



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA
DE LA PLANTA *Clinopodium tomentosum* 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: XIMENA CATALINA CULQUI GUAMAN

TUTORA: DRA. SUSANA ABDO LÓPEZ, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, XIMENA CATALINA CULQUI GUAMAN

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 LA PLANTA *Clinopodium tomentosum* MEDIANTE INHIBICIÓN DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARAGENINA EN RATAS *Rattus norvegicus*” de responsabilidad de la señorita egresada Ximena Catalina Culqui Guaman, 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 Vinuesa Tapia

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

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

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

Riobamba, 19 de Abril del 2017

XIMENA CATALINA CULQUI GUAMAN

1804323572

DEDICATORIA

A Dios que me ha dado la vida y ha puesto en mí la fuerza y sabiduría para no dejarme caer ante las adversidades.

A mi madre, el pilar de mi vida la persona que desde que me trajo al mundo ha luchado de manera incansable para hacer de mí la mujer que ahora soy.

A mi padre, que siempre me ha brindado su apoyo de una u otra manera y su cariño con el fin de que yo cumpla mi meta.

A mis hermanos, que por ellos sigo adelante para poder ser la guía en todas las decisiones y dudas que necesitan

A mi nueva familia Johana y mi hermosa sobrina Celeste quienes en un poco tiempo de compartir con ellas se han ganado mi cariño y confianza.

A mi novio quien supo apoyarme en todo momento pese a todos los obstáculos encontrados en esta etapa de mi vida

A mis abuelitos que se encuentran en el cielo Mamita María y Papito Lucho, que gracias a sus oraciones sé que me han guiado y protegido para culminar mis estudios

A mi familia, especialmente a mis primos quienes con sus palabras de aliento han ayudado a que siga escalando peldaños.

A mis amigas, mi segunda familia con quienes he vivido momentos increíbles durante este tiempo.

Ximena

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios, por cuidarme, protegerme durante todo este camino, así también darme la fuerza y sabiduría para superar los problemas y obstáculos que se me han presentado a lo largo de mi trayectoria por obtener mi título profesional; por sus bendiciones y por la vida misma que me ha otorgado.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por permitir que dentro de sus aulas mis maestros supieran impartir sus conocimientos, para una excelente formación académica

Agradezco de todo corazón a mi tutora de Tesis Dra. Susana Abdo por confiar en mí y tener mucha paciencia y así permitirme ser parte de su investigación; al BQF. Diego Vinueza por el apoyo brindado a lo largo del desarrollo de este trabajo porque ha sabido ser un excelente guía profesional

El más fiel agradecimiento a mis padres, quienes son unos grandes luchadores que con esfuerzo y sin reniegos supieron guiarme por el mejor de los caminos, estando presentes en cada uno de mis logros, siempre apoyándome con paciencia y amor, secando mis lágrimas, y evitando que caiga en el conformismo, haciendo de mí una mujer con valores y responsable; haciéndome ver mis faltas y corrigiéndolas.

A mis hermanos quienes me han brindado su compañía, su apoyo y sus ganas de escucharme y su interés por cada una de mis actividades

A mi novio por ser la persona que me ha sabido comprender durante tantos años, quien ha soportado a mi lado problemas, malos ratos y ha sabido celebrar conmigo cada uno de mis logros y derrotas.

A mis amigas que hasta el día de hoy han sido las personas que a pesar de las dificultades y los problemas, siempre están ávidos por tender una mano.

Ximena

INDICE

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
INDICE DE GRÁFICAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
RESUMEN	xvi
SUMMARY	xvii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEORICO	4
1.1. Actividad antiinflamatoria	4
<i>1.1.1. Inflamación</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. Finalidad de la inflamación</i>	<i>5</i>
<i>1.1.3. Componentes</i>	<i>5</i>
<i>1.1.4. Factores causales</i>	<i>6</i>
<i>1.1.5. Signos característicos de la inflamación</i>	<i>6</i>
<i>1.1.6. Clasificación de la inflamación</i>	<i>7</i>
<i>1.1.7. Mediadores de la inflamación</i>	<i>8</i>
<i>1.1.8. Fases de la inflamación</i>	<i>10</i>
1.2. Antiinflamatorios no esteroides (AINES).....	11
<i>1.2.1. Clasificación</i>	<i>11</i>
<i>1.2.2. Mecanismo de acción</i>	<i>12</i>
1.3. Diclofenaco sódico	14
1.4. Biodiversidad en el Ecuador.....	16
CAPÍTULO II	
2. METODOLOGÍA	21
2.1 Lugar de investigación	21

2.2	Recolección del material vegetal	21
2.3.	Reactivos biológicos	21
2.3.1.	<i>Descripción</i>	21
2.3.2.	<i>Condiciones Ambientales</i>	22
2.4.	Equipos y reactivos	22
2.4.1.	<i>Equipos</i>	22
2.4.2.	<i>Materiales</i>	23
2.4.3.	<i>Reactivos</i>	24
2.5.	Métodos y técnicas	25
2.5.1.	<i>Comprobación Taxonómica</i>	26
2.5.2.	<i>Acondicionamiento de material vegetal</i>	26
2.5.2.1.	<i>Secado</i>	26
2.5.2.2.	<i>Molienda</i>	26
2.5.3.	<i>Obtención del extracto etanólico</i>	27
2.5.4.	<i>Control de calidad de la droga cruda</i>	27
2.5.4.1.	<i>Parámetros de Calidad de los Extractos</i>	27
2.5.4.2.	<i>Parámetros de Calidad Químicos</i>	27
2.5.5.	<i>Parámetros de Calidad Físicos del extracto blando</i>	29
2.5.5.1.	<i>Determinación de los requisitos organolépticos</i>	29
2.5.5.2.	<i>Determinación del pH</i>	30
2.5.6.	<i>Cromatografía en capa fina</i>	30
2.5.6.1.	<i>Cromatografía para flavonoides</i>	30
2.5.6.2.	<i>Cromatografía para triterpenos</i>	31
2.5.7.	<i>Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</i>	31
2.5.8.	<i>Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico</i>	32
2.5.9.	<i>Capacidad captadora de radicales libres in vitro. Método DPPH*</i>	32
2.6.	Evaluación de la actividad antiinflamatoria	33
2.6.1.	<i>Prueba de edema plantar en ratas (Rattus norvegicus) inducido por Carragenina</i>	33
2.6.2.	<i>Análisis estadístico</i>	35

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS	37
3.1. Obtención del extracto etanólico de <i>Clinopodium tomentosum</i>	37
3.2. Determinación del análisis químico del material vegetal	37
3.3. Parámetros de calidad químico-cualitativo: tamizaje fitoquímico	38
3.4. Determinación de los requisitos organolépticos del extracto blando de <i>Clinopodium tomentosum</i>	41
3.5. Cromatografía en capa fina	41
3.6. Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu	44
3.7. Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico	45
3.8. Capacidad captadora de radicales libres <i>in vitro</i>. Método DPPH*	46
3.9. Evaluación de la actividad antiinflamatoria	47
3.9.2.1. <i>Análisis estadístico de correlación de tiempo – tratamiento</i>	50
3.9.2.2. <i>Análisis de las variables</i>	51
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	62

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1-3: Recorrido de cada tratamiento con sus respectivos tiempos.....	49
Gráfica 2-3: Porcentaje de inflamación en la última hora.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- 1 Mecanismo de acción de los AINEs.....	12
Figura 2-1 Estructura del Diclofenaco.....	15
Figura 3-1 Arbusto de <i>Clinopodium tomentosum</i> (Pumin).....	18
Figura 1-2 Registro de la investigacion.....	26
Figura 2-2 Elaboración de los extractos para tamizaje fitoquímico.....	28
Figura 1-3 Cromatografía en capa fina para flavonoides de <i>C. tomentosum</i>	42
Figura 2-3 Cromatografía en capa fina para flavonoides de <i>E. glutinosum</i>	42
Figura 3-3 Cromatografía en capa fina para triterpenos de <i>C. tomentosum</i>	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Componentes de la reacción inflamatoria.....	5
Tabla 2- 1 Clasificación de los AINE según su estructura química.....	11
Tabla 3-1 Clasificación de los AINE según vida media plasmática.....	11
Tabla 4-1 Reacciones adversa más frecuentes.....	14
Tabla 5-1 Reacciones adversas al consumir diclofenaco.....	16
Tabla 6-1 Taxonomía perteneciente a <i>Clinopodium tomentosum</i>	18
Tabla 1-2 Descripción animales de experimentación <i>Rattus norvegicus</i>	21
Tabla 2-2 Condición ambiental que fueron sometidas las ratas.....	22
Tabla 3-2 Tamizaje fitoquímico para cada extracto.....	28
Tabla 4 -2 Diseño de la evaluación de la Actividad Antiinflamatoria “ <i>in vivo</i> ”.....	34
Tabla 1-3 Extracto obtenido de la droga vegetal de <i>Clinopodium tomentosum</i>	37
Tabla 2-3 Análisis químico de la materia vegetal.....	37
Tabla 3-3 Resultados del tamizaje fitoquímico de la planta <i>Clinopodium tomentosum</i>	38
Tabla 4-3 Resultados del tamizaje fitoquímico de la planta <i>Eupatorium glutinosum</i> (Matico)..	39
Tabla 5-3 Resultados de requisitos organolépticos.....	41
Tabla 6-3 Resultado de Rf flavonoides <i>C. tomentosum</i>	42
Tabla 7-3 Resultado de Rf flavonoides <i>E. glutinosum</i>	43
Tabla 8-3. Resultado de Rf triterpenos <i>C. tomentosum</i>	44
Tabla 9-3 Resultado de cuantificación de Fenoles totales.....	44
Tabla 10-3 Resultado de cuantificación de flavonoides totales.....	45
Tabla 11-3 Resultados obtenidos de los radicales libres por método de DPPH*.....	46

Tabla 12-3 Resultado del área de inflamación a diferentes tiempos.....	48
Tabla 13-3 Resultado del porcentaje de inflamación con cada tratamiento.....	49
Tabla 14-3. Resultado de Análisis estadístico ANOVA para cada tiempo.....	50
Tabla 15-3 Resultado de Tukey-B para variable T2 de la primera hora.....	51
Tabla 16-3 Resultado de Tukey-B para variable T7 de la sexta hora.....	52
Tabla 17-3 Resultado de Tukey-B para variable T8.....	52

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: Identificación y comprobación de la especie *Clinopodium tomentosum*

ANEXO B: Extracto blando de *Clinopodium tomentosum*

ANEXO C: Determinación de cenizas totales

ANEXO D: Determinación de humedad

ANEXO F: Tamizaje fitoquímico del extracto

ANEXO G: Determinación de análisis organoléptico

ANEXO H: Determinación del pH

ANEXO I: Cromatografía de flavonoides

ANEXO J: Cromatografía de triterpenos

ANEXO K: Cuantificación de fenoles totales

ANEXO L: Cuantificación de capacidad captadora de radicales libres DPPH*

ANEXO M: Materiales para realizar el diseño experimental

ANEXO N: Animal de experimentación

ANEXO O: Cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación

ANEXO P: Inducción del edema con solución de carragenina al 1%

ANEXO Q: Tabla de valores para dosificación de animales de experimentación

ANEXO R: Administración del extracto en forma de suspensión por vía oral

ANEXO S: Medición de la pata derecha inflamada, por el software IMAGEJ

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

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

ANEXO V: Curva exponencial de calibración para ácido gálico usada en la cuantificación de capacidad captadora de radicales libres.

