

T1= Edema plantar + vehículo

T2= Edema plantar + Fármaco estándar (Diclofenaco sódico 100mg/kg)

T3= Edema plantar + Extracto etanólico estándar (*Eupatorium glutinosum* 100mg/kg)

T4= Edema plantar + Dosis equivalente de planta contenida en el extracto: 300 mg/kg

T5= Edema plantar + Dosis equivalente de planta contenida en el extracto: 100 mg/kg

T6= Edema plantar + Dosis equivalente de planta contenida en el extracto: 25 mg/kg

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se emplearon un total de 24 animales de experimentación, utilizando para cada tratamiento 6 ratas albinas. El estudio se realizó con cuatro réplicas para obtener reproducibilidad.

\*Nota: los animales de experimentación deben cumplir ciertas condiciones antes de ser sometidos al ensayo:

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

### **2.8.1. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa SPSS versión 22, en el cual se aplicó el test ANOVA de un factor para comprobar si existe diferencia significativa entre los tratamientos estudiados, en base a este parámetro se planteó la siguiente hipótesis estadística:

**H<sub>0</sub>:** No existe diferencia entre cada uno de los tratamientos administrados a los animales de experimentación tras la inducción de edema plantar.  $p \geq 0,05$

**H<sub>1</sub>:** Al menos uno de los tratamientos administrados es diferente.  $p < 0,05$

Si se acepta la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) se concluye que no existe diferencia entre los tratamientos administrados, pero si se rechaza ésta se asevera que al menos uno de los tratamientos administrados es diferente por lo que se procede a aplicar el test de Tukey B que determina si existe diferencia significativa entre los tratamientos administrados según su porcentaje de inflamación.

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1. Control de Calidad del material vegetal

El control de calidad es de vital importancia para verificar la identidad y esencialmente la pureza del material vegetal. Se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 1-3:** Resultados del control de calidad del material vegetal de *Campyloneurum amphostenon*

PARÁMETRO	RESULTADO (%)	REFERENCIA FARMACOPÉA ESPAÑOLA
CENIZAS TOTALES	3.929 ± 0.2441	Máx. 5%
DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA	1.652 ± 0.2377	Máx. 2%
DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO	0.818 ± 0.0694	Máx. 1%
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD	11.236 ± 0.0062	Máx. 14%

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

Se puede apreciar que los valores obtenidos en la tabla 1-3 están dentro de los valores establecidos por la Farmacopea Española, al realizar el ensayo de cenizas totales y obtener un porcentaje dentro de los límites establecidos es indicativo de que el material vegetal no presenta contaminación, las cenizas solubles en agua muestran que el material vegetal no presenta grandes cantidades de sales minerales, en tanto que el ensayo para determinar cenizas insolubles en ácido clorhídrico demuestran que el material vegetal no contiene metales pesados u otros componentes inorgánicos que contaminen el material vegetal.

El porcentaje de humedad obtenido determina el contenido de agua residual en el material vegetal desecado, éste parámetro no debe exceder el 14% según la Farmacopea Española, si se excede este valor podría ocurrir una reacción de hidrólisis y consecuentemente degradación de la materia prima y contaminación microbiológica de la misma. Los resultados obtenidos al realizar el control de calidad del material vegetal se encuentran dentro de lo establecido por la Farmacopea Española, por lo que se garantiza la pureza de la droga vegetal y se descarta una posible contaminación.

### 3.2. Rendimiento de extracción del rizoma de *Campyloneurum amphostenon*

El porcentaje de rendimiento del extracto etanólico blando de los rizomas de *C. amphostenon* fue de 16,978 por ciento, como lo muestra la siguiente tabla:

**Tabla 2-3:** Extracto obtenido de la droga vegetal (DV) de *Campyloneurum amphostenon*

g de la DV/mL de etanol al 96%	Extracto obtenido	(g) Obtenidos del Extracto	% de rendimiento
305,2g/1750mL	Blando	56.816g de extracto	16.978%

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

El extracto obtenido presentó una consistencia pastosa, se utilizó como solvente etanol al 96% obedeciendo a la técnica descrita por la Farmacopea Brasileña, ya que en ésta se explica claramente que para la obtención de un extracto blando se usa como solventes principalmente el alcohol etílico o agua (Farmacopea Brasileña, 2010 b: p.43), además por extraer grandes cantidades de sustancias naturales que son de interés para la presente investigación como flavonoides y terpenos (Sharapin et al., 2000: p.40) por lo que se justifica la razón de usar este solvente.



### 3.3. Control de Calidad del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon*

#### 3.3.1. Requisitos organolépticos de *Campyloneurum amphostenon*

**Tabla 3-3:** Resultados de los requisitos organolépticos del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon*

<b>PARÁMETRO</b>	<b>DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA</b>
<b>COLOR</b>	Café claro
<b>OLOR</b>	Ligeramente a alcohol
<b>TRANSPARENCIA</b>	Opaco
<b>PRESENCIA DE PARTÍCULAS</b>	Ausencia
<b>SABOR</b>	Astringente

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

Los parámetros obtenidos en el control de calidad del extracto etanólico de *C. amphostenon* fueron: un color parecido al material vegetal de partida, el olor fue característico y parecido al solvente utilizado, el extracto no presentó transparencia esto debido a que se trabajó con los rizomas, mismos que poseen gran cantidad de látex y azúcares que pueden opacar la transparencia del extracto, en lo que respecta al sabor fue astringente debido a que este extracto contiene gran cantidad de compuestos fenólicos como se verá más adelante al obtener los resultados del tamizaje fitoquímico.

No se ha registrado referencias estándares para su comparación, pero se puede establecer que estas características son propias para cada especie que se desee analizar, sin embargo, este parámetro nos ayuda a verificar que el extracto esté debidamente preparado, con ausencia de partículas extrañas, permitiendo a su vez obtener un extracto de calidad y por ende hallar una acción terapéutica efectiva ya que no existirán contaminantes que interfieran con la acción del extracto.

### 3.3.2. Parámetros físico-químicos del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon*

**Tabla 4-3:** Resultado del control de calidad de los parámetros físico-químicos del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon*

PARÁMETRO	RESULTADO
pH	4.423 ± 0.2300

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

El pH obtenido fue de 4,423 valor que se encuentra dentro de los límites establecidos por la Farmacopea Española para materiales vegetales que van de 4 a 9.

### 3.4. Tamizaje Fitoquímico

**Tabla 5-3:** Resultados de Tamizaje Fitoquímico de *Campyloneurum amphostenon*

ENSAYO	TIPO METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudan	Aceites y Grasas	+	NA	NA
Dragendorff	Alcaloides	-	+++	+
Mayer	Alcaloides	-	-	-
Wagner	Alcaloides	-	++	+
Baljet	Cumarinas	-	+++	NA
Liebermann-Buchard	Triterpenos-Esteroides	+	+	NA
Catequinas	Catequinas	NA	-	NA
Resinas	Resinas	NA	-	NA
Fehling	Az. Reductores	NA	+	-
Espuma	Saponinas	NA	+	+
Cl <sub>3</sub> Fe	Fenoles y Taninos	NA	++	+
Borntrager	Quinonas	NA	++	NA
Shinoda	Flavonoides	NA	++	-
Antocianidina	Antocianidinas	NA	+++	NA
Ninhidrina	Aminoácidos	NA	-	NA

Mucílago	Polisacáridos	NA	NA	-
Principios amargos	Principios amargos	NA	NA	-

**Interpretación:**(-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia Media, (+++) Alta evidencia, (NA) No Aplica

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

El tamizaje fitoquímico se realizó en tres diferentes extractos, obteniendo los mismos con solventes de polaridad ascendente para lograr un mayor agotamiento de la droga vegetal.

El éter dietílico se utilizó para obtener el extracto etéreo, éste extraerá principios activos liposolubles encontrándose como resultado los siguientes metabolitos secundarios: aceites y grasas, triterpenos y esteroides, en baja evidencia.

Se utilizó el alcohol etílico al 96% para obtener la fracción etanólica que extraerá principios activos con polaridad intermedia, los metabolitos secundarios que se identificaron fueron: alcaloides, cumarinas y flavonoides en alta evidencia. Como evidencia media se identificaron los siguientes compuestos: quinonas, fenoles y taninos. Se reportó como baja evidencia triterpenos, esteroides, saponinas y azúcares reductores.

Finalmente el agua se utilizó para obtener la fracción acuosa del material vegetal, este solvente extraerá compuestos hidrofílicos. Los metabolitos secundarios identificados en este tipo de extracto fueron: alcaloides, saponinas, fenoles y taninos, todos en baja evidencia.

Como resultado se determinó trabajar con la fracción etanólica debido a que en éste se extrajo mayor cantidad de metabolitos secundarios, además porque el alcohol es antimicrobiano e impedirá la propagación bacteriana y a su vez permitirá estabilidad y conservación del extracto.

El screening realizado dio como resultado una mayor cantidad de flavonoides en el extracto etanólico, los tipos de compuestos fenólicos detectados fueron: flavonoides (Reacción de Shinoda: coloración amarilla, presencia de flavonoles), antocianinas y presencia de taninos (coloración azul). En cuanto se refiere a la caracterización de esteroides y triterpenoides mediante la prueba preliminar de Liebermann-Buchard dio positivo con la presencia de un anillo rojo

ladrillo. También se encontró que en el rizoma de *C. amphostenon* se encuentran cantidades considerables de alcaloides.

Los resultados obtenidos indican que los compuestos fenólicos en especial los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que exhiben los helechos pertenecientes a la familia *Polypodiaceae*, ya que según indica Gudiel quién realizó una evaluación fitoquímica de *Polypodium triseriale* (especie emparentada con *C. amphostenon*) colectadas en dos diferentes localidades de Guatemala, encontró que los flavonoides y antocianinas, se encuentran en las especies colectadas tanto en los rizomas como en las frondas de *Polypodium triseriale*. (Gudiel, 2009: pp.57-60) Mientras que Zuleta quién realizó un estudio sobre el perfil fitoquímico en las escamas y rizomas de *Phlebodium pseudoaureum* proveniente de 5 regiones de Guatemala, halló que las especies colectadas en las diferentes regiones contienen: alcaloides, taninos, flavonoides y saponinas en todos los extractos analizados ya sea de escamas o rizomas y en mayor o menor concentración. (Zuleta, 2005: pp. 24-33)

Estos estudios corroboran los resultados obtenidos en el extracto etanólico de *C. amphostenon* ya que se determinó gran cantidad de compuestos fenólicos gracias a la gran cantidad de precipitado y coloraciones fuertes formadas durante los ensayos.