RESUMEN

Se estudió la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* inducido por edema plantar en animales de experimentación. El extracto se elaboró por maceración con alcohol al 96% con una muestra molida y seca. Se realizó el control de calidad de la droga cruda y el control de calidad físico y químico del extracto. Se desarrolló la cromatografía de capa fina (TLC). Por medio de técnicas espectrofotométricas se cuantificó el contenido de compuestos fenólicos con estándar de ácido gálico, los flavonoides totales con estándar de quercetina. La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó mediante el método con el radical DPPH* (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), se utilizó como antioxidante estándar el ácido gálico, estos resultados fueron valorados como concentración inhibitoria media (CIM). La actividad antiinflamatoria se determinó mediante la inducción del edema plantar inducido por carragenina al 1%; con los animales de experimentación (*Rattus norvegicus*) se formó 6 grupos cada uno con 4 ratas a las mismas se les administró de 25, 100 y 300 mg/kg de extracto, se midió el área de la inflamación de la pata de la rata desde el tiempo cero hasta la séptima hora, se analizó el porcentaje de la inflamación por medio de Microsoft Office PowerPoint, para en análisis estadístico se usó el sistema SPSS con los test de ANOVA de un factor y Tukey-B. En la cuantificación de fenoles se obtuvo 6,68% con 66,832 mgEQ/mL, mientras que para flavonoides totales 0,92% a una concentración 9,240 mgEQ/mL, en cuanto a la capacidad antioxidante del extracto su CIM es 47,751 µg/mL con un porcentaje de 64,25% de capacidad captadora de radicales libres. Se determinó la actividad antiinflamatoria siendo las dosis de 100 y 300mg/Kg de extracto las que disminuye significativamente la inflamación de la pata de la rata. Este estudio se relacionó con *Eupatorium glutinosum* que presentó dicha actividad. Se concluye que los extractos con mayor concentración presentan una buena actividad antiinflamatoria, lo cual beneficia para futuros estudios. Se recomienda realizar nuevos estudios con respecto a su toxicidad.

Palabras claves: <FARMACOLOGÍA>, <FITOQUÍMICA>, <PUMIN (*Clinopodium tomentosum*)>, <EXTRACTO FLUIDO>, <CARRAGENINA>, <CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)>, <CUANTIFICACIÓN>, <ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA>.

SUMMARY

It was studied anti-inflammatory activity of the ethanolic extract from *Clinopodium tomentosum* induced by plant edema in test animals. The extract was elaborated by maceration with alcohol to 96% with a crushed and dried sample. It was then performed the quality control of the raw drug and physical- chemical quality control of the extract. It was done the thin layer chromatography (TLC). By means of spectrophotometrical techniques, it was quantified the amount of phenolic compounds with Gallic acid standard, the total flavonoids with quercetin standard. The evaluation of the antioxidant capacity was done by means of using the method with radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Gallic acid was used as standard antioxidant, these results were valued as media inhibitory concentration (MIC). The anti-inflammatory activity was determined by means of induction of plant edema induced by carrageenan to 1% with the test animals (*Rattus norvegicus*), six groups were formed, each one with 4 rats which were given 25, 100 and 300mg/kg of extract, the inflammation area of the rat's leg was measured from time zero until the seventh hour, the inflammation percentage was analyzed by using Microsoft Office PowerPoint; for the statistical analysis, it was used the SPSS system with ANOVA test for one factor and Tukey-B. In the phenols quantification it was gotten 6,68% with 66,832 mgEQ/mL, while total flavonoids 0,92% at a concentration 9,240 mgEQ/mL, regarding the antioxidant capacity of the extract, its MIC is 47,751 µg/mL with a percentage of 64,25% of the free radicals catching capacity. The anti-inflammatory activity was determined, being the doses of 100 and 300mg/Kg of extract the ones that significantly reduce the inflammation of the rat's leg. This study is related to *Eupatorium gloutinosum* which presented such activity. It is concluded that the extracts with higher concentration present a good anti-inflammatory activity, wich benefit future studies regarding its to toxicity.

Key words: <PHARMACOLOGY>, <PHYTOCHEMICAL>, <PUMIN (*Clinopodium tomentosum*)>, <FLUID EXTRACT>, <CARRAGEENAN>, <THIN LAYER CHROMATOGRAPHY (TLC)>, <QUANTIFICATION>, < ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY>.

INTRODUCCIÓN

Los antiinflamatorios no esteroides conocidos como (AINES), son una agrupación de medicamentos que se consume a nivel mundial ya sea con prescripción médica o sin ella, este tipo de fármacos son utilizados para tratar el dolor, la inflamación y la fiebre debido a ser un conjunto heterogéneo de compuestos químicos que por lo general no están relacionados entre sí pudiendo compartir las acciones terapéuticas dichas anteriormente. Se dice que 30 millones de personas en el mundo consumen diariamente AINES, de los cuales aproximadamente el 40% pertenecen a personas mayores de 60 años. (Batlouni, 2010: pp. 538-546)

El consumo de AINES conforma la segunda causa más habitual de úlcera péptica, ocasionando un alto riesgo por la formación de complicaciones gastrointestinales. El administrar AINES por vía oral o parenteral provoca lesiones en la mucosa gástrica o duodenal. Su consumo se convierte de riesgo relativo, así en pacientes consumidores es 2,7 veces mayor que en la población general; se puede decir que uno de cada 1000 consumidores de AINES por año presenta una patología gastrointestinal grave. (Quinteros, 2000)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), son fármacos que se utilizan en el primer peldaño de la escalera analgésica, se centra en el enfoque farmacológico del control del dolor, los AINES son un grupo con estructura química diferente que su función principal es inhibir la síntesis de prostaglandinas, por medio de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, por el mecanismo de acción pueden producir efectos indeseables también conocido como efecto adverso o reacciones adversas o medicamentos (RAM). (Prieto, 2007)

Dentro de los medicamentos más utilizados se encuentran: la aspirina, naproxeno, ibuprofeno entre otros medicamentos ya sea de nombre genérico o nombre comercial que pertenecen a los AINES.

El consumo de este tipo de medicamentos sin ningún control médico provoca la automedicación, es una conducta que se encuentra presente en todas las sociedades junto a distintas causas hace que sea más extendida. En los países latinoamericanos y especial en Ecuador la automedicación carece de control sobre la venta de analgésicos sin receta médica, es decir, el uso inapropiado e indiscriminado puede producir problemas de salud adicionales, pudiendo agravar a personas que buscan alivio de uno o más dolores que en ocasiones no pueden ser muy graves.

Por el uso inadecuado de este tipo de medicamentos que provocan efectos secundarios es necesario buscar una alternativa para poder solucionar los problemas de salud. Una de las opciones es el uso de plantas medicinales ya que éstas no provocan efectos secundarios y tampoco

toxicidad, siendo las plantas medicinales la opción más viable por su accesibilidad, menor costo y reacciones adversas minúsculas. En Ecuador el empleo de plantas medicinales basado en el conocimiento ancestral permanece presente para el tratamiento de diferentes patologías, tanto es un método alternativo para problemas de salud. En los países en desarrollo el 80% de la población se basa en la medicina tradicional como atención primaria, mientras que el 20% de la población utiliza medicinal convencional. (Ismael, 2007)

La OMS, ampara el uso de la medicina tradicional o alternativa siempre y cuando se haya evidenciado su actividad terapéutica, que presente antecedentes que sean útiles para una determinada patología. (OMS, 2004)

En las plantas medicinales actúan como principio activo los metabolitos secundarios, compuestos que las plantas metabolizan en pequeñas concentraciones para poder sobrevivir aun siendo las condiciones del habitat muy extremas. Los estudios científicos han permitido descubrir una gran gama de principios activos, desde el punto de vista de la salud, los más importantes son los aceites esenciales, los glucósidos o heterosidos, mucílagos, flavonoides, terpenos y taninos conocidos como metabolitos secundarios; existen otros principios activos relevantes conocidos como metabolitos primarios. (Bruneton, 2001)

En la familia Lamiaceae sus primeros trabajos taxonómicos-florísticos fueron realizados por Bentham, quien describió varios géneros y especies, en base a este trabajo se ha realizado ampliamente varias clasificación en las que existe aproximadamente 236 géneros y 7 173 especies, en varias partes del mundo esta familia tiene gran importancia económica, puesto a uqe muchas especies son utilizadas como condimentos (*Origanum, Thymus, Mentha*), en aceites esenciales y medicinales (*Lavanda, Pogostemon, Salvia, Clinopodium*) también como ornamentales (*Coleus, Salvia, Scutellaria*). (Martínez-Gordillo et al. 2016: pp.3086). En el Ecuador existe gran variedad de especies con respecto a esta familia, muchas de éstas se utilizan para tratar varias patologías en poblaciones indígenas como es el *Clinopodium tomentosum* como analgésico, antiinflamatorio y antibacteriano. (Benzo et al., 2007)

El género *Clinopodium* ha sido estudiado y utilizado para sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, sedante, antiinflamatoria, antimicótico; también se utiliza en la industria alimentaria y química. Con respecto a sus compuestos se ha identificado compuestos fenólicos, flavonoides y triterpenos. (Sarikurkcu et al., 2015: pp. 961-966)

La especie *Clinopodium tomentosum* nombre común “Pumin”, sobre la actividad antiinflamatoria no se han realizado investigaciones, pero según estudios anteriores acerca de los olores propios

de esta planta indica que poblaciones de la ciudad de Chambo utilizan esta planta para dolores, inflamaciones, etc. (Benzo, et al, 2007) En un estudio se realizó la identificación de los compuestos fenólicos encontrando un nuevo compuesto 2- O -benzoil-3- O ácido tartárico –cinnamoyl, en la que adjuntan que la gente local utiliza las partes aéreas de la planta para preparar infusiones por su efecto relajante y como agente anti-inflamatorio.(Vera y Naranjo, 2012)

Se han realizado investigaciones de la actividad antiinflamatoria en diferentes géneros que pertenecen a la misma familia como es el caso de *Plectranthus amboinicus* (Burk et al., 2009) y *Salvia officinalis* (Baricevic, 2001: pp. 125-132). Para referenciar esta investigación con otro tipo de especie sonde se ha verificado la actividad antiinflamatoria conocido con el nombre común de “Matico” y su nombre científico *Eupatorium glutinosum*. (De las Heras et al., 1998: pp. 161-166)

- El objetivo principal de esta investigación es determinar la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum* vehiculizado en una forma farmacéutica adecuada, a tres niveles de concentración, mediante el registro de la inhibición del edema plantar inducido por carragenina sobre *Rattus norvegicus*; para lo cual se realizó el control de calidad de la materia prima y del extracto blando para obtener resultados de alto rendimiento, y así garantizar la eficiencia y eficacia de la actividad antiinflamatoria investigada de *C. tomentosum*; se obtuvo un extracto etanólico estandarizado de *C. tomentosum* a partir de sus hojas; por último se diseñó y elaboró una forma farmacéutica adecuada en base a las propiedades fisicoquímicas de los componentes activos del extracto etanólico blando

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. Actividad antiinflamatoria

1.1.1. *Inflamación*

La inflamación es un proceso o reacción defensivo natural del sistema inmunológico en el organismo como respuesta al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por agentes lesivos como son microorganismos, traumatismos, necrosis, agentes químicos o físicos, o reacciones inmunitarias entre otros. (Villalba, 2014)

La inflamación es un proceso complejo que involucra a varias células con una acción coordinada, en la que está caracterizado por alteraciones en la permeabilidad vascular y la producción de mediadores inflamatorios locales como son:

- Esteroides
- Prostaglandinas
- Citosinas
- Quimiocinas
- Factores de crecimiento
- Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Cuando existe una sobre producción de ERO puede provocar un estrés oxidativo y generar daño a nivel celular promoviendo el surgimiento de enfermedades crónicas. (Franco et al., 2013)

El proceso de inflamación presenta aspectos, en primer lugar la orientación de la respuesta, que tiende a delimitar el área de combate contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria rápida, por lo tanto es prevalentemente inespecífica, favoreciendo al desarrollo posterior de una respuesta específica. Y como tercer lugar, el foco inflamatorio el cual capta a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes. (Universidad de Granada, 2004)

1.1.2. Finalidad de la inflamación

La finalidad de la inflamación es neutralizar o eliminar la razón de la lesión y reparar sus consecuencias. Iniciar una cadena de sucesos que ayuden a sanar y reconstruir el tejido lesionado. Evitar que las infecciones se propaguen de forma incontrolada. (Damjanof, 2010)

1.1.3. Componentes

a. Principales componentes de la reacción inflamatoria

Tabla 1-1 Componentes de la reacción inflamatoria.

Componente Vascular	Componente Celular	Matriz Extracelular
Vasos sanguíneos. Plasma.	Neutrófilos. Monocitos. Eosinófilos. Linfocitos. Basófilos. Plaquetas. Mastocitos.(tej conjuntivo) Fibroblastos.(tej conjuntivo) Macrófagos.(tej conjuntivo)	Proteínas fibrilares. Proteínas estructurales. Glucoproteínas de adhesión y proteoglicanos. La membrana basal.

Fuente: Tamames, 1997

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

b. Respuestas inflamatorias tres componentes

1. Cambios hemodinámicos.

El fofu inflamatorio es la primera reacción que se produce y facilita el camino para los otros componentes. Después de la agresión se presenta la vasoconstricción arteriolar con reducida prolongación, que suscita palidez pasajera, pero en lesiones graves la vasoconstricción dura entre 5 minutos produciendo a continuación la dilatación progresiva que afecta a las arteriolas.

2. Alteraciones de la permeabilidad

Cuando ocurre la inflamación, hay un paso del líquido hacia los tejidos de 5 a 6 veces mayor que en condiciones fisiológicas. La alta capacidad de contenido proteico del exudado inflamatorio, puede ser semejante al del plasma, que señala la existencia de un proceso distinto al mecanismo fisiológico del transporte de líquidos.

3. Modificaciones leucocitarias

El acceso de los leucocitos, en especial de los polinucleares neutrófilos y monocitos, a través de la pared de los vasos sanguíneos establece la fase celular más importante de la inflamación aguda. (Tamames, 1997)

1.1.4. Factores causales

- Agentes vivos: bacterias, virus, rickettsias, hongos y parásitos.
- Agentes físicos: luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, calor y frío.
- Agentes químicos: ácidos, álcalis y venenos
- Traumatismos, cuerpos extraños, alteraciones vasculares: isquemia y necrosis celular
- Alteraciones inmunitarias: enfermedades por complejos inmunes, hipersensibilidad inmediata y autoinmunidad. (Tamames, 1997)

1.1.5. Signos característicos de la inflamación

Los principales signos de la inflamación son:

- a) Calor: se produce un aumento local de la temperatura secundaria a vasodilatación (incremento de la sangre en la zona y metabolismo), e incremento de consumo local de oxígeno
- b) Rubor: existe un incremento de irrigación en la zona afectada, por aumento del flujo sanguíneo y tiende acumularse leucocitos en la zona.
- c) Dolor: incitado por distensión de los tejidos y liberación de prostaglandinas (mediadores químicos), presión en las terminaciones nerviosas del área, causado por el edema y daño tisular)
- d) Edema: ocurre por el incremento de la permeabilidad capilar y luego sufusión de líquido en el tejido intersticial.

- e) Pérdida de funcionalidad: se produce por la limitación que conduce la conjugación de los cuatro signos ya mencionados anteriormente. (Robbison y Contran, 2015) (Marlene, 2013)

1.1.6. Clasificación de la inflamación

Para la clasificación se toma en cuenta el tiempo de duración, naturaleza del exudado, etiología, características morfológicas y ubicación.

a) Por duración:

- Agudas: Esta clase de inflamación se da una respuesta rápida al agente agresor cuyo propósito es liberar mediadores de defensa del organismo a la zona de la lesión su inicio es inmediato y cursa una duración breve.
- Crónica: es un proceso extenso, hallando la destrucción tisular, la inflamación se encuentra activa donde se da intentos repetitivos de reconstrucción

b) Por la naturaleza del exudado

- Trasudado: se determina por la aparición de líquido extravascular con diminuto contenido proteico, resultado de un leve cambio en la permeabilidad vascular
- Exudado: aparición de líquido inflamatorio extravascular con elevado contenido proteico, lo cual muestra mucha permeabilidad en los vasos sanguíneos.

c) Por etiología

- Infecciosas: se da por microorganismos como bacterias, virus, parásitos o toxinas
- Traumáticas: golpes potentes con respuesta rápida o lenta, como sucede con los esguinces o higromas.
- Térmicas: quemaduras por calor o congelamiento
- Irradiaciones
- Por contacto agentes químicos
- Necrosis tisular
- Presencia de cuerpo extraños como vidrios, piedras
- Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad alérgenos comunes o desarrollo colagenopáticos.

d) Características morfológicas

- Serosa: por aglomeración de líquido tisular de poco contenido proteico.
- Fibrinosa: con existencia de exudado con masivas cantidades de fibrinógeno.
- Supurativa o purulenta: se identifica por la producción de exudado purulento que consiste de leucocitos y células necróticas.
- Abscesos: muestra tejido inflamatorio purulento acompañado de necrosis licuefactiva.
- Ulceras: resultado de un tejido gangrenado (tejido necrótico inflamado)

e) Por su ubicación.

- Focales: formada en zonas y órganos específicos, denominando con el sufijo -itis, como faringitis, conjuntivitis, etc.
- Diseminados: es el producto de la propagación de desarrollo inflamatorio permanente ya sea por vía canalicular, metástasis o fistulización. (Rios, 1996: pp.29-46) (Pepper, 2005)

1.1.7. Mediadores de la inflamación

Los mediadores son aquellos que regulan la respuesta vascular a la agresión, encontrándose:

a) MEDIADORES DE ORIGEN CELULAR

Mediadores preformados en gránulos secretores: en el interior del granulo se encuentra integrado los mastocitos, para después ser secretados en los tejidos lesionados. Se dice que la histamina y serotonina que componen aminas vasoactivas son liberadas al comienzo de la inflamación.

La histamina es un mediador de origen celular pre-integrado al interior de los mastocitos que se encuentran en el tejido conectivo próximo a los vasos sanguíneos, y además de los basófilos y plaquetas de la sangre.

Este mediador se desliga por degradación en respuesta a:

- Frio o calor (lesión física),
- Reacciones alérgicas,
- Liberación de fragmentos del complemento denominado anafilotoxinas (C_{3a} y C_{5a}),
- Proteínas liberadores de histamina derivadas de los leucocitos,
- Neuropeptidos y

- Citosinas (IL-1-, IL-8)

La función de la histamina es actuar dilatando las arteriolas, incrementando la permeabilidad de las vénulas y activando las células endoteliales.