**Tabla 6-3:** Resultados de Tamizaje Fitoquímico de *Eupatorium glutinosum*

ENSAYO	TIPO METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudan	Aceites y Grasas	NA	NA	NA
Dragendorff	Alcaloides	-	-	+
Mayer	Alcaloides	-	-	-
Wagner	Alcaloides	-	-	+
Baljet	Cumarinas	-	-	NA
Liebermann-Buchard	Triterpenos-Esteroides	+	+	NA
Catequinas	Catequinas	NA	+	NA
Resinas	Resinas	NA	+	NA
Fehling	Az. Reductores	NA	-	-
Espuma	Saponinas	NA	-	-
Cl <sub>3</sub> Fe	Fenoles y Taninos	NA	+	+
Borntrager	Quinonas	NA	-	NA
Shinoda	Flavonoides	NA	+	-
Antocianidina	Flavonoides	NA	++	NA
Ninhidrina	Aminoácidos	NA	-	NA
Mucílagos	Polisacáridos	NA	NA	-
Principios amargos	Principios amargos	NA	NA	-/+

**Interpretación:**(-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia Media, (+++) Alta evidencia, (NA) No Aplica

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

En la tabla 6-3 se aprecian los resultados obtenidos del screening fitoquímico de *Eupatorium glutinosum* (extracto estándar), en el extracto acuoso se evidencia la presencia de triterpenos y esteroides, en el extracto alcohólico se identifica la presencia de metabolitos como: flavonoides en evidencia media y triterpenos y esteroides, catequinas, resinas y fenoles en evidencia baja. En tanto que en el extracto acuoso se evidencia la presencia de alcaloides y compuestos fenólicos en baja evidencia.

Como se puede apreciar anteriormente los compuestos fenólicos son aquellos que se encuentran en mayor cantidad en el extracto etanólico de *Eupatorium glutinosum*, especialmente los

flavonoides, mismos que han mostrado actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo*, se ha descrito que no son tan potentes en desórdenes agudos pero son agentes terapéuticos potenciales en el tratamiento de la inflamación crónica y producen menos efectos adversos que los tratamientos alopáticos. (Saady, 2011: pp. 66)

Los triterpenos también se hacen presentes en esta especie, éstos abundan en los vegetales pero también se encuentran distribuidos en los animales, a partir de ellos se forman los esteroides que son compuestos liposolubles; entre sus actividades farmacológicas se destaca su acción antiinflamatoria, aunque en literatura también se reporta su acción estimulante y depresora del sistema nervioso central. (Cuellar, 2001: pp. 107-113)

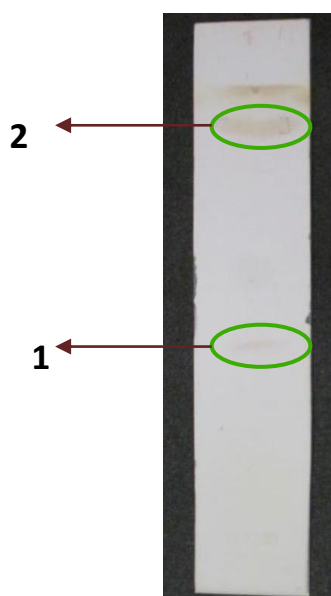
### **3.5. Análisis Cromatográfico en Capa Fina (CCF)**

Se realizó el análisis cromatográfico en Capa Fina de acuerdo a los tipos de metabolitos secundarios encontrados en el tamizaje fitoquímico. Como se puede apreciar previamente, se reportó cuantitativamente gran cantidad de compuestos fenólicos, en los que se destaca a los flavonoides, por lo que se decidió analizar este tipo de compuestos para poder identificarlos cualitativamente. Como análisis complementario se realizó la detección cualitativa de terpenos y esteroides ya que bibliografía reporta que en algunas especies pertenecientes a la familia *Polypodiaceae* se encuentra gran cantidad de saponinas que pueden ser de naturaleza triterpénica o esteroideal. (Orozco, 2010: pp.19-22)

#### **3.5.1. Análisis Cromatográfico para Flavonoides**

El estudio previo (Tamizaje Fitoquímico) dio como resultado gran cantidad de flavonoides reportados cuantitativamente (Shinoda y Antocianinas), para corroborar estos resultados se procedió a realizar un análisis cromatográfico para identificar que flavonoide se encuentra presente en la especie perteneciente a la familia *Polypodiaceae* (*Campyloneurum amphostenon*) y *Asteraceae* (*Eupatorium glutinosum*).

*Campyloneurum amphostenon*



**Figura 1-3** Cromatografía en capa fina de *Campyloneurum amphostenon*

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

Mediante esta técnica cromatográfica se obtuvo una coloración que varía de amarillo a café, esto debido a la presencia de flavonoides. Se puede apreciar la presencia de dos compuestos con un Rf de: 0,46 y 0,92.

**Tabla 7-3:** Posibles compuestos fenólicos identificados mediante CCF para *Campyloneurum amphostenon*

MUESTRA	COMPUESTO	Rf	POSIBLE COMPUESTO IDENTIFICADO
Extracto etanólico de <i>Campyloneurum amphostenon</i>	1	0.46	-
	2	0.92	Kaempferol

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

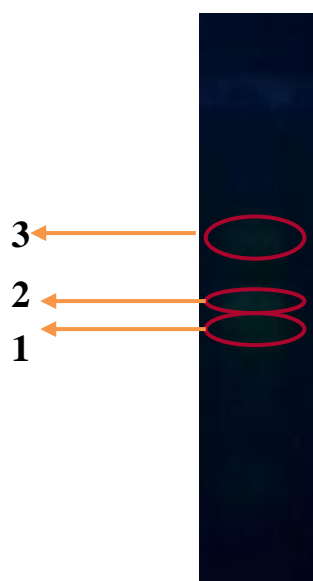
Según el Rf obtenido, el posible compuesto identificado es el Kaempferol con un Rf de 0,92 éste se acerca al valor otorgado por Wagner y Bladt, quienes establecen que el Kaempferol presenta un Rf de 0,91 y una típica coloración en el UV de zonas fluorescentes que van del amarillo al verde.

Cabe destacar que no se han realizado investigaciones previas con esta especie, sin embargo, existen referencias bibliográficas de algunas especies emparentadas con la del presente estudio, todas pertenecientes a la familia *Polypodiaceae* que han realizado diversos estudios y han logrado identificar diferentes metabolitos de estas especies, Manna y colaboradores al realizar un estudio de inhibición de los factores de transcripción nuclear-kB activado por diversos agentes inflamatorios y promotores de tumores por parte de *Polypodium leucotomos* lograron identificar por la técnica de Resonancia Magnética Nuclear compuestos como: glucósidos (kaempferol-O-b-xylopyranosyl-(1-2)-b-D-arabinopyranoside), flavonoides glucosídicos (rutina y kaempferol 3-O-a-p-arabinopyranoside), la fracción de proantocianida selligeanin y el ácido cumarínico (Manna et al., 2003c: pp. 171-180).

En tanto que Yao y colaboradores quienes realizaron un estudio químico de los constituyentes de un helecho de origen chino perteneciente a la familia *Polypodiaceae* (*Polypodium hastatum*) lograron identificar los siguientes compuestos: kaempferol-7-O-a-L-rhamnopyranoside y Kaempferol-3-O-arabinofuranósido conocido como juglanin (Yao et al., 2012: pp. 275-278). Por lo mencionado anteriormente se tiene suficiente evidencia para validar la técnica utilizada ya que dos diferentes especies de *Polypodium* presentaron glucósidos de kaempferol que se encontró previamente en *Campyloneurum amphostenon*.



*Eupatorium glutinosum*



**Figura 2-3** Cromatografía en capa fina de *Eupatorium glutinosum*

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

Mediante esta técnica cromatográfica se obtuvo una coloración que varía de amarillo a verde, esto debido a la presencia de flavonoides. Se puede apreciar la presencia de tres compuestos con un Rf de: 0,40-0,51-0,63.

**Tabla 8-3:** Posibles compuestos fenólicos identificados mediante CCF para *Eupatorium glutinosum*

MUESTRA	COMPUESTO	Rf	POSIBLE COMPUESTO IDENTIFICADO
Extracto etanólico de <i>Eupatorium glutinosum</i>	1	0,47	-
	2	0,51	Ácido clorogénico
	3	0,63	Quercetina

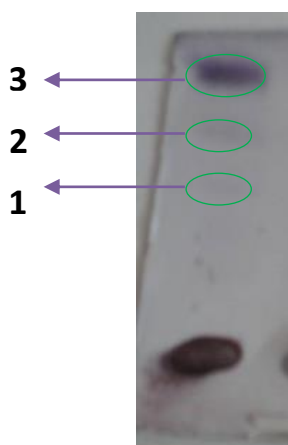
**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

Según los Rf obtenidos mediante TLC para el extracto etanólico de *Eupatorium glutinosum* se identificaron los siguientes compuestos: Ácido clorogénico y Quercetina (o sus derivados), mismos que son similares al recorrido de referencia citado por Wagner y Bladt, quienes establecen que el valor de recorrido del ácido clorogénico es 0,50 y al obtener un valor de Rf de 0,51 se asume que se trata de este compuesto, mientras que para la Quercetina se establece un

valor de recorrido que va de 0,60-0,70 por lo que se asume la existencia de derivados de Quercetina ya que se encontró un Rf de 0,63.

### 3.5.2. Análisis Cromatográfico para Terpenos

En el análisis cualitativo del extracto de *C. amphostenon* se obtuvo en baja intensidad la presencia de triterpenos y esteroides, sin embargo bibliografía habla de la presencia de un fitosterol ( $\beta$ -sitosterol) en *Polypodium hastatum* (Yao et al., 2012: pp. 275-278) y diferentes ecdisteroides en *Polypodium vulgare* (Reixach et al., 1996: pp. 597-602), por lo que se procedió a realizar un análisis cromatográfico para identificar qué tipo de compuestos terpénicos se encuentran presentes en esta especie perteneciente a la familia *Polypodiaceae* (*Campyloneurum amphostenon*).



**Figura 3-3:** Cromatografía en capa fina de *Campyloneurum amphostenon*

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

Mediante esta técnica cromatográfica se obtuvo una coloración que varía de tonalidades de morado a lila, esto debido a la presencia de compuestos terpénicos. Se puede apreciar la presencia de dos compuestos con un Rf de: 0,53-0,74-0,95.

**Tabla 9-3:** Posibles compuestos terpénicos identificados mediante CCF para *Campyloneurum amphostenon*

MUESTRA	COMPUESTO	Rf	POSIBLE COMPUESTO IDENTIFICADO
Extracto etanólico de <i>Campyloneurum amphostenon</i>	1	0.53	-
	2	0.74	Campesterol
	3	0.95	$\beta$ -sitosterol

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

Según los Rf obtenidos, los posibles compuestos identificados son: Campesterol y  $\beta$ -sitosterol cuyos Rf son de 0,74 y 0,95 respectivamente, estos valores coinciden con fuentes bibliográficas según lo indican Sangeeta y Renu, quienes realizaron una estimación cuantitativa del fitosterol de dos plantas medicamente importantes de *Cucurbitaceae*, para dicho estudio realizaron un análisis cromatográfico que identificó terpenos y utilizaron la misma fase móvil que se aplicó en el presente estudio, Sangeeta y Renu encontraron la presencia de  $\beta$ -sitosterol que fue comparado con su respectivo estándar atribuyéndole un Rf de 0,92 y una típica coloración que va del gris-rosado al violeta, también se encontró la presencia de Campesterol igualmente comparado con su estándar otorgándole un Rf de 0,76 y una coloración típica de negro púrpura. (Sangeeta y Renu, 2014:pp.100-104)

Por lo mencionado anteriormente se le puede atribuir a esta especie (*Campyloneurum amphostenon*) la presencia de esteroides, ya que los compuestos obtenidos en el análisis se asemejan a los resultados que obtuvieron Sangeeta y Renu en su estudio de fitoesteroides. Además hay que recordar que la familia *Polypodiaceae* es muy conocida por poseer en su composición saponinas, sin embargo cabe destacar que estos saponósidos no son solubles en disolventes de media y baja polaridad por lo que no serán detectados en este extracto etanólico; sin embargo las geninas libres no son solubles en agua y sí en solventes orgánicos como el alcohol, (Orozco, 2010: p.20) lo que justifica la presencia de fitoesteroides en el extracto etanólico de *C. amphostenon*.