La serotonina es un mediador vasoactivo pre-integrado en el interior de las plaquetas y células enteroendocrinas. Para su liberación desde las plaquetas se estimula cuando tiene trato con el colágeno, trombina, ADP y complejo Ag-Ac, estimulando la vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular. (Kumar et al., 2007)(Rios, 1996: pp.29-46)

Mediadores de nueva síntesis: Son metabolitos derivados del ácido araquidónico como son: Prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas, que son sintetizados por 2 tipos de enzimas: ciclooxigenasas que forma las prostaglandinas: leucotrienos y lipoxinas.

Las *prostaglandinas*, se deriva de los mastocitos, macrófagos y células endoteliales que asisten en las reacciones vasculares y sistémicas de la inflamación, estas se establecen por la acción de 2 ciclooxigenasas COX-1 y COX-2, siendo las más significativas en la inflamación:

- PGE₂, PGD₂: Incita a vaso y broncodilatación, e inhibe la función de las células inflamatorias.
- PGF_{2a}: Interviene en el estímulo de la vaso y broncoconstricción.
- PGI₂:inhibe la función de las células inflamatorias
- TxA₂: Induce vasoconstricción. (E y Faber, 1992)

Por otro lado, las enzimas de clase lipooxigenasa es responsable de la producción de *leucotrienos* sintetizados, produciendo efectos vasculares

Las *lipoxinas* son productos bioactivos formados por el ácido araquidónico mediante la vía de las lipooxigenasas, son inhibidoras de la inflamación, disminuyen la incorporación de los leucocitos y los componentes celulares de la inflamación, además reduce la quimiotaxis de los neutrófilos y la adherencia al endotelio.

Las citosinas, son otros mediadores de nueva síntesis, son proteínas desarrolladas en los macrófagos, linfocitos, células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo nivelando las funciones de otros tipos celulares (Rule et al., 2010)

b) MEDIADORES DE ORIGEN PLASMÁTICO

Estos mediadores se originan a nivel hepático manifestándose en la circulación como precursores inactivos que deben activarse, a través de una serie de divisiones proteolíticas para obtener propiedades biológicas.

Sistema del complemento: su acción se da en la inmunidad innata y de adaptación para la defensa de agentes microbianos, cuando se activa este sistema se produce varios componentes de la degradación de proteínas de complemento, permitiendo incrementar la permeabilidad vascular, quimiotaxis y opsonización; este sistema se fracciona en 3 conjuntos (inflamación, fagocitosis y lisis celular).

Sistema de coagulación: provoca la activación de la trombina y formación de fibrina, incrementando la producción de varios factores de la coagulación y confirmando que la superficie endotelial se retorne protrombogénica. Favoreciendo en la producción de plasmina y degradando la fibrina para elaborar fibrinopéptidos inductores de la inflamación.

Sistema de cininas: al activarse este sistema libera bradicinina causando un aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso y la dilatación de los vasos sanguíneos. (Tamames, 1997)

1.1.8. Fases de la inflamación

Se divide en cinco etapas:

1. Liberación de mediadores: la mayor parte son moléculas, de estructura elemental que son liberadas o sintetizadas por el mastocitos mediante la actuación de determinados estímulos.
2. Efectos de los mediadores: liberadas las moléculas realiza alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que beneficia la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.
3. Llegada de las moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Surgen en su mayor parte de la sangre, también de áreas adyacentes al foco.
4. Regulación del proceso inflamatorio: integra una serie de mecanismos inhibidores tendentes a finalizar o equilibrar el proceso.
5. Reparación: determinan la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la misma respuesta inflamatoria. (Pérez, 2013)

1.2. Antiinflamatorios no esteroides (AINES)

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son fármacos muy utilizados y prescritos a nivel mundial, conforman la familia más numerosa de fármacos que participan en los mecanismos de acción y actividad terapéutica (como antiinflamatoria, analgésica y antipirética). Los AINES al compartir similar eficacia para dominar el dolor, presentan variabilidad en su perfil de seguridad. (Sostres y Lanás, 2015: pp.267-272)

1.2.1. Clasificación

Para la clasificación de los AINES se fundamenta en la estructura química de los mismos (Tabla 2-1). Sus diferencias químicas se condicionan con los diferentes parámetros farmacocinéticos y señala las diferencias entre su efectividad clínica y sus efectos secundarios. Para esta clasificación se incorpora actualmente los inhibidores selectivos de la COX-2. Pero también se pueden clasificar según su vida media plasmática. Tabla 3-1 (Cabezas, S., López, & Ibáñez, 2001)

Tabla 2- 2 Clasificación de los AINE según su estructura química

GRUPO TERAPÉUTICO	FÁRMACO
SALICILATOS	Ácido acetilsalicílico, salsalato, diflunisal, fosfosal, acetilato de lisina
PIRAZOLONAS	Fenilbutazona
INDOLACÉTICOS	Indometacina, tolmetín, sulindaco, acemetacina
ARILACÉTICOS	Diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona
ARILPROPIÓNICOS	Ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, flurbiprofeno
OXICAMS Y ANÁLOGOS	Piroxicam, tenoxicam, meloxicam
FENAMATOS	Ácido mefenámico, meclofenamato
INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA COX-2	Celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib

Fuente: Cabezas y otros, 2001

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

Tabla 3-1: Clasificación de los AINE según vida media plasmática

ANALGÉSICO	VÍA MEDIA CORTA (< 6 HORAS)	VIDA MEDIA LARGA (> 6 HORAS)
SALICILATOS	Ácido acetilsalicílico, salsalato, acetilato de lisina	Diflunisal, fosofosal
PIRAZOLONAS	-----	Fenilbutazona

INDOLACÉTICOS	Indometacina, tolmetín	Sulindaco
ARILACÉTICOS	Diclofenaco,	Aceclofenaco, nabumetona
ARILPROPIÓNICOS	Ibuprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno	Naproxeno
OXICAMS Y ANÁLOGOS	-----	Piroxicam, tenoxicam, meloxicam
INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA COX-2	-----	Celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib

Fuente: Cabezas y otros, 2001
Realizado por: Ximena Culqui, 2017

1.2.2. Mecanismo de acción

Los AINES inhiben la actividad en la enzima ciclo-oxigenasa (COX), produciendo la reducción de la formación de la prostaglandina y tromboxanos a partir de ácido araquidónico. La reducción en la síntesis de prostaglandina y su interés en la provocación del dolor, inflamación y fiebre. Su función en diferentes tejidos es la encargada de la mayoría de los efectos terapéuticos como adversos de los AINES.

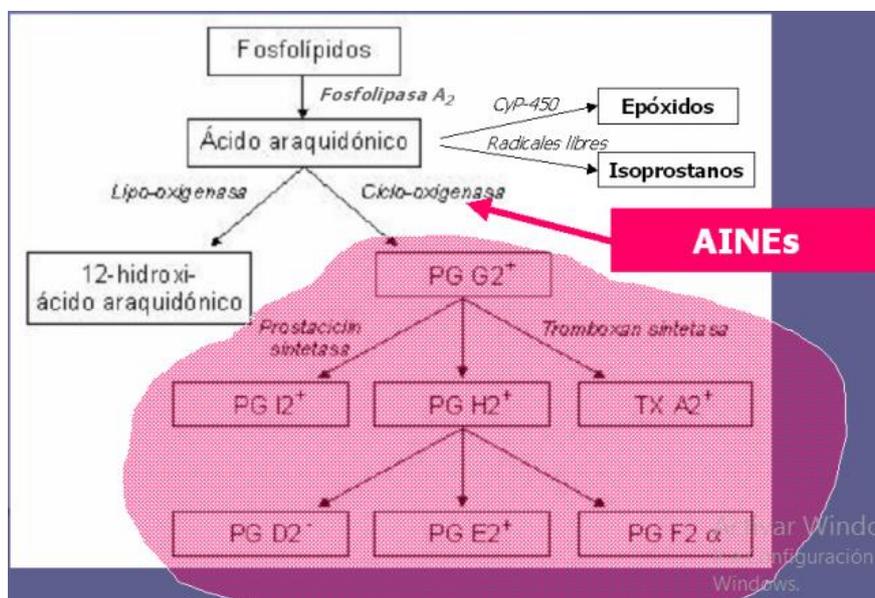


Figura 1- 3 Mecanismo de acción de los AINES

Fuente: Hall y otros, 2012

La COX-1 tiene propiedades de enzima constitutiva y su actividad tiene que ver con la colaboración de las prostaglandinas y los tromboxanos en el control de funciones fisiológicas, la COX-2 tiene propiedades de enzima inducible en ciertas células bajo circunstancias patológicas

por la participación de diversas citoquinas y mediadores de la inflamación COX-2 ya que se encuentran considerablemente en el tejido dañado inflamado.

Los AINES clásicos inhiben de forma no selectiva la actividad enzimática de las COX-1 y COX-2, pero mayoritariamente de COX-1 la cual tiene como resultado la aparición de efectos secundarios a nivel gastrointestinal, renal y de coagulación.

Se describe de las acciones siguientes:

- *Efecto analgésico:* aísla la generación del impulso del dolor, esto ocurre por la reducción de prostaglandina y probablemente la inhibición de la síntesis o acciones de otros compuestos que sensibilizan los receptores del dolor por medio de estimulación química o mecánica.
-
- *Efecto antiinflamatorio:* se dice que actúan periféricamente en el tejido inflamado, aparentemente disminuyendo la actividad de las prostaglandinas en dicho sitios y la síntesis de otros mediadores locales de la respuesta inflamatoria, un ejemplo es la migración leucocitaria, inhibiendo la liberación o acción de las enzimas lisosomales y acciones en otros desarrollos inmunológicos y celulares en tejidos conectivos.
-
- *Efecto antipirético:* este actúa en el centro regulador de la temperatura a posición del hipotálamo (disminuyendo la actividad de las prostaglandinas) para producir vasodilatación periférica, resultando en incremento del flujo sanguíneo por medio de la piel, enrojecimiento y pérdida de calor.
-
- *Efecto antirreumático y antigotoso:* Se ejercen por mecanismos analgésicos y antiinflamatorios, en presencia de articulaciones; las prostaglandinas incitan y alargan la inflamación comprometiendo a vasodilatación ocasionado por el influjo tanto de las células como de los mediadores del proceso inflamatorio. (Hall, et al, 2012)

1.2.3. Reacciones adversas más frecuentes

Las reacciones adversas habitualmente son un efecto de sus propias acciones farmacológicas. En la Tabla 4-1, muestra las reacciones adversas más relevantes.

Tabla 4-1: Reacciones adversa más frecuentes

GASTROINTESTINALES	RENALES	SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
Esofágicos <ul style="list-style-type: none"> • Úlcera, • esofagitis, • estenosis Gastroduodenales <ul style="list-style-type: none"> • Dispepsia, ardor, epigastralgia • Eritema, hemorragia submucosa, lesiones agudas de mucosa • Sangrado • Úlcera gastroduodenal • Perforación astroduodenal Hepáticas <ul style="list-style-type: none"> • Elevación asintomática de transaminasas • Colestasis • Hepatitis 	<ul style="list-style-type: none"> • Insuficiencia renal aguda • Síndrome nefrótico con nefritis intersticial • Necrosis papilar aguda • Necrosis papilar crónica • Retención de sodio y edemas • Hiperpotasemia 	<ul style="list-style-type: none"> • Cefalea, tinnitus, sordera, vértigo • Síndrome confusional • Meningitis aséptica
CUTÁNEOS	HEMATOLÓGICOS	PULMONARES
<ul style="list-style-type: none"> • Urticaria, angioedema • Exantema medicamentoso • Eritema multiforme, síndrome de Steven-Johnson • Síndrome de Lyell • Fotodermatitis (pseudoporfiria) 	<ul style="list-style-type: none"> • Leucopenia, agranulocitosis, anemia aplásica • Anemia hemolítica • Anemia ferropénica • Diátesis hemorrágica 	<ul style="list-style-type: none"> • Broncospasmo • Edema pulmonar • Infiltrados pulmonares

Fuente: Hall y otros, 2012

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

1.3. Diclofenaco sódico

El diclofenaco sódico es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo con actividad analgésica y antipirética. Se halla principalmente en forma de sal sódica. El mecanismo de acción de diclofenaco sódico opera a través de Ciclooxygenasa (COX). El efecto fisiológico de esta sustancia deriva de una reducción de la Prostaglandina. (Ulubay et al, 2017)

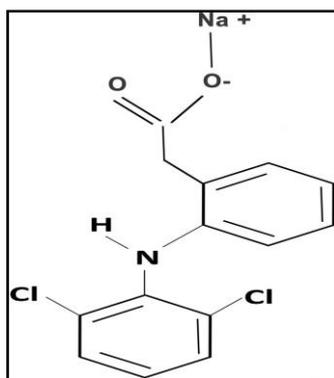


Figura 4-1 Estructura del Diclofenaco

Fuentes: Ulubay y otros, 2017

1.3.1. Propiedades farmacocinéticas

El diclofenaco sódico se elimina por excreción urinaria y biliar. Mientras que el 35% de la dosis es conjugado en la bilis, el 65% de la dosis de diclofenaco se excreta en la orina. Al administrar por vía oral su efecto es sistémico; su absorción es muy rápida. La velocidad de absorción del diclofenaco se asocia con sales de potasio altamente solubles y los excipientes que contienen el fármaco. (Ulubay et al., 2017)

1.3.2. Mecanismo de acción

Bloquea la producción de prostaglandinas a través de la inhibición selectiva de COX. También inhiben la síntesis de ADN bacteriano mediante efectos bacteriostático. Tienen una labor fundamental en el tratamiento farmacológico de dolor agudo y crónico. El diclofenaco es un derivado del ácido benceno-acético con propiedades antiinflamatorias. Como el diclofenaco es un Antiinflamatorio no esteroideo (AINE), se une a ambas formas de COX (COX-1 y COX-2) e inhibe la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas pro-inflamatorias por medio de reacción de quelación. El diclofenaco es eficaz en la superación del dolor y la inflamación cuando inhibe la COX-2.

1.3.3. Posología

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

- Niños: 1-3 mg/kg/día.
- Adultos: 75-150 mg/día. Oral, cada 8-12 horas. Rectal, cada 8-12 horas. I.M., cada 12-24 horas. Dosis máxima 150 mg/día.

1.3.4. Reacciones secundarias y adversas

Al presentarse reacciones adversas al consumir diclofenaco puede ocurrir cuando la dosificación es mayor al 10%, casuales entre 1 a 10%; en reacciones adversas se da un porcentaje de 0,001 a 1%, para casa aislados es de menos de 0,001%

Las reacciones adversas se mencionan de acuerdo con el sitio de afección como se muestra en la siguiente Tabla 5-1:

Tabla 5-1: Reacciones adversas al consumir diclofenaco

Tracto gastrointestinal	Sistema nervioso central:	Sentidos especiales:	Piel:	Hematológicas
Dolor epigástrico, otros trastornos gastro-intestinales como náusea, vómito, diarrea, calambres abdominales, dispepsia, flatulencia y anorexia.	Cefalea, mareo o vértigo. Rara vez: somnolencia.	Trastornos de la visión, pérdida de la audición, tinnitus, alteraciones del gusto.	Eritemas o erupciones cutáneas. Rara vez: urticaria	Trombocitopenia, leucopenia, anemia, agranulocitosis
Riñones:	Hígado:	Hipersensibilidad	Sistema cardiovascular	Otros sistemas orgánicos
Insuficiencia renal aguda, alteraciones urinarias como hematuria, proteinuria, nefritis intersticial, síndrome nefrótico y necrosis papilar.	Aumento de los valores séricos de aminotransferasas.	Asma, reacciones sistémicas anafilácticas/anafilactoides	Palpitación, dolor torácico, hipertensión e insuficiencia cardíaca congestiva	Reacciones en el punto de la inyección intramuscular

Fuente: Mahmut, 2017

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

1.4. Biodiversidad en el Ecuador

Ecuador es uno de los países con un mayor número de especies a nivel mundial es por eso que se denomina es un país megadiverso (índice más alto de biodiversidad en el planeta). Según el Centro de Monitoreo de la Conservación del Ambiente, se halla diecisiete países megadiversos en los cuales se concentra el 70% de la biodiversidad del planeta.

La biodiversidad en el Ecuador es importante porque nuestro país es muy rico en diferentes formas de vida y ecosistema, por ello para una buena biodiversidad todo dependerá de la alimentación, el habitat, provisión de bienes, etc. (Bravo y Velasquez, 2011)

En el plan del buen vivir que se establece para los años 2013-2017 el objetivo que establece para la biodiversidad del país es “Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global”. Mientras que el Ministerio del Ambiente quien presentó la actualización de la Estrategia Nacional de Biodiversidad (ENB) y el Plan de Acción para el primer período de implementación 2016-2021, quienes tuvieron una reunión en Noviembre del 2016 establecieron objetivos estratégicos que fueron los siguientes: incorporar la biodiversidad, los bienes y los servicios ecosistémicos asociados en la gestión de las políticas públicas; reducir las presiones y el uso inadecuado de la biodiversidad a niveles que aseguren su conservación; distribuir de manera justa y equitativa los beneficios de la biodiversidad y de los servicios ecosistémicos asociados, contemplando especificidades de género e interculturalidad; y fortalecer la gestión de los conocimientos y las capacidades nacionales que promuevan la innovación en el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad y los servicios ecosistémicos. (AMBIENTE, 2016)

1.4.1. Familia Lamiaceae

La familia de Lamiaceae ha sido de gran importancia debido al aroma único y valor nutricional. Esta familia es una de las más generalizadas y de uso medicinal, son plantas aromáticas más exclusiva con flores, que contiene alrededor de 220 generos y alrededor de 4000 especies de todo el mundo. En general, esta familia se cultiva en los distritos secos, suaves y fríos de Asia, Europa, África del Norte y se está extendiendo en América Latina desde unos años atrás. (Siddiqi, 1995)

Las Lamiaceae (Labiadas) se caracterizan por ser arbustos y plantas herbáceas que muestran tallos de sección cuadrangular y hojas opuestas o decusadas. Las flores, que se fusionan en inflorescencias, poseen un cáliz con 5 sépalos soldados en una estructura tubular y una corola, también tubular, compuesta por 5 pétalos; siendo el cáliz y la corola bilabiados. Las excavaciones arqueológicas demostraron que el uso de este miembro de la familia se basa en los tiempos prehistóricos y no solo se cosecha, sino también en otros lugares crecía de forma salvaje. . (Ahmet et al, 2017)

1.4.2. Género y especies más importantes

En esta familia se conoce muchas especies que son utilizadas como ornamentales o condimentos las más conocidas son *Rosmarinus officinalis*; las *Salvia spp.* y *Lavandula spp.* son plantas que se utiliza mucho en jardinería por ser aromáticas, en perfumería son utilizadas varias especies de *Lavanda*. Otras especies son utilizadas para aromatizar bebidas y usos medicinales como es el *Clinopodium spp.* con sus propiedades digestivas y analgésicas. (Acton, 2012)

1.4.3. *Clinopodium tomentosum* (Pumin)



Figura 3-1: Arbusto de *Clinopodium tomentosum* (Pumin)

Fuente: Flora of Ecuador, 2010

El término *Clinopodium* se deriva del griego *klinos* (cama) y *podion* (pie pequeño). Se encuentra creciendo en América Latina a una altitud de 3000 y 4000 m. sobre el nivel de mar, muchas especies de este género incluyendo al *Clinopodium tomentosum* se utiliza como plantas medicinales. Esta especie tiene pequeñas flores amarillas, aproximándose a una altura entre 30-80 cm., en Ecuador los indígenas conocen a esta planta con el nombre de “Pumin”. (Vera y Naranjo, 2012)

La sinonimia para esta planta según la información del Índice Internacional de Nombres de Plantas (IPNI) se la conoce como: *Gardoquia tomentosa*, *Gardoquia elegans*, *Gardoquia incana*, *Satureja pavoniana*, *Satureja elegans*, *Satureja kuntheii*.