### 3.6. Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides totales expresados como porcentaje de Quercetina

Para la cuantificación de flavonoides totales en los extractos etanólicos de *Campyloneurum amphostenon* y *Eupatorium glutinosum* se elaboró una curva de calibración en base a la solución estándar de quercetina, cuya ecuación de la recta es:  $y=0,0009x+0,0066$  con un coeficiente de correlación  $R^2=0,9991$ .

Se realizaron diluciones de los extractos etanólicos de *C. amphostenon* y *E. glutinosum* con la finalidad de que las absorbancias obtenidas se encuentren dentro de la curva de calibración. En la tabla 10-3 se reportan los resultados obtenidos expresados como mg equivalentes de quercetina por ml de extracto y en porcentaje.

**Tabla 10-3:** Resultados de la cuantificación de flavonoides totales

Extractos	Concentración ppm	mg equivalentes de quercetina/ml de extracto	Porcentaje
<i>Campyloneurum amphostenon</i>	1000 ppm	9.240 mgEQ/mL	0.924 %
<i>Eupatorium glutinosum</i>	1000 ppm	4.585 mgEQ/mL	0.459 %

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

Se puede apreciar que el mayor porcentaje del contenido de flavonoides lo posee el extracto etanólico de *C. amphostenon* comparado con el de *E. glutinosum* obedeciendo a valores de 0,924% y 0,459% respectivamente, al ser el extracto etanólico de *C. amphostenon* el que contiene mayor cantidad de flavonoides se espera una actividad favorable y comparada a la acción del extracto estándar (*E. glutinosum*).

A pesar de no existir referencia bibliográfica sobre la cuantificación espectrofotométrica de *C. amphostenon* se tiene datos sobre la especie de *Polypodium triseriale* perteneciente a la misma familia de la especie en estudio (*Polypodiaceae*). Gudiel quién realizó la cuantificación de flavonoides en los rizomas de *Polypodium triseriale* recolectados en dos diferentes localidades de Guatemala encontró que en los rizomas de la localidad de Verapaz existe un 0,84% de flavonoides, mientras que en los rizomas de la localidad de Escuintla se encontró un 1,55% de

flavonoides (Gudiel, 2009: p. 61), valores que encierran al porcentaje de flavonoides obtenidos para *C. amphostenon* que fue de 0,924 y lleva a la conclusión de que estas especies son ricas en flavonoides.

En cuanto se refiere a la cuantificación de flavonoides para el extracto estándar *E. glutinosum* no existe referencias bibliográficas que permitan comparar los datos obtenidos ya que esta especie es muy poco estudiada y al ser una especie nativa de los páramos ecuatorianos existe muy poca información. Sin embargo al poseer un porcentaje de flavonoides de 0,459% se puede asegurar que dicho valor le confiere la actividad antiinflamatoria establecida.

### 3.7. Cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC)

Para la cuantificación espectrofotométrica de fenoles totales o la capacidad de reducción del reactivo de FC por parte de los extractos etanólicos de *Campyloneurum amphostenon* y *Eupatorium glutinosum* se elaboró una curva de calibración en base a la solución estándar de ácido gálico, cuya ecuación de la recta es:  $y=0,0005x+0,1925$  con un coeficiente de correlación  $R^2=0,982$ .

Se realizaron diluciones de los extractos etanólicos de *C.amphostenon* y *E. glutinosum* con la finalidad de que las absorbancias obtenidas se encuentren dentro de los límites de la curva de calibración. En la tabla 11-3 se reportan los resultados obtenidos expresados como mg equivalentes de ácido gálico por ml de extracto y en porcentaje.

**Tabla 11-3:** Resultados de la cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu

Extractos	Concentración ppm	mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto	Porcentaje
<i>Campyloneurum amphostenon</i>	1111 ppm	66.832 mgEQ/mL	6.683 %
<i>Eupatorium glutinosum</i>	1111 ppm	43.663 mgEQ/mL	4.366 %

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

El contenido de fenoles totales obtenido en los extractos etanólico de *C. amphostenon* y *E. glutinosum* fueron de: 6,683% y 4,366% respectivamente. Como se puede apreciar *C. amphostenon* es el extracto que presenta mayor concentración de fenoles totales.

Estudios previos confirman el porcentaje hallado en la presente investigación, Bagniewska y colaboradores realizaron un estudio de la localización de compuestos fenólicos en rizomas de *Polypodium vulgare* después de la deshidratación inducida por manitol y desecación controlada, encontrando como resultado un porcentaje de contenido de fenoles de aproximadamente 9,12%, cabe recordar que la materia prima (rizomas de *C. amphostenon*) fue obtenida mediante desecación controlada, por lo que el resultado que se muestra en la tabla 9-3 es cercano al que reporta bibliografía. (Bagniewska et al., 2008: pp. 1251-1259)

No existe referencias bibliográficas para la comparación del valor encontrado en la cuantificación de fenoles totales de *E. glutinosum* sin embargo se ha comprobado su actividad antiinflamatoria por lo que se asegura que su contenido en fenoles es lo suficientemente aceptado para que ejerza dicha acción. (Heras et al., 1998:pp. 161-166)

### **3.8. Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH\***

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de *Campyloneurum amphostenon* y *Eupatorium glutinosum* se utilizó el método DPPH\* debido a que éste es aceptado y validado, es un método que permite evaluar la habilidad captadora de radicales libres y además es reproducible y no emplea mucho tiempo.

Para la cuantificación espectrofotométrica de la capacidad captadora de radicales libres por parte de los extractos etanólicos de *Campyloneurum amphostenon* y *Eupatorium glutinosum* se elaboró una curva de calibración en base a la solución estándar de ácido gálico, cuya ecuación de la recta es:  $y=0,799e^{-0,024x}$  con un coeficiente de correlación  $R^2=0,9817$ .

Se realizaron diluciones de los extractos etanólicos de *C. amphostenon* y *E. glutinosum* con la finalidad de que las absorbancias obtenidas se encuentren dentro de los límites de la curva de

calibración, los resultados son expresados en Concentración Inhibitoria Media y su respectivo porcentaje de Actividad Captadora de Radicales libres.

**Tabla 12-3:** Resultados de la capacidad captadora de radicales libres

Extractos	Concentración ppm	Concentración inhibitoria media (µg/mL)	Porcentaje de ACRL
<i>Campyloneurum amphostenon</i>	1000 ppm	95.889 µg/mL	129.02 %
<i>Eupatorium glutinosum</i>	1111 ppm	85.359 µg/mL	114.85 %

**Realizado por:** Nancy Vargas, 2017

La capacidad antioxidante se ha evaluado como la capacidad de prevenir la oxidación por parte de los extractos etanólicos de *C. amphostenon* y *E. glutinosum*, el radical libre de DPPH• se reduce a hidracina cuando reacciona con donantes de hidrógeno y además puede producir radicales libres estables en solución acuosa o metanol. (Rashid et al., 2015:pp. 103-110)

En la presente investigación se obtuvo como resultado de la concentración inhibitoria media (µg/mL) para *C. amphostenon* un valor de 95,889 µg/mL (0,096 mg/mL) y para *E. glutinosum* un valor aproximado de 85,359 µg/mL (0,0854mg/mL), como se puede apreciar el extracto que posee mejor capacidad antioxidante es el correspondiente a *E. glutinosum*, ya que mientras más bajo sea la CIM mejor capacidad poseerá el extracto.

Gudiel quién realizó un estudio de la capacidad antioxidante de *Polypodium triseriale* extraídos de dos diferentes localidades determinó que los miligramos de extracto seco de rizomas de *P. triseriale* que inhiben al 50% el radical libre DPPH• y por ende es su actividad antioxidante es de 0,056mg (localidad Verapaz) y 0,195mg (localidad Escuintla) (Gudiel, 2009: p. 60); entre estos valores se encuentra la CIM encontrada para el extracto etanólico de *C. amphostenon*, con este reporte se confirma la actividad antioxidante de esta especie y la elevada concentración de compuestos antioxidantes que posee la especie mencionada.

Los resultados de las cuantificaciones, muestran inter-relaciones entre la concentración de fenoles y flavonoides totales obtenidos previamente con la actividad antioxidante al reducir al DPPH•, esto se debe a la presencia de grupos hidroxilo de los fenoles y de los flavonoides, en los extractos de *C. amphostenon* y *E. glutinosum* analizados, ya que éstos grupos funcionales en la posición adecuada podrán ser capaces de donar electrones; también esta actividad se le puede

atribuir a la presencia del grupo catecol en el anillo B y el grupo 3-y 5-hidroxilo en el anillo heterocíclico de los flavonoides incrementando su actividad como captadores de radicales libres, mientras que la glicosilación la reduce notablemente. (Saudy, 2011: pp. 64-78)

### 3.9. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

#### 3.9.1. Resultados de la administración de los extractos

En el presente estudio se determinó la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico blando de los rizomas de *Campyloneurum amphostenon* a diferentes concentraciones (300mg/kg, 100mg/kg y 25mg/kg), para evaluar esta actividad las diferentes dosis se probaron en ratas albinas (*Rattus norvegicus*) induciendo edema plantar gracias a la acción de la carragenina.

Como droga control se utilizó diclofenaco sódico y un extracto estándar de *Eupatorium glutinosum* (matico) con actividad antiinflamatoria comprobada. (Heras et al, 1998: pp. 161-166).

Los resultados que se muestran a continuación se obtuvieron mediante el programa ImageJ el cuál procesa las imágenes digitales y puede calcular el área de dichas fotografías otorgándonos valores confiables acerca de la inflamación inducida en la pata del animal de experimentación.

**Tabla 13-3:** Resultados de inflamación de los diferentes tratamientos expresados como área de inflamación en cm<sup>2</sup>.

HORAS	PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR TRATAMIENTOS					
	BLANCO	Diclofenaco sódico 100mg/kg	<i>Eupatorium glutinosum</i> 100mg/kg	<i>Campyloneurum amphostenon</i> 300mg/kg	<i>Campyloneurum amphostenon</i> 100mg/kg	<i>Campyloneurum amphostenon</i> 25mg/kg
Patrón	2.3525 ± 0.04	2.4148 ± 0.06	2.4240 ± 0.13	2.4425 ± 0.10	2.4898 ± 0.05	2.4988 ± 0.06
H0	2.3775 ± 0.04	2.4883 ± 0.11	2.4608 ± 0.15	2.5075 ± 0.08	2.5715 ± 0.05	2.5675 ± 0.06
H1	2.4540 ± 0.10	2.5308 ± 0.12	2.5263 ± 0.13	2.5398 ± 0.06	2.6643 ± 0.03	2.6738 ± 0.05
H2	2.5433 ± 0.12	2.6138 ± 0.06	2.6180 ± 0.14	2.6083 ± 0.02	2.7353 ± 0.01	2.7548 ± 0.02
H3	2.5795 ± 0.12	2.6518 ± 0.07	2.6730 ± 0.14	2.6783 ± 0.02	2.7948 ± 0.02	2.8365 ± 0.01
H4	2.6505 ± 0.10	2.6233 ± 0.06	2.6523 ± 0.14	2.6620 ± 0.03	2.7175 ± 0.01	2.7485 ± 0.04
H5	2.6670 ± 0.10	2.5765 ± 0.04	2.6063 ± 0.16	2.6325 ± 0.05	2.6288 ± 0.02	2.6720 ± 0.03
H6	2.6785 ± 0.07	2.5465 ± 0.06	2.5528 ± 0.17	2.5968 ± 0.07	2.5780 ± 0.02	2.5928 ± 0.02
H7	2.7080 ± 0.09	2.4838 ± 0.04	2.5015 ± 0.15	2.5643 ± 0.07	2.5180 ± 0.04	2.5205 ± 0.04

Realizado por: Nancy Vargas, 2017



En la tabla 13-3 se puede apreciar las áreas de inflamación de la pata del animal de experimentación obtenidas en cada tratamiento a siete horas seguidas, el grupo tratado con Diclofenaco sódico (100mg/kg) y el grupo tratado con el extracto de *Campyloneurum amphostenon* (100 mg/kg) presentan una disminución considerable con respecto al Blanco (Carboximetilcelulosa al 10%). En tanto que el extracto estándar (*Eupatorium glutinosum* 100mg/kg) presenta una disminución parecida a la dosis de *Campyloneurum amphostenon* 300 mg/kg, la dosis de 25mg/kg de *Campyloneurum amphostenon*, es el extracto que presenta mayor área de inflamación con respecto a los demás tratamientos administrados.

### 3.9.2. Análisis estadístico

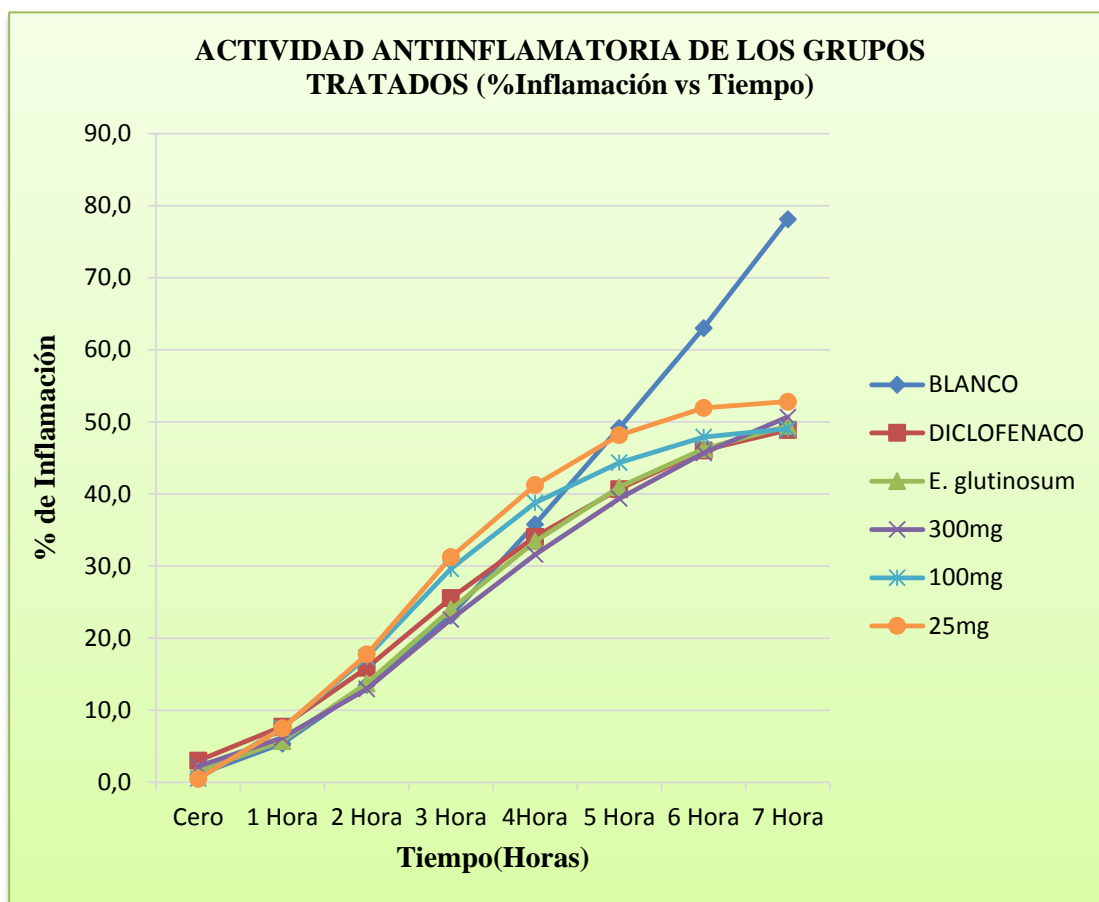
A continuación se muestran los resultados correspondientes al progreso de la inflamación en los animales de experimentación con respecto a los tratamientos administrados: *Campyloneurum amphostenon* (300, 100 y 25 mg/kg), *Eupatorium glutinosum*(100mg/kg), Diclofenaco sódico (100mg/kg) y el blanco, para poder apreciar claramente que tratamiento funciona efectivamente como antiinflamatorio.

**Tabla 14-3:** Resultados de la determinación de la actividad antiinflamatoria expresada en porcentaje de inflamación para cada tratamiento.

% DE INFLAMACIÓN						
	BLANCO	Diclofenaco sódico 100mg/kg	<i>Eupatorium glutinosum</i> 100mg/kg	<i>Campyloneurum amphostenon</i> 300mg/kg	<i>Campyloneurum amphostenon</i> 100mg/kg	<i>Campyloneurum amphostenon</i> 25mg/kg
H0	1.0626± 0.04	3.0031± 0.11	1.5161± 0.15	2.1904± 0.08	0.5121± 0.05	0.4902± 0.06
H1	5.3773± 0.10	7.7426± 0.12	5.7343± 0.13	6.1720± 0.06	7.5208± 0.03	7.4937± 0.05
H2	13.4857± 0.12	15.8733± 0.06	13.7376± 0.14	12.9580± 0.02	17.3813± 0.01	17.7389± 0.02
H3	23.1350± 0.12	25.5567± 0.07	24.0099± 0.14	22.6100± 0.02	29.6315± 0.02	31.2556± 0.01
H4	35.8023± 0.10	34.0756± 0.06	33.4262± 0.14	31.5967± 0.03	38.7790± 0.01	41.2506± 0.04
H5	49.1711± 0.10	40.6844± 0.04	40.9447± 0.16	39.3756± 0.05	44.3619± 0.02	48.1841± 0.03
H6	63.0287± 0.07	46.0674± 0.06	46.2562± 0.17	45.6909± 0.07	47.9064± 0.02	51.9460± 0.02
H7	78.1403± 0.09	48.8866± 0.05	49.4534± 0.15	50.6755± 0.07	49.0411± 0.04	52.8164± 0.04

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

En la tabla 14-3 se da a conocer el porcentaje de inflamación de cada uno de los tratamientos administrados a los animales de experimentación, el comportamiento de cada tratamiento administrado se puede observar claramente en la siguiente figura:



**Gráfica 1-3** Porcentaje de inflamación de cada uno de los tratamientos administrados en las diferentes horas

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

La Gráfica 1-3 ilustra el porcentaje de inflamación alcanzado a lo largo de siete horas, se aprecia como la inflamación va aumentando progresivamente, el tratamiento administrado como Blanco obedece una inflamación progresiva y con tendencia al aumento, mientras que el tratamiento estándar (diclofenaco sódico 100mg/kg) aumenta paulatinamente hasta la cuarta hora, a partir de la quinta hora la inflamación va decreciendo gradualmente y se puede observar que a la séptima hora se presenta una tendencia a formar una ligera curva que expresa la desinflamación. El mismo comportamiento del diclofenaco sódico se puede observar con el tratamiento de *Eupatorium glutinosum* y las dosis de 100mg/kg y 300mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* lo que lleva a concluir que los tratamientos antes mencionados actúan de manera eficaz y similar al fármaco de síntesis utilizado como estándar. La dosis de 25mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* presenta actividad antiinflamatoria pero no es tan eficaz como las dosis de 100mg/kg y 300mg/kg.

Se aplicó el Test ANOVA de un factor para verificar si existe diferencia significativa entre los tratamientos administrados, el cual se muestra a continuación:

**Tabla 15-3:** Análisis estadístico de correlación entre el tiempo y los tratamientos.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
VARIABLE_CERO	Entre grupos	.102	5	.020	2.471	.072
	Dentro de grupos	.148	18	.008		
	Total	.250	23			
VARIABLE_1HORA	Entre grupos	.144	5	.029	3.221	.030*
	Dentro de grupos	.161	18	.009		
	Total	.306	23			
VARIABLE_2HORA	Entre grupos	.131	5	.026	4.489	.008*
	Dentro de grupos	.105	18	.006		
	Total	.237	23			
VARIABLE_3HORA	Entre grupos	.180	5	.036	5.665	.003*
	Dentro de grupos	.114	18	.006		
	Total	.294	23			
VARIABLE_4HORA	Entre grupos	.042	5	.008	1.469	.249
	Dentro de grupos	.103	18	.006		
	Total	.145	23			
VARIABLE_5HORA	Entre grupos	.024	5	.005	.717	.619
	Dentro de grupos	.122	18	.007		
	Total	.146	23			
VARIABLE_6HORA	Entre grupos	.042	5	.008	1.125	.383
	Dentro de grupos	.134	18	.007		
	Total	.176	23			
VARIABLE_7HORA	Entre grupos	.133	5	.027	3.988	.013*
	Dentro de grupos	.120	18	.007		
	Total	.254	23			

\* $p < 0.05$ ; se rechaza  $H_0$

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

La tabla 15-3 indica la aplicación del Test estadístico ANOVA de un factor, el cual establece que existen diferencias significativas con una confiabilidad del 95% entre los tratamientos administrados.

Se observa que  $p < 0,05$  en las horas 1, 2, 3 y 7 por lo que se procede a rechazar la hipótesis nula en estas horas y se concluye que las dosis de cada tratamiento son significativamente diferentes unas de otras, es decir al menos uno de los tratamientos administrados es diferente, por lo que se procedió a realizar el test Tukey B al 95% para establecer entre cuáles de estos tratamientos se exhibe diferencia significativa.