1.4.4. Taxonomía

Tabla 6-1: Taxonomía perteneciente a *Clinopodium tomentosum*

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Lamiales
FAMILIA	Lamiaceae
GÉNERO	<i>Clinopodium</i>
ESPECIE	<i>C. tomentosum</i>

Fuente: Jens A. Pedersen, 2000

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

1.4.5. *Habitad*

Crece en todo tipo de hábitat pero en general son especies de lugares abiertos, siendo la cuenca del Mediterráneo una de las regiones de mayor concentración. En América latina se está reproduciendo como planta silvestre especialmente en la zona interandina como es en la parte Norte de Perú y desde el centro hacia el Sur de Ecuador.

1.4.6. *Usos medicinales*

Clinopodium tomentosum todavía se utiliza en la medicina tradicional de Ecuador como antiséptico oral. Sus propiedades curativas se utilizan para las afecciones gastrointestinales y respiratorias; La gente local utiliza las partes aéreas de la planta para preparar infusiones por su efecto relajante y como agente anti-inflamatorio. (Vera y Naranjo, 2012)

1.4.7. *Estudios realizados*

Los estudios que se han realizado con la planta en el Ecuador fueron dos; el primero fue realizado en la provincia de Pichincha ciudad de Tumbaco, por Mariela Beatriz Vera Saltos; Blanca Fabiola Naranjo Puente; Nicola Malafrente; Alessandra Braca con su tema de investigación “Phenolic compounds from *Clinopodium tomentosum* (Kunth) govaerts (Lamiaceae).” La investigación se trató de aislamiento y la caracterización estructural por métodos espectométricos y espectroscópicos de un compuesto nuevo. Se obtuvieron extractos con solventes de cloroformo-metanol de la hojas de *C. tomentosum*, el cual se sometió a una cromatografía de columna y luego en cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, en el cual se identificó y se aisló un nuevo compuesto (2-*O*-benzoil-3-*O* ácido tartárico-cinnamoyl) y 11 compuestos conocidos. (Vera y Naranjo, 2012)

En la segunda investigación sus autores fueron Maurizio Benzo, Gianluca Gilardoni, Carlo Gandini, Gabriele Caccialanza, Paola Vita Finzi, Giovanni Vidari, Susana Abdo, Patricia Layedra. Como tema de investigación “Determination of the threshold odor concentration of main odorants in essential oils using gas chromatography–olfactometry incremental dilution technique”, la planta se recolectó del Río Chambo de la provincia de Chimborazo; este estudio se trató de identificar la concentración umbral del olor *Clinopodium tomentosum* este análisis se realizó por dos métodos el primero se trataba de un olfato metro y utilizando cromatografía-olfatometría de gases el segundo método es dilución olfactometría la muestra se concentra de forma incrementada a partir de un volumen diluido en aire para que sus compuestos puedan ser disueltos y volatilizados, se utilizó solo cromatografía de gas donde se obtuvo como resultados

que el aceite esencial es rico en monoterpenos, entre los cuales iso- Mentona y pulegona fueron los componentes más abundantes constituyendo 41.7 y 29.9%, respectivamente. (Benzo et al., 2017).

En los estudios con respecto a la actividad antiinflamatoria *in vivo* se realizó una investigación de la familia por Ana Pavla, Diniz Gurgel, Jackeline G. da Silva, Ana Grangeiro, Danielli Oliveira, Cynthia Lima, Aldo CP da Silva con su tema “*In vivo* study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae)”, *Plectranthus amboinicus* es una especie medicinal de uso frecuente en Brasil, para el tratamiento de varias enfermedades incluyendo inflamaciones, la actividad anti-inflamatoria se determinó por el método de edema de plantar inducido por carragenina; aplicando las dosis del estudio con respecto al extracto hidroalcohólico, donde obtuvieron como resultado que hubo disminuciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$) del edema de la pata en dosis de 150, 250 y 350 mg / kg, comprobando su actividad antiinflamatoria en esta planta perteneciente a la familia Lamiaceae. (Burk et al., 2009, pp.397-405).

Otro estudio realizado *in vivo* fue realizado por D. Baricevic, S. Sosa, Della Loggia, Tubaro, B. Simonovska, A Krasna, A. Zupancic que tuvo como tema “Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid” la finalidad fue investigar las propiedades antiinflamatorias por vía tópica, para obtener su aceite se realizó extractos de las hojas por dos solventes diferentes siendo n-hexano y cloroformo. Para provocar la eficacia se produjo un edema en la oreja de la rata, probando cada uno de los extractos con sus respectivas dosis, al probar el extracto del metanol mostro un efecto muy bajo siendo el aceite esencial inactivo mientras que al probar en aceite esencial extraído con cloroformo siendo más potente y activo por esta razón se realizó una investigación química y farmacológica y teniendo como resultado que el componente principal que da la actividad antiinflamatoria es el ácido ursólico siendo dos veces más efectivo que la indometacina que fue utilizado como fármaco de referencia para esta investigación. (Baricevic, 2001)

En cuanto a los que la actividad antiinflamatoria en *Eupatorium glutinosum* se ha realizado un estudio por B. de las Heras; K. Slowing; J. Benedí; E. Carretero; T. Ortega; C. Toledo; P. Bermejo; I. Iglesias; M.J. Abad; P. Gómez-Serranillos; P.A. Liso; A. Villar a,*, X. Chiriboga, quienes a 15 especies Ecuatorianas investigaron su actividad antiinflamatoria por medio de extractos etanólicos comprobando su eficacia en edema plantar inducido por carragenanos, en la planta *E.glutinsum* se comprobó que existe actividad con una disminución de 22,9% en comparación con el resto de especies analizadas. (De las Heras et al, 1998)

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Lugar de investigación

La presente investigación se llevó a cabo en los Laboratorios de Productos Naturales y Farmacognosia en cuanto a proceso de la muestra e identificación de compuestos; en el laboratorio de Análisis Instrumental para el control de calidad de la droga cruda y extracto y en el Bioterio para realizar el diseño experimental de la investigación, todos estos laboratorios pertenecen a la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

2.2 Recolección del material vegetal

El *Clinopodium tomentosum* comúnmente conocido como “Pumín” se recolectó en la ciudad de Riobamba en la parroquia Lizarzaburo con unas coordenadas de 1°40'11.2"S y 78°40'47.1"W

2.3. Reactivos biológicos

Para la evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria se utilizó 24 ratas (*Rattus norvegicus*), conformadas en 4 grupos de 6 ratas, 3 ejemplares para el grupo control en este caso que fue un blanco, como estándar farmacéutico diclofenaco de 100mg y se usó el matico (*E. glutinosum*) como extracto estandar; los 3 grupos restante fueron tomados para tratamientos en tres dosis diferentes.

2.3.1. Descripción

Tabla 1-2 Descripción animales de experimentación *Rattus norvegicus*

Nomenclatura	Cr1 (WI) BR
Edad	2-3 meses
Peso promedio	200 – 250g
Sexo	Hembras

Lugar de nacimiento	Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (INSP)
----------------------------	---

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

2.3.2. Condiciones Ambientales

Tabla 2-2 Condición ambiental que fueron sometidas las ratas

Temperatura	25 ± 2 ° C
Humedad	45 ± 5 %
Período de fotoluminiscencia	12 Horas de luz y 12 Horas de oscuridad
Alimentación	Ad libitum
Tiempo de ambientación	15 días
Cama	Tamo de arroz previamente esterilizado, cambio cada 48 horas

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

2.4. Equipos y reactivos

2.4.1. Equipos

- Molino Arthur H. Thomas
- Balanza analítica Radwag S 220.R2
- Rotavapor BUCHI CH-9230 FLAWIL-SCHWEIZ
- Sonicador 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

2.4.2. *Materiales*

- Soporte Universal
- Pinzas Universales
- Embudos de Separación de 250 mL
- Picnómetros
- Balones aforados de 10, 50, 100 y 200mL
- Balón esmerilado de 500mL
- Vasos de precipitación de 25, 50, 100, 250 y 500mL
- Probetas de 10, 25, 50 y 100 mL
- Pipetas de 1, 5, 10mL
- Pipeta volumétrica de 5 mL
- Cápsulas de porcelana
- Crisol
- Piseta
- Embudos
- Trípodes
- Termómetro
- Espátulas
- Pera de succión
- Varilla de vidrio
- Pinzas para cápsula
- Pinza para tubos
- Matraz 250ml
- Mangueras para refrigerante
- Tubos de ensayo
- Reverbero Eléctrico
- Malla metálica
- Gradilla
- Equipo de destilación
- Refrigerante

- Papel filtro
- Papel Aluminio
- Guantes estériles
- Mascarillas
- Zapatones
- Jeringuillas de 1 y 3 mL (NYPRO)
- Cánulas
- Papel milimetrado
- Franela
- Micropipeta automática de 1000uL
- Micropipeta automática de 100uL
- Puntas azules de 1000uL
- Puntas amarillas de 100uL

2.4.3. Reactivos

- Alcohol 96%
- Alcohol antiséptico
- Gel antiséptico
- Éter dietílico
- Ácido acético
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Wagner
- Cloroformo
- Ácido sulfúrico
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de potasio
- Amonio 5% agua
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Sudan III
- Cloruro férrico
- Cloruro de sodio
- Magnesio metálico
- Alcohol amílico
- Reactivo de Fehling

- Sílica gel 60F254 (Merck)
- Metanol
- Acetato de etilo
- Formol al 40%
- Acetato de etilo
- Ácido acético glacial
- Cloruro de Aluminio
- Polietilenglicol
- Soluciones de ácido gálico
- Nitrito de Sodio 5%
- Tricloruro de aluminio 10%
- Hidróxido de sodio 1M
- Soluciones de quercetina
- Carbonato de sodio al 20%
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 20%
- Solución de DPPH* (60 uM)
- Solución de carragenina al 1%
- Solución de Diclofenaco Sódico
- Carboximetilcelullosa (CMC)

2.5. Métodos y técnicas

La metodología que se utilizó en la experimentación se ilustra de forma resumida en la Figura 1-2 donde se interpreta las técnicas y procedimientos empleados para el control de calidad del extracto, análisis cuantitativo de fenoles, flavonoides y radicales libres mediante espectrofotometría y la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*.