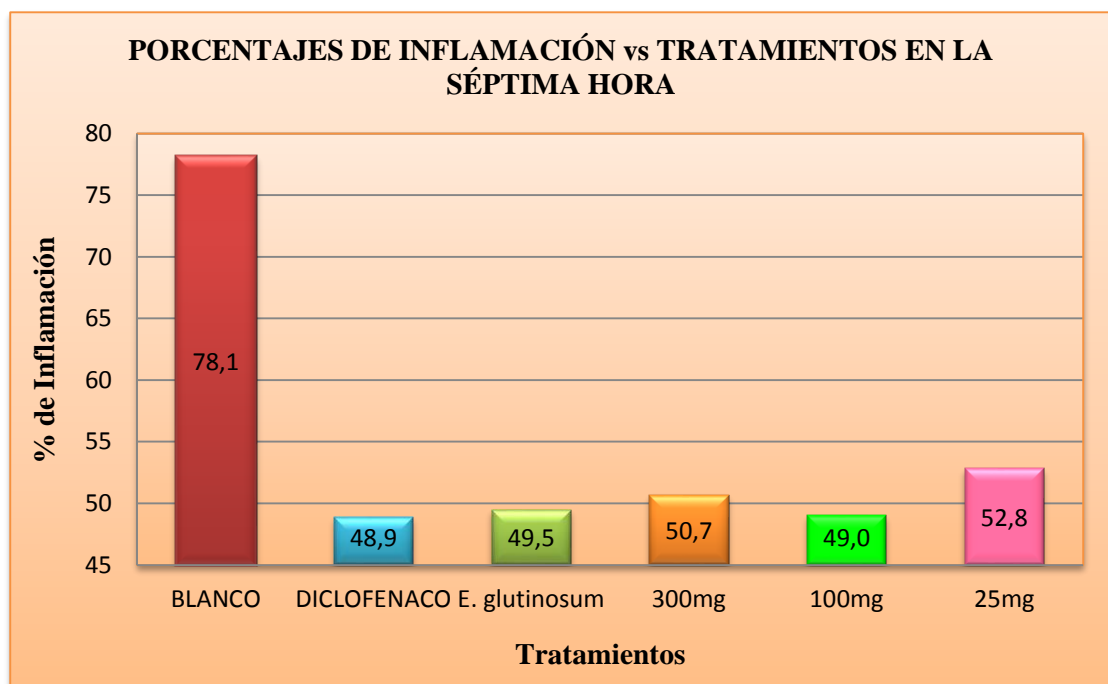
Los resultados se muestran en los Anexos U, V, W y X en los cuáles se aprecia claramente como es la tendencia de la inflamación, en las distintas horas y en cada uno de los tratamientos.

En la primera y segunda hora se determina que existen diferencias significativas entre los tratamientos administrados, existiendo dos subconjuntos homogéneos, las dosis de 100mg/kg y 25mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* pertenecen a un subconjunto homogéneo, siendo éstos los que aumentan sus valores de área de inflamación paulatinamente y no se observa actividad alguna. Los tratamientos de diclofenaco sódico, el extracto estándar de *Eupatorium glutinosum*, la dosis de 300mg/kg del extracto de *Campyloneurum amphostenon* pertenecen a ambos subconjuntos, exhibiendo un ligero decremento de la inflamación.

En la hora 3 se alcanzan valores de inflamación elevados, es decir la respuesta inflamatoria ha llegado a su pico más alto, no se exhiben diferencias que puedan expresar la acción antiinflamatoria de los extractos, existen 3 subconjuntos homogéneos, el primer subconjunto abarca al diclofenaco sódico de 100mg/kg, la dosis de 300mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* y el extracto estándar (*Eupatorium glutinosum*) mismos que poseen un valor de inflamación parecido, en el subconjunto dos se encuentra la dosis de 100mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* y en el subconjunto 3 la dosis de 25mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* lo que quiere decir que cada tratamiento es diferente uno del otro exhibiendo áreas de inflamación distintas.

Para la séptima hora se visualiza que existe diferencia significativa entre los tratamientos administrados, se establece que existen dos subconjuntos homogéneos, en el primer grupo se muestra que los tratamientos de diclofenaco sódico, el extracto estándar de *Eupatorium glutinosum*, y las dosis de 25mg/kg y 100mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* pertenecen a un mismo subconjunto homogéneo lo que quiere decir que todos actúan inhibiendo la inflamación, también la dosis de 300mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* actúa en menor grado como antiinflamatorio. Según la media de los grupos obtenidos indica que la dosis de 100mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* presenta una actividad similar al fármaco de síntesis diclofenaco sódico (100mg/kg).

Para apreciar claramente cuál de los tratamientos administrados fue el que presentó un porcentaje de inflamación más cercano al estándar comercial (diclofenaco sódico), se presenta a continuación una figura que simboliza el porcentaje de inflamación final:



**Gráfica 2-3** Porcentajes de inflamación de cada uno de los tratamientos a la séptima hora.

Realizado por: Nancy Vargas, 2017

En la Gráfica 2-3 se observa la acción antiinflamatoria de cada uno de los tratamientos administrados mediante la expresión del porcentaje de inflamación, la gráfica indica que el estándar comercial (diclofenco sódico 100mg/kg) exhibe un porcentaje de inflamación de 48.9%, muy seguido del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon* de 100mg/kg con un 49.0% y del extracto estándar (*Eupatorium glutinosum* 100mg/kg) que muestra un porcentaje de inflamación de 49.5%, estos resultados aseveran que los extractos de *Campyloneurum amphostenon* y *Eupatorium glutinosum* tienen acción similar al fármaco de síntesis utilizado como estándar, por lo que se asegura que a una dosis de 100mg/kg *Campyloneurum amphostenon* muestra una acción antiinflamatoria emparentada con un fármaco de síntesis, además esta dosis superó la acción antiinflamatoria del extracto estándar de *Eupatorium glutinosum* que ya tiene antecedentes de ser un antiinflamatorio con actividad media.

Gracias a los diferentes tests estadísticos utilizados se ha podido determinar la acción antiinflamatoria del extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon* obteniendo como resultado final que el fármaco de síntesis utilizado como estándar (diclofenaco sódico) presenta un valor de inflamación menor con respecto a los demás tratamientos administrados, muy seguido se encuentra la dosis de 100mg/kg de *Campyloneurum amphostenon* el cuál superó al extracto estándar de *Eupatorium glutinosum* que ya tiene antecedentes de ser un antiinflamatorio con actividad media.

Se debe recordar que en el extracto de *Campyloneurum amphostenon* mediante el control de calidad, en el screening fitoquímico se identificó gran cantidad de compuestos fenólicos y terpénicos, éstos en una dosis equilibrada (100mg/kg) ejercieron una acción terapéutica favorable, pero en la dosis de 300mg/kg se intuye que al existir mayor cantidad de compuestos pudieron ejercer una interacción que impidió a su vez que el extracto cumpla su rol terapéutico a cabalidad.

Gracias a los estudios antiinflamatorios previos realizados en distintas especies de la familia *Polypodiaceae* se confirma que la especie de *C. amphostenon* posee una actividad antiinflamatoria que le es otorgado a diversas especies emparentadas con aquella, tales como: *Polypodium leucotomos* (extracto metanólico) que inhibe la activación de NF- $\kappa$ B (factor de necrosis tumoral) inducida por agentes inflamatorios (forbol y lipopolisacárido) (Manna et al., 2003a: pp.171-180), *Polypodium feei* que posee actividad analgésica y antiinflamatoria gracias a la inhibición selectiva que ejerce la proantocianidina sellegueain A (compuesto aislado de *P. feei*) en la síntesis de prostaglandinas (Subarnas et al., 2000b: pp. 401-405), *P. leucotomos* activa el gen p53

y reduce la inflamación aguda por inhibición selectiva de la Cox-2. (Zattra et al., 2009: pp. 1952-1961), por lo que se asevera que *C. amphostenon* especie perteneciente a la familia *Polypodiaceae* ejerce de manera efectiva su rol terapéutico antiinflamatorio.

## CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto estandarizado de *Campyloneurum amphostenon* evaluando la calidad de la materia prima, siendo sus resultados aceptados por la Real Farmacopea Española y a la vez estableciendo que la droga vegetal es de calidad.
- Mediante cromatografía en capa fina (CCF) se identificó los posibles compuestos presentes en el extracto etanólico de *C. amphostenon* siendo éstos: Kaempferol o sus glucósidos como único compuesto flavonoide identificado y  $\beta$ -sitosterol y campesterol los compuestos terpénicos identificados.
- Se cuantificó el contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon* mediante espectrofotometría UV; obteniendo como resultado 66,832 mgEQ de ácido gálico/mL y 9,240 mgEQ de quercetina/mL para fenoles y flavonoides totales respectivamente, como ensayo adicional se realizó la capacidad captadora de radicales libres *in vitro* por el método DPPH<sup>•</sup>, en el cual se obtuvo un valor de 95,889  $\mu$ g/mL de CIM, por lo que se concluye que los resultados de las cuantificaciones mostraron inter-relaciones entre la concentración de fenoles y flavonoides totales obtenidos con la actividad antioxidante.
- Se determinó la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon* a tres niveles de concentración: 300 mg/kg, 100 mg/kg y 25 mg/kg mediante el modelo de edema plantar inducido por carragenina en *Rattus norvegicus*, utilizando como estándar diclofenaco sódico. La concentración de 100 mg/kg mostró una actividad antiinflamatoria parecida al diclofenaco sódico, exhibiendo un mayor efecto con respecto a las concentraciones de 25 mg/kg y 300 mg/kg.



## RECOMENDACIONES

- Ampliar la investigación tomando como base otros modelos de inflamación, con el objetivo de elucidar los mecanismos moleculares de actuación de los componentes presentes en el extracto de *Campyloneurum amphostenon* y establecer la dosis efectiva de administración.
- Realizar estudios toxicológicos de *Campyloneurum amphostenon* para encaminar la investigación hacia la creación de un fitofármaco.
- Realizar una forma farmacéutica, de preferencia tópica, para evitar posibles daños gastrointestinales causados por el extracto de *Campyloneurum amphostenon*, además para potenciar su actividad y utilizarlo a nivel local.
- Continuar con investigaciones sobre otras actividades biológicas, como fotoprotectora y anticancerígena, ya que a varias especies emparentadas con *Campyloneurum amphostenon* se les atribuye este tipo de actividades.

## BIBLIOGRAFÍA

- ARIAS, Jaime; et al.** *Fisiopatología quirúrgica*. Madrid, España: Tébar, 1999, pp. 287-297.
- ARAI, Y; et al.** “Fern Constituents: Triterpenoids isolated from *Polypodium Vulgare*, *P. Fauriei* and *P. Virginianum*”. *Phytochemistry*, vol. 30, n° 10 (1991), (Japón) pp. 3369-3377.
- BAGNIEWSKA, A; et al.** “Phenolic compound localisation in *Polypodium vulgare* L. rhizomes after mannitol-induced dehydration and controlled desiccation”. *BIOTIC AND ABIOTIC STRESS*, vol. 27 (2008), (Polonia) pp. 1251-1259.
- BARASSI, N.; BENAVIDES, F.; CECCARELLI, A.** “Ética en el uso de Animales de Experimentación”. *Revista Medicina*, vol. 56, n° 5/1 (1996), (Argentina) pp. 531-532.
- BETÉS, M.; et al.** *Farmacología para fisioterapeutas*. 1° Edición. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, 2008, pp. 130-131.
- BOUKHRIS, M.; et al.** “Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, *Pelargonium graveolens*”. *Phytotherapy Research*, vol. 10, n° 1002 (2012), (Reino Unido) pp. 1-8.
- BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA.** *Farmacopea Brasileira*. 5° Edición. Brasilia, Brasil: Fundación Oswaldo Cruz, 2010, p. 43.
- CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A.** “Plantas Medicinales y Fitoterapia: Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?”. *Acta Farm. Bonaerense*, vol. 22, n° 3 (2003), (España) pp. 265-276.

**CAPÓ, M.** *Aplicación de la bioética al bienestar y al derecho de los animales*. 1º Edición. Madrid, España: editorial Complutense S.A., 2005, pp. 28-29.

**CASAPÍA.** *Calaguala (Polypodium Calaguala)* [en línea]. España: 2011. [Consulta: 03 enero 2017]. Disponible en: <http://www.casapia.com/Paginacast/Paginas/Paginasdemenus/MenudeInformaciones/PlantasMedicinales/Calaguala.htm>

**CUELLAR, A.; MIRANDA, M.** *Farmacognosia y productos naturales*. 2º Edición. La Habana, Cuba: Editorial Félix Varela, 2001., pp. 107- 113.

**DE AHUMADA, J. Ignacio; et al.** *Farmacología práctica para las diplomaturas en Ciencias de la Salud*. 1º Edición. Madrid, España: Díaz de Santos, S.A., 2002, pp. 136-137.

**DE LA TORRE, L.; et al.** *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Primera Edición. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito, Ecuador: 2008, pp. 1-3.

**DUARTE, J.; et al.** “Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. Aspectos fisiopatológicos”. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva* [en línea], 2009, (México) 23(4), pp. 226. [Consulta: 30 diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medcri/ti-2009/ti094g.pdf>

**ECUADOR. SENPLADES.** *Objetivos Nacionales para el Buen Vivir* [en línea]. Quito: SENPLADES, 2013. [Consulta: 15 enero 2017]. Disponible en: <http://www.buenvivir.gob.ec/objetivos-nacionales-para-el-buen-vivir>

**FARMACOPEA FRANCESA.** 10<sup>ma</sup> ed. París: Moulins-Lés-Metz: L'Adrapharm/Moissonneuve, 1989.

- GARCÍA, L.; et al.** “Plantas con propiedades antiinflamatorias”. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*[en línea], 2002, (Cuba) vol. 21 (n° 3), pp. 214-216. [Consulta: 03 enero 2017]. ISSN 1561-3011. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002002000300012&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002002000300012&script=sci_arttext&tlng=pt)
- GARCÍA, P.** “Inflamación”. *Revista.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.* [en línea], 2008, (España), 102 (1), pp. 91. [Consulta: 30 diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>
- GENNARO, Alfonso.** *Remington: The science and practice of pharmacy.* 20° Edición. Philadelphia, USA: Editorial Médica Panamericana S.A., 2000, pp.873
- GOMES, A.; et al.** “Anti-inflammatory, anti-angiogenic and antioxidant activities of polysaccharide-rich extract from fungi *Caripia montagnei*”. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, n° 175 (2013), (Brasil) pp. 1-9.
- GONZÁLEZ, R.; et al.** *El proceso inflamatorio* [en línea]. [Consulta: 31 diciembre 2016]. Disponible en: <https://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>
- GUDIÉL, L.** Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante de *Polypodium triseriale* SW (calahuala) (Tesis) (Grado) [En línea] Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 2009. pp. 50-61. [Consulta: 01 febrero 2017]. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2846.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2846.pdf)
- HERAS, B.; et al.** “Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Ethnopharmacology*, vol. 61 (1998), (Ecuador) pp. 161-166.
- HORVATH, A.; et al.** “Metabolic Effects of Calagualine, an Antitumoral Saponine of *Polypodium leucotomos*”. *Nature*, vol. 214, n° 17(1967), (Honduras) pp. 1256-1258.

**LEÓN, B.** *Campyloneurum amphostenon (Kunze ex Klotzsch) Fée*[en línea]. USA: Flora Mesoamericana, 2016. [Consulta: 03 enero 2017]. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/26607073?projectid=3>

**LEÓN, M.; et al.** “Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares”. *Revista Finlay* [en línea], 2015, (Cuba) 5(1), pp. 47-62. [Consulta: 30 diciembre 2016]. ISSN 2221-2434. Disponible en: <http://www.revfinlay.sld.cu/index.php/finlay/article/view/329/1381>

**LIU, B.; et al.** “Quantitative determination of anti-inflammatory principles in some *Polypodium* species as a basis for standardization”. *Phytomedicine*, vol.5, n°3 (1998), (Suecia) pp.187-194.

**LORENZO, P.; et al.** *Velásquez. Farmacología Básica y Clínica*. 18° Edición. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, 2008, pp. 518-527.

**MANNA, Sunil K.; et al.** “Calagualine inhibits nuclear transcription factors-kB activated by various inflammatory and tumor promoting agents”. *Cancer Letters*, vol. 190 (2003), (USA) pp. 171-180.

**MARTÍNEZ, M.** *Farmacognosia y Química de los Productos Naturales*. La Habana, Cuba: Editorial Félix Varela, 2001, pp. 170-171.

**MENDOZA, N.** *Farmacología Médica*. México D.F., México: Editorial Médica Panamericana, 2008, pp. 290-296.

**MONTERO, T.; HURTADO, J.; CABRERA, P.** “Daño múltiple de órganos: Morfología de la respuesta inflamatoria sistémica”. *Revista Cubana de Medicina Militar*[en línea], 2001, (Cuba) 30(5), pp.79. [Consulta: 30 diciembre 2016]. ISSN 1561-3046. Disponible en:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572001000500013](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572001000500013)

**NORMA RAMAL DE SALUD PÚBLICA (NRSP) 309-312.** *Métodos de Ensayo de droga Cruda.* La Habana, Cuba: MINSAP, 1991.

**ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** *Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales* [en línea]. GINEBRA: Ms Daniela Bagozzi, 2004. [Consulta: 03 enero 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>

**OROZCO, R.** Caracterización Química y Análisis del Contenido Mineral de *Smilax domingensis* y *Phlebodium pseudoaureum* (Tesis) (Grado) [En línea] Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Química. Guatemala. 2010. pp. 19-22. [Consulta: 01 febrero 2017]. Disponible en: <http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt%202006.50.pdf>

**ORTIZ, V.; et al.** “Antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol en el tratamiento del dolor”. *Gac Med Bilbao*, vol. 104 (2007), (España) pp. 148-149.

**PEASTON, R.; WEINKOVE, C.** “Determinación de catecolaminas y sus metabolitos”. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* [en línea], 2004, (Cuba) 38 (2), pp. 17-38. [Consulta: 30 enero 2017]. ISSN 0325-2957. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-29572004000200014](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572004000200014)

**PEÑA, J.** *Inflamación* [en línea]. Argentina: A. Celada, 2014. [Consulta: 30 diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.inmunologiaenlinea.es/index.php/16>

**PORTILLO, P.; MENDOZA, M.** “Extracto purificado de calaguala en el tratamiento de la psoriasis en comparación con placebo, en un ensayo clínico controlado a doble ciego”. *Revista Médica Honduras*, vol. 5, n° 19 (1985), (Honduras) pp. 10-16.

**QUEZADA, A.** *Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies.* 1° Edición. Mérida, Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán, 1997, p.10.

**RAMKUMAR, K.; et al.** “In vivo anti-inflammatory potential of various extracts of *Sida tiagii* Bhandari”. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, (2012), (India) pp. 947-952.

**RASHID, M.; et al.** “Characterization and antioxidant assay of new flavone isolated from *Acacia Nilotica* Fruit”. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, n°3 (2015), (Bangladés) pp. 103-110.

**REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA.** Segunda Edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002. p. 2801.

**REIXACH, N.; et al.** “Biosynthesis of ecdysteroids in vitro prothalli cultures of *Polypodium Vulgare*”. *Phytochemistry*, vol. 43, n° 3 (1996), (España) pp. 597-602.

**RODRÍGUEZ, E.; VALDÉS, L.** *Consumo de Antiinflamatorios No Esteroideos. Hospital “Manuel Fajardo”; 2012-2013* [en línea]. La Habana: A. Peña Velásquez, 2014. [Consulta: 03marzo 2017]. Disponible en: [http://uvsfajardo.sld.cu/sites/uvsfajardo.sld.cu/files/consumo\\_de\\_antiinflamatorios.pdf](http://uvsfajardo.sld.cu/sites/uvsfajardo.sld.cu/files/consumo_de_antiinflamatorios.pdf)

**SALAZAR, S.; et al.** “Frecuencia de consumo de Aines en los pacientes con hemorragia digestiva superior no variceal”. *Gen* [en línea], 2009, (Venezuela) vol.63, (n°1), pp. 47-50. [Consulta: 03 enero 2017]. ISSN 2477-975X. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0016-35032009000100009](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032009000100009)

**SANGEETA, S.; RENU, S.** “Quantitative estimation of phytosterol from two medicinally important plants of cucurbitaceae”. *International Journal of Engineering Research and Science &Technology* [en línea], 2014, vol. 3 (n° 2), pp. 100-104. [Consulta: 29 enero 2017].ISSN 2319-5991. Disponible en: <http://www.ijerst.com/currentissue.php>

**SAUDY, P.** Separación y evaluación del efecto antiinflamatorio y antioxidante de los flavonoides de *Eysenhardtia polystachya* (Ort.) Sarg. (Tesis) (Maestría). [En línea] Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional De Ciencias Biológicas. México D.F.

2011. pp. 64-78 [Consulta: 01 febrero 2017]. Disponible en:  
<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8914?show=full>

**SEEDI, H.; et al.** “Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae)”.  
*Journal of ETHNOPHARMACOLOGY*, n° 81 (2002), (Egipto) pp. 293-296

**SHAO, H.; LEAN, T.** “Quantification of polyphenolic content and bioactive constituents of some commercial rice varieties in Taiwan”. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 26 (2012), (Taiwán) pp. 122-127.

**SHARAPIN, Nikolai; et al.** *Fundamentos de tecnologia de productos terapéuticos*. 1° Edición. Bogotá, Colombia: 2000, pp. 37-54.

**SUBARNAS, A.; WAGNER, H.** “Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shellegueain A from *Polypodium feei* METT”. *Phytomedicine*, vol. 7, n° 5 (2000), (Indonesia) pp. 401-405.

**SUNDUE, M.; et al.** “Global phylogeny and biogeography of grammitid ferns (Polypodiaceae)”. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 14 (2014), (U.S.A.) pp. 4-7.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.** *Campyloneurum amphostenon* (Kunze ex Klotzsch) Fée –*Polypodiaceae*[en línea]. Colombia: Instituto de Ciencias Naturales (ICN), 2016. [Consulta: 03 enero 2017]. Disponible en:  
<http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/278541/>

**VIDARI, G.; et al.** “Phytochemical studies of Ecuadorian plants”. *Virtual Activity, Real Pharmacology-Different Approaches to the Search for Bioactive Natural Compounds*, vol. 17, n°6 (1997), (Italia) p.233.

**WAGNER, H.; BLADT S.** *Plant drug analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Segunda Edición. Universidad de Múnich, Múnich, Alemania: 2001, pp. 1-326.



**WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G.** “Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs”. *Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 111 (1962), (U.S.A.) pp. 544-547.

**YAO, H.; DUAN, J.; AI, F.; LI, Y.** “Chemical constituents from a Chinese fern *Polypodium hastatum* Thunb”. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 44 (2012), (China) pp. 275-278.

**ZATTRA, E.; et al.** “*Polypodium leucotomos* Extract Decreases UV-Induced Cox-2 Expression and Inflammation, Enhances DNA Repair, and Decreases Mutagenesis in Hairless Mice”. *The American Journal of Pathology*, vol. 175, n° 5 (2009), (U.S.A.) pp. 1952-1961.