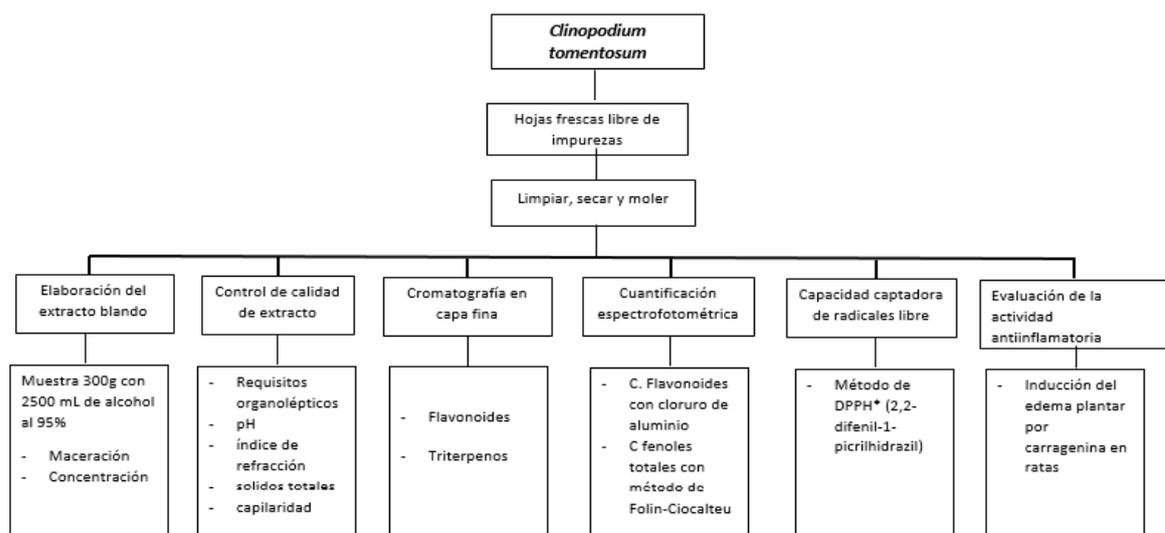


Figura1-2: Registro de la investigación

Realizado por: Culqui,2017

2.5.1. Comprobación Taxonómica

La identificación y la comprobación correcta de la especie *Clinopodium tomentosum* se realizó en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por el Ingeniero Jorge Caranqui con se muestra en el ANEXO A

2.5.2. Acondicionamiento de material vegetal

2.5.2.1. Secado

En la elaboración del extracto etanólico se utilizó las hojas de *Clinopodium tomentosum*, las hojas secadas sobre papel de empaque en una superficie plana; esto se realizó en un lugar seco y oscuro a una temperatura ambiente en un lapso de 15-20 días.

Se controló periódicamente la temperatura y ventilación, para evitar contaminación; se removieron las hojas para favorecer un secado completo y acelerado.

2.5.2.2. Molienda

Una vez seco la materia prima se procedió a moler, esta actividad se realizó en un molino de cuchillas giratorias marca Arthur H Thomas CO, para conseguir partículas iguales.

2.5.3. Obtención del extracto etanólico

A 300g de muestra seca y molida de *C. tomentosum* se depositó en un frasco de vidrio ámbar, y se realizaron 3 maceraciones con la misma muestra donde se añadió 1000mL de alcohol al 96%, en la primera y segunda se añadió 1000mL y 500mL respectivamente, cada maceración se dejó reposar por 48 horas con agitaciones permanentes, se filtró al vacío en un kitasato y se concentró en un rotavapor con una temperatura menor a 60°C se controló su presión y temperatura, la concentración se realizó hasta evaporar toda la cantidad de alcohol donde se obtuvo un extracto blando.

2.5.4. Control de calidad de la droga cruda

Para realizar este tipo de control se basó en técnicas establecidas mediante el Manual de prácticas de Laboratorio de Farmacognosia. 1986. (Miranda, 1986)

- Determinación del contenido de humedad: METODO GRAVIMETRICO
- Determinación de cenizas totales
- Determinación de cenizas solubles en agua
- Determinación de cenizas solubles en ácido clorhídrico

2.5.4.1. Parámetros de Calidad de los Extractos

El control de calidad físico se realizó de acuerdo a las Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992; y la Real Farmacopea Española.

2.5.4.2. Parámetros de Calidad Químicos:

El tamizaje fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales compuestos que se encuentran presenten ya sea con evidencias altas o leves. El Screening fitoquímico está fundamentado en la extracción de la planta con solventes adecuados y la aplicación de reacciones de coloración y precipitación.

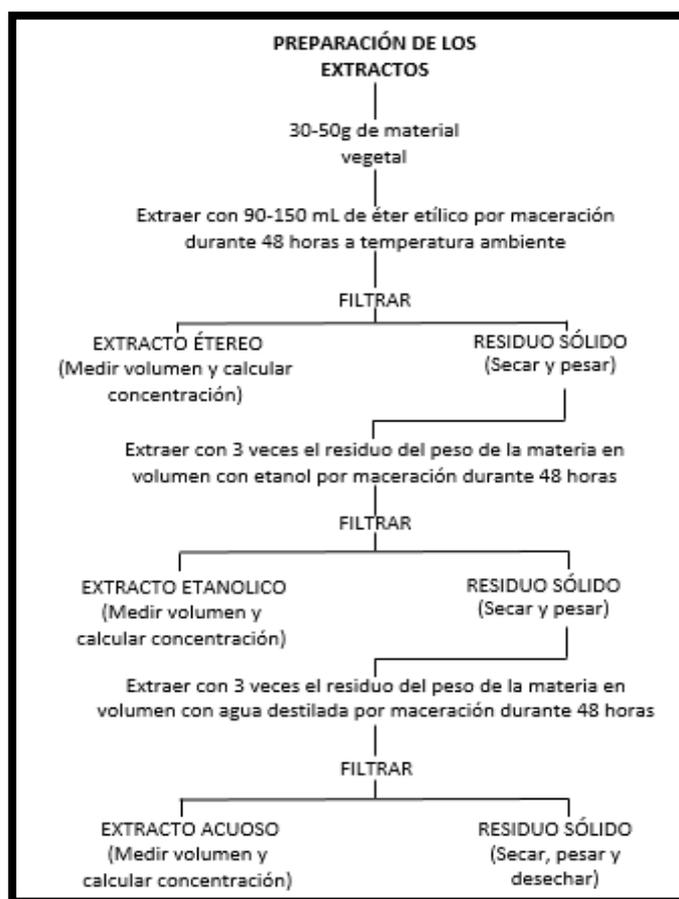


Figura 2-2: Elaboración de los extractos para tamizaje fitoquímico
Realizado por: Ximena Culqui, 2017

Las pruebas de identificación de los compuestos se realizaron según la Tabla 3-2 de cada uno de los extractos por el tamizaje. (Farmacopea Española)

Tabla 3-2 Tamizaje fitoquímico para cada extracto

EXTRACTO	ENSAYO	COMPUESTOS
E. Etéreo	SUDAN	Aceites y grasas
	BALJET	Lactonas y coumarinas
	LIEBERMANN-BUCHAR	Terpenos y Esteroides
	DRAGENDORF MAYER WAGNER	Alcaloides
E. Etanólico	CATEQUINAS	
	RESINAS	
	FEHLING	Azucares Reductores
	BALJET	Lactonas y coumarinas
	LIEBERMANN-BUCHAR	Terpenos y esteroides
	ESPUMA	Saponinas
	CIFe ₃	Fenoles y taninos
NIHIDRINA	Aminoácidos	

	BORNTRAGER	Quinonas
	SHINODA	Flavonoides
	KEDDE	Cardenolidos
	ANTOCIANIDINA	
	DRAGENDORF MAYER WAGNER	Alcaloides
E. Acuoso	DRAGENDORF MAYER WAGNER	Alcaloides
	CIFe ₃	Fenoles y taninos
	SHINODA	Flavonoides
	FEHLING	Azucares reductores
	ESPUMA	Saponinas
	MUCILAGOS	estructuras tipo polisacárido
	PRINCIPIOS AMARGOS	

Fuente: Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992
Realizado por: Ximena Culqui, 2017

2.5.5. *Parámetros de Calidad Físicos del extracto blando*

2.5.5.1. *Determinación de los requisitos organolépticos*

➤ Determinación del olor

Se tomó una tira de papel filtro de 1 cm de ancho por 10 cm de largo aproximadamente y se introdujo el extremo de la tira en la muestra del extracto blando que estuvo previamente disuelto en alcohol. Se percibió y se determinó su olor característico.

➤ Determinación del color

El extracto blando se disolvió en alcohol y se llenó aproximadamente 2cm en un tubo de ensayo seco y limpio, donde se observó su color.

➤ Determinación del sabor

En el borde de la palma de la mano o en el dedo índice se colocó una pequeña cantidad de muestra del extracto e inmediatamente se tomó contacto con la punta de la lengua realizando la evidencia de su sabor

2.5.5.2. *Determinación del pH*

La medición del pH se hizo por medio de un lector de pH (pHmetro), digital. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste del pHmetro, una solución reguladora. (Normas Ramales para Drogas crudas y extractos y tinturas, 1992)

La medición del pH del extracto se realizó introduciendo el electrodo en la muestra y se procedió a tomar la lectura hasta que sea estable por 15 segundos aproximadamente.

2.5.6. *Cromatografía en capa fina*

2.5.6.1. *Cromatografía para flavonoides*

Para la detección de flavonoides en cromatografía de capa fina se realizó con el método de Hildebert Wagner y Sabine Bladt, 2003. (Wagner y Bladt, 1996)

- Se pesó 0,02g del extracto blando y se añadió 10mL de alcohol al 96%
- En una placa de Sílica gel 60 F254 (Merck) a un centímetro del borde inferior se colocó 10uL de la muestra con ayuda de un capilar. Se aplicó por 5 veces y se dejó secar a temperatura ambiente
- La fase móvil estaba compuesta de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:1126)
- Se retiró la placa de sílica de la cuba y dejó secar. Una vez seco se observó en la cámara UV a una longitud de onda 254nm
- Se reveló la placa con cloruro de aluminio al 1%, se dejó secar y luego se observó nuevamente en la cámara UV
- Para tener un mejor revelado de la placa se realizó con Polietilenglicol al 2%

Ecuación de resultados:

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

2.5.6.2. Cromatografía para triterpenos

Para la detección de triterpenos se realizó según la técnica establecida por Wall M.D y colaboradores. (Ferrer et al, 2007)

- Se pesó 0,02g del extracto blando y se añadió 10mL de alcohol al 96%
- En una placa de Sílica gel 60 F254 (Merck) a un centímetro del borde inferior se colocó 10uL de la muestra con ayuda de un capilar. Se aplicó por 5 veces y se dejó secar a temperatura ambiente
- La fase móvil estuvo compuesta de cloroformo: acetato de etilo (50:50)
- Para revelar la placa se usó reactivo de vainillina al 2% en ácido perclórico al 50%, la placa con el revelador se colocó en una plancha metálica que tuvo contacto con calor moderado por 1 a 3 minutos.