**ZULETA, E.** Perfil fitoquímico de *Phlebodium pseudoaureum* (Cav.) Lellinger proveniente de 5 regiones de Guatemala (Tesis) (Grado) [En línea] Universidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 2005. pp. 24-33. [Consulta: 03 febrero 2017]. Disponible en: [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2375.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2375.pdf)

**ÖZTÜRK, M.; et al.** “Antioxidant and anticholinesterase active constituents from *Micromeria cilicica* by radical-scavenging activity-guided fractionation”. *Food Chemistry*, vol. 126 (2010), (Turquía) pp. 31-38

## ANEXOS

### ANEXO A: Identificación taxonómica de los rizomas *Campyloneurum amphostenon*



**HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)**  
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL CHIMBORAZO  
Panamericana sur Km 1, fono: (03) 2 998-200 ext. 700123, jcaranqui@yahoo.com  
Riobamba Ecuador

Ofc.No.015.CHEP.2016

Riobamba, 21 de junio del 2016

Ing. Marcelo Pino  
DIRECTOR PROVINCIA MAE- CHIMBORAZO

De mis consideraciones:

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente informo que bajo la responsabilidad del Srta. Nancy Alexandra Vargas Maji con CI: 0604050542, cuyo tema es " Determinación de la actividad anti-inflamatoria del extracto de la especie *Campyloneurum amphostenon* (Kunze)Fee, conocida como "Calahuala", revizando en los registros en el herbario, comunico que es una planta bien colectada y con amplia distribución, de tal manera que la especie no vá ha ser ingresada a la colección del herbario.

Anticipando mis agradecimientos por la atención a la presente

Me despido  
Atte.

  
Ing. Jorge Caranqui  
HERBARIO ESPOCH



HERBARIO POLITECNICO  
FACULTAD DE  
RECURSOS  
NATURALES

**ANEXO B:** Materia prima *Campyloneurum amphostenon*



**ANEXO C:** Maceración y Sonicación del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon*



**ANEXO D:** Concentración del extracto etanólico de *Campyloneurum amphostenon*



**ANEXO E:** Obtención de extracto etanólico blando de *Campyloneurum amphostenon*



**ANEXO F: Control de Calidad del material vegetal**



**ANEXO G: Tamizaje Fitoquímico**



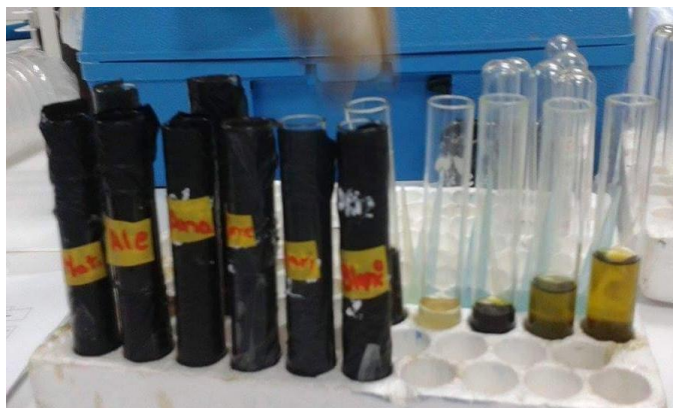
**ANEXO H:** Cromatografía en Capa Fina de *Campyloneurum amphostenon*



**ANEXO I:** Flavonoides y terpenos presentes en *Campyloneurum amphostenon*



**ANEXO J:** Cuantificación espectrofotométrica de flavonoides y fenoles totales de *Campyloneurum amphostenon*



**ANEXO K:** Preparación del reactivo de Folin- Ciocalteu



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



**ANEXO M: Ambientación de los animales de experimentación**

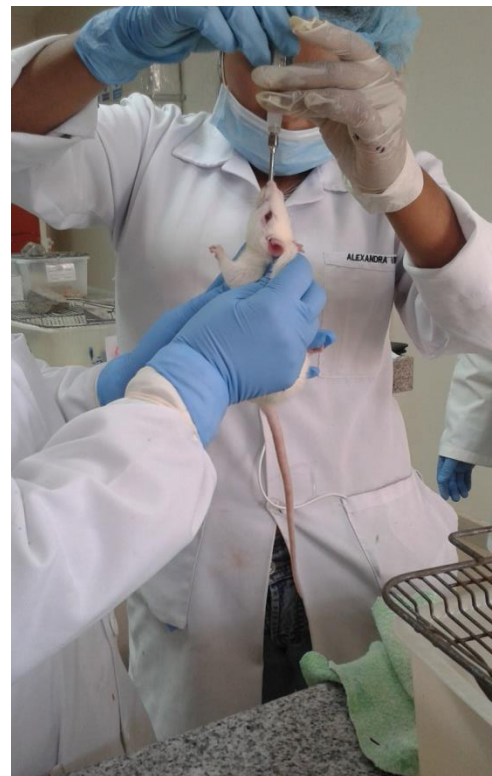




**ANEXO N:** Preparación de las suspensiones de *C. amphostenon* a administrar



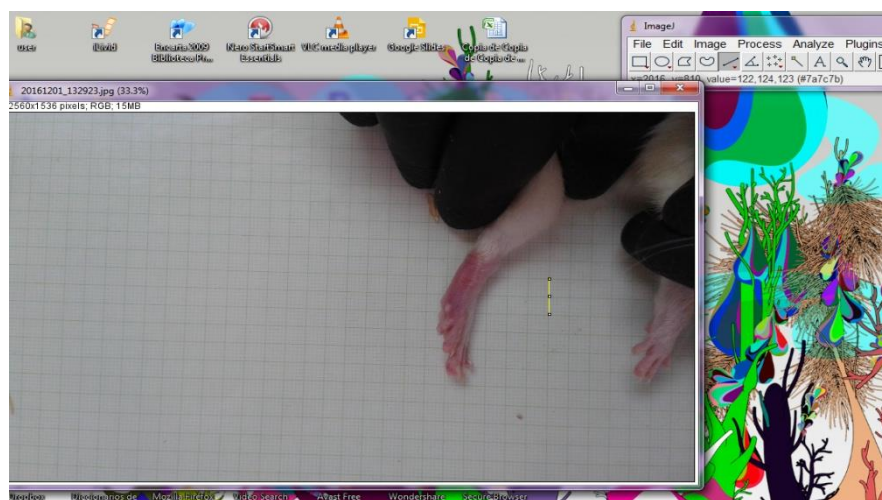
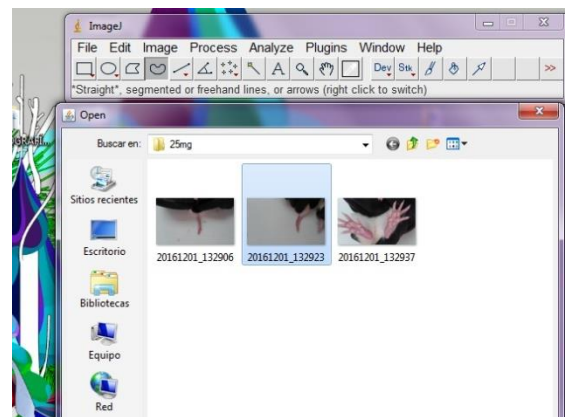
**ANEXO O:** Administración intragástrica de las suspensiones de *C. amphostenon*

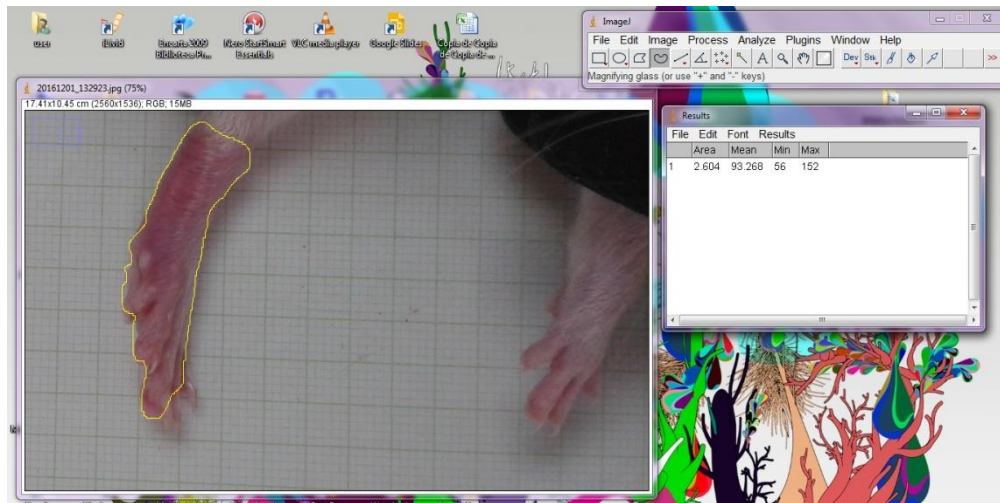
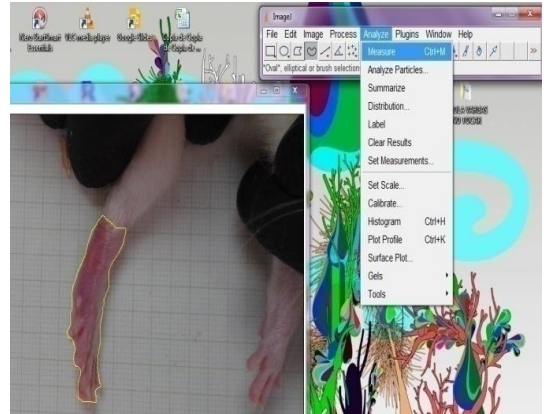
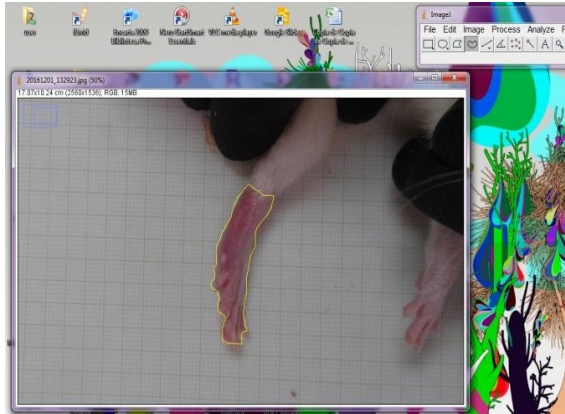
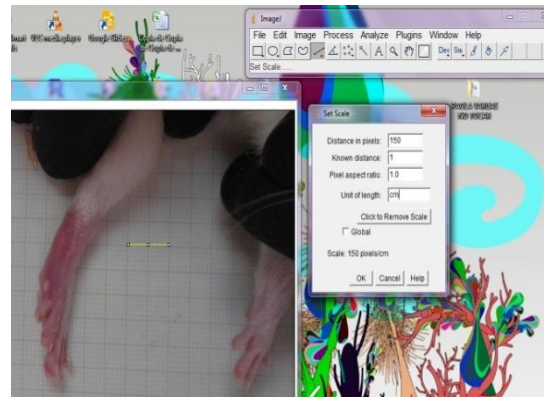
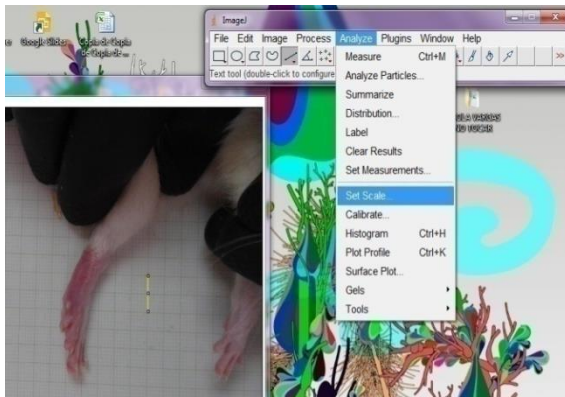


## ANEXO P: Inducción del edema plantar con carragenina al 1%

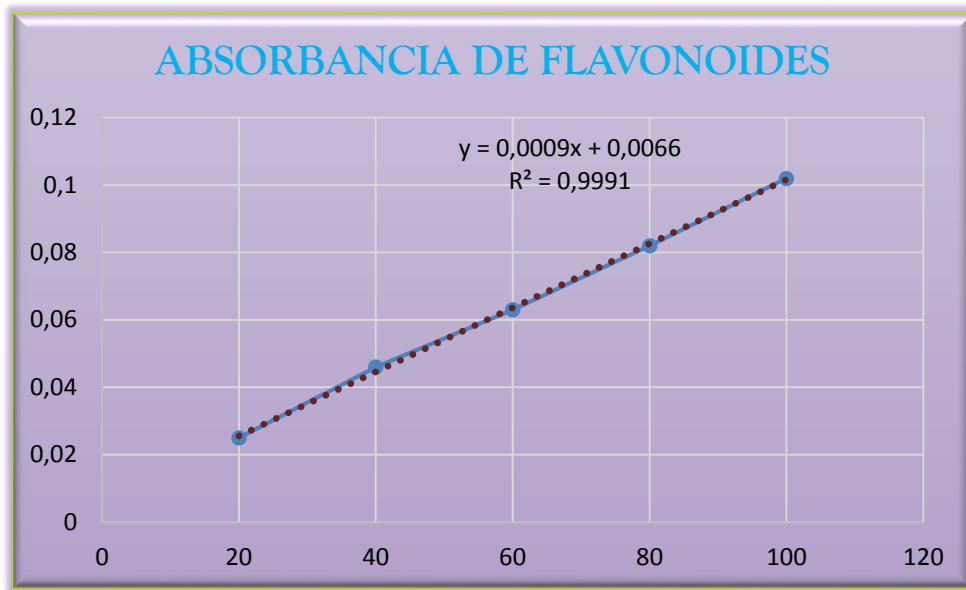


## ANEXO Q: Mediciones del área de la pata inflamada

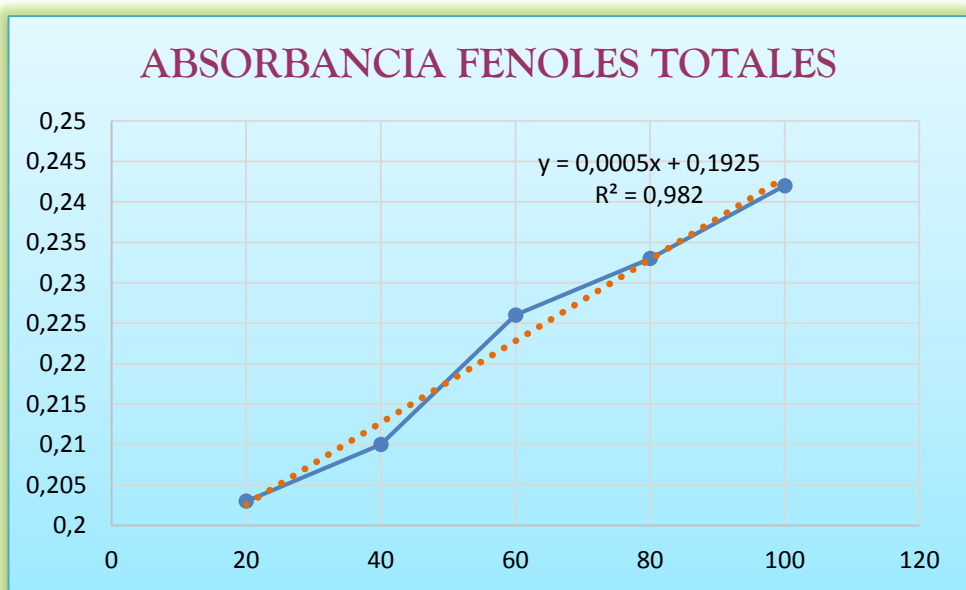




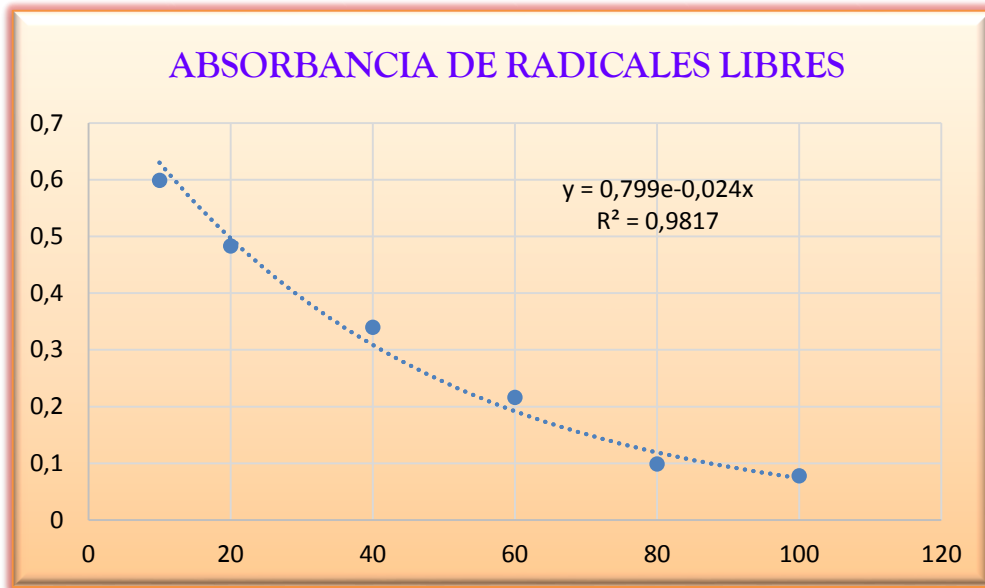
**ANEXO R:** Curva de calibración para Quercetina usada en la cuantificación de flavonoides.



**ANEXO S:** Curva de calibración para Ácido Gálico usada en la cuantificación de fenoles.



**ANEXO T:** Curva de calibración para Ácido Gálico usada en la Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH\*



**ANEXO U:** Prueba post HOC: basado en la prueba de Tukey B para la primera hora

<b>VARIABLE_1HORA</b>				
			Subconjunto para alfa = 0.05	
	Dosis_extracto	N	1	2
Tukey B <sup>a</sup>	Blanco	4	2,45400	
	Diclofenaco100mg	4	2,53075	2,53075
	300mg	4	2,53975	2,53975
	Matico100mg	4	2,54625	2,54625
	100mg	4		2,66425
	25mg	4		2,67375
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.				

**ANEXO V: Prueba post HOC: basado en la prueba de Tukey B para la segunda hora**

<b>VARIABLE_2HORA</b>				
			Subconjunto para alfa = 0.05	
	Dosis_extracto	N	1	2
Tukey B <sup>a</sup>	Blanco	4	2,54325	
	300mg	4	2,60825	2,60825
	Diclofenaco100mg	4	2,61375	2,61375
	Matico100mg	4	2,66550	2,66550
	100mg	4		2,73525
	25mg	4		2,75475
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.				

**ANEXO W: Prueba post HOC: basado en la prueba de Tukey B para la tercera hora**

<b>VARIABLE_3HORA</b>					
			Subconjunto para alfa = 0.05		
	Dosis_extracto	N	1	2	3
Tukey B <sup>a</sup>	Blanco	4	2,57950		
	Diclofenaco100mg	4	2,65175	2,65175	
	300mg	4	2,67825	2,67825	2,67825
	Matico100mg	4	2,72975	2,72975	2,72975
	100mg	4		2,79475	2,79475
	25mg	4			2,83650
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.					

**ANEXO X: Prueba post HOC: basado en la prueba de Tukey B para la séptima hora**

<b>VARIABLE_7HORA</b>				
	Dosis_extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Tukey B <sup>a</sup>	Diclofenaco100mg	4	2,48375	
	Matico100mg	4	2,50675	
	100mg	4	2,51800	
	25mg	4	2,52050	
	300mg	4	2,56425	2,56425
	Blanco	4		2,70800
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4.000.				

**ANEXO Y: Volumen de dosificación de los diferentes tratamientos**

CAJAS		COLORES	PESO	VOLUMEN	V ADMINIS.	300 mg (g/ml)	100 mg (g/ml)	25 mg (g/ml)
1A	blanco	VERDE	191	19,100	0,05892	0,05730	0,01910	0,00478
1A	diclofenaco	CAFE	192,4	19,240	0,05936	0,05772	0,01924	0,00481
1A	matico	NARANJA	195	19,500	0,06016	0,05850	0,01950	0,00488
1E	<i>C. amphostenon</i>	AMARILO	185,7	18,570	0,05729	0,05571	0,01857	0,00464
1E	<i>C. amphostenon</i>	CAFE	181,3	18,130	0,05593	0,05439	0,01813	0,00453
1E	<i>C. amphostenon</i>	NARANJA	192,6	19,260	0,05942	0,05778	0,01926	0,00482
2A	blanco	AMARILLO	198,3	19,830	0,061	0,059	0,020	0,005
2A	diclofenaco	ROSADO	201,5	20,150	0,062	0,060	0,020	0,005
2A	MATICO	AZUL	203,9	20,390	0,063	0,06117	0,02039	0,00510
2E	<i>C. amphostenon</i>	VERDE	202,3	20,230	0,062	0,06069	0,02023	0,00506
2E	<i>C. amphostenon</i>	NARANJA	196,5	19,650	0,061	0,05895	0,01965	0,00491
2E	<i>C. amphostenon</i>	CAFÉ	197,7	19,770	0,061	0,05931	0,01977	0,00494
3A	blanco	AMARILLO	215,2	21,520	0,066	0,065	0,022	0,005
3A	diclofenaco	VERDE	207,8	20,780	0,064	0,062	0,021	0,005
3A	matico	ROJO	219,3	21,930	0,068	0,066	0,022	0,005
3E	<i>C. amphostenon</i>	VERDE	214,6	21,460	0,066	0,064	0,021	0,005
3E	<i>C. amphostenon</i>	ROJO	220,9	22,090	0,068	0,066	0,022	0,006
3E	<i>C. amphostenon</i>	AZUL	207,6	20,760	0,064	0,062	0,021	0,005
4A	blanco	ROJO	223,7	22,370	0,069	0,067	0,022	0,006
4A	diclofenaco	AZUL	223,8	22,380	0,069	0,067	0,022	0,006
4A	matico	CAFÉ	243	24,300	0,075	0,073	0,024	0,006
4E	<i>C. amphostenon</i>	NARANJA	221,9	22,190	0,068	0,067	0,022	0,006
4E	<i>C. amphostenon</i>	AMARILLO	225,7	22,570	0,070	0,068	0,023	0,006
4E	<i>C. amphostenon</i>	VERDE	240,1	24,010	0,074	0,072	0,024	0,006