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

Las concentraciones de fenoles totales de cada uno de los extractos fueron medidos por espectrofotometría, fundamentando la técnica basada en una reacción colorimétrica de óxido-reducción en donde se utilizó como agente oxidante el reactivo de Folin-Ciocalteu. (Khamis y Amzad, 2016)

En la cuantificación de los fenoles, se realizó una curva de calibración con un estándar de ácido gálico, para su curva de calibración se llevaron a cabo usando concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100ppm.

Las lecturas de las absorbancias de las concentraciones de la muestra y del estándar se realizaron de acuerdo al siguiente procedimiento.

- Se tomó 2mL de la muestra o estándar de ácido gálico y se añadió 0,5mL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 20%. Se dejó reposar por 5 min.
- La mezcla se añadió 5mL de agua destilada y 0,5mL de NaCO₃ AL 20%. Se dejó reposar por 1 hora en la obscuridad protegiendo de la luz y a temperatura ambiente.
- Se procedió a leer las absorbancias en el espectrofotómetro a una longitud de onda $\lambda=765\text{nm}$
- Se trazó la curva de calibración.
- Las unidades fueron expresadas como miligramos equivalentes de ácido gálico por mL de extracto

2.5.8. Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico

Se realizó una curva de calibración con una solución estándar de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm. (Khamis Al-Jadidi & Amzad Hossain, 2016)

Se realizó las lecturas de las absorbancias tanto de la muestra como de la solución estándar de la siguiente manera:

- Se tomó 100uL de la muestra o solución patrón, se agregó 300uL de NaNO_2 al 5% p/v y 5 mL de agua destilada. Se dejó reposar por 5 minutos
- A la mezcla agregó 300uL de AlCl_3 al 10% p/v. se dejó reposar por 6 minutos
- Se añadió 2mL de NaOH 1M. y se dejó reposar por 5 minutos.
- Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una $\lambda = 510 \text{ nm}$
- Se elaboró la curva de calibración respectiva
- Las unidades se expresaron como miligramos equivalentes de quercetina por mL de extracto

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

Para la captación de radicales libre se utilizó el método de DPPH*.

Como fundamento se adjunta que una molécula antioxidante es capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La defensa del sistema antioxidante está formado por compuesto de:

Naturaleza enzimática como:

- superóxido dismutasa,
- catalasa,
- glutatión peroxidasa,

Naturaleza no enzimática como:

- vitamina E,
- beta-caroteno,
- vitamina C,
- glutatión reducido,
- albúmina,
- flavonoides y
- metales de transición como Se, Cu, Zn, entre otros

2.5.9.1. Preparación solución de DPPH*

- Se pesó 5,8g la muestra de DPPH* , con ayuda de una espátula de acero
- La muestra se llevó a un balón de aforo de 250mL y se aforó con metanol; esta solución se encontraba a una concentración de 60 μ m, esto se basó en el método propuesto por Brand-Williams
- Se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda $\lambda= 15$ nm
- Si se obtiene absorbancias superior a 0,560 se debe ajustar con adición de metanol.

2.5.9.2. Preparación de la muestra y cuantificación de la capacidad captadora de radicales libres.

En el análisis de cuantificación de la capacidad captadora de radicales libre, se elaboró una curva en la que indicó la cinética de la reacción, esta se realizó a partir de la muestra madre de ácido gálico con diluciones de menor concentración de 10, 20, 40, 60 y 80ppm; para la muestra estándar o extracto se procedió con la siguiente técnica:

- Se tomó 100uL de la muestra
- Se añadió 3,9 mL de la solución de DPPH*
- Se dejó en reposo por el lapso de 1 hora bajo la obscuridad
- Las lecturas de absorbancia se realizaron en el espectrofotómetro a una longitud de onda 515nm.

2.6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se utilizó la prueba de edema plantar inducido por carragenina que fue propuesto por Winter.

2.6.1. Prueba de edema plantar en ratas (*Rattus norvegicus*) inducido por Carragenina

El fundamento en esta técnica se basa en la administración subcutánea de una solución de carragenina a un nivel de la aponeurosis plantar de la rata, la carragenina produce una inflamación porque esta sustancia estimula la producción de prostaglandina, dicha producción se deriva del metabolismo del ácido araquidónico promoviendo los procesos inflamatorios-inmunológicos y angiogenicos. (Himanshu et al., 2015, pp. 1277-1282)

Para la investigación se utilizaron 24 ratas para 6 tratamientos diferentes cada uno de ellos con 4 animales de experimentación, realizando el ensayo con cuatro repeticiones como se indica en el diseño experimental.

Se realizó el experimento en base a dos etapas:

a) ETAPA 1: DE AMBIENTACION

Esta etapa de ambientación se basó en que los animales de experimentación fueron sometidos a condiciones iguales como es la temperatura, humedad, tiempo de luz/obscuridad y alimentación como se indica en la Tabla 2-2; también se tuvo contacto entre investigador-animal para estar adaptado el uno con el otro, con ello no presentaron estrés y no conllevaron a errores. Este proceso de adaptación tuvo una duración de 2 semanas

b) ETAPA 2: DISEÑO EXPERIMENTAL

- En la aplicación de la dosis del tratamiento los animales se encontraban con 12 horas de ayuno, esto ayudó a una mejor absorción del tratamiento.
- Una vez transcurridas las 12 horas se procedió administrar la dosis de tratamiento señalada para cada animal, como se indica en la siguiente Tabla 4-2.

Tabla 4 -2: Diseño de la evaluación de la Actividad Antiinflamatoria “*in vivo*”.

CÓDIGO	GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS	CANTIDAD DE ANIMALES
T1	Grupo negativo	Blanco	----- (1mL)	4
T2	Grupo positivo (fármaco)	Diclofenaco	100 mg/Kg (1mL)	4
T3	Grupo positivo (planta)	<i>Eupatorium glutinosum</i> (Matico)	100 mg/Kg (1mL)	4
T4	Grupo investigación 1	<i>Clinopodium tomentosum</i>	300 mg/Kg (1mL)	4
T5	Grupo investigación 1	<i>Clinopodium tomentosum</i>	100 mg/Kg (1mL)	4
T6	Grupo investigación 1	<i>Clinopodium tomentosum</i>	25 mg/Kg (1mL)	4

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

- Para el volumen de dosificación se realizó de acuerdo a la concentración y peso de la rata. (ver ANEXO P)
- La administración del extracto fue por vía oral con su vehículo respectivo carboximetilcelulosa (CMC) al 10% solvente que permite una mejor solubilidad y una dispersión homogénea del extracto; su forma farmacéutica fue una suspensión que se administró por medio de una cánula que llevó al extracto aproximarse al estómago de la rata.
- Se procedió a inducir la inflamación por carragenina con administración subcutánea a un volumen de 0,1 mL en la aponeurosis plantar de la pata derecha de la rata, tomando en cuenta las normas de bioseguridad (desinfectar el área antes de la inyección)
- Se midió con papel milimetrado y se tomó una imagen fotográfica del área de la pata en cada uno de los tiempos, desde el tiempo cero hasta la hora siete.
- Se tomó mediciones del área de la pata a ½ , 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 horas
- Se calculó el área de la pata del animal de experimentación utilizando un programa IMAGEJ, el cual por medio de fotografías se obtuvo el valor del área
- Con los resultados obtenidos del área se procedió a determinar el porcentaje de inflamación utilizando la siguiente formula

$$\%Inflamación = \frac{At - Ao}{Ao} \times 100$$

Donde:

At: Área de la pata inflamada a un tiempo X

Ao: Área normal (antes de aplicar carragenina)

2.6.2. Análisis estadístico

Para este análisis se utilizó un programa de SPSS versión 22, por medio del test ANOVA de un factor nos ayudó a identificar si existe diferencia significativa entre grupos de tratamiento investigados, con una probabilidad $p < 0,05$. Realizando el planteamiento de las hipótesis, siendo las siguientes:

Ho: no existe diferencia significativa en cada uno de los tratamientos administrados a los animales de experimentación por medio de la inducción del edema plantar. $P \geq 0,05$

H1: existe diferencia significativa por lo menos en uno de los tratamientos administrados $p < 0,05$
Si se acepta la hipótesis nula se concluye que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero si se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa con la finalidad que uno de los tratamientos tiene diferencia se procede a realizar el test de Tukey-B donde se determina en cuál de los grupos de tratamiento existe la diferencia significativa con ayuda del porcentaje de inflamación

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS

3.1. Obtención del extracto etanólico de *Clinopodium tomentosum*

El porcentaje de rendimiento se obtuvo por medio de tres maceraciones continuas, mostrando en la Tabla 1-3 los resultados obtenidos de *C. tomentosum*, siendo este de 11,66%

Tabla 1-3: Extracto obtenido de la droga vegetal de *Clinopodium tomentosum*

Gramos de la muestra seca de <i>C. tomentosum</i>	Gramos del extracto blando de <i>C. tomentosum</i> .	Porcentaje de rendimiento de la planta
400g/2500mL de alcohol	46,638 g de extracto	11,659%

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

3.2. Determinación del análisis químico del material vegetal

La finalidad de realizar este análisis es garantizar la identidad, pureza y contenidos en principios activos o marcadores de la droga cruda, es decir, que no contenga sustancias extrañas, adulteraciones o falsificaciones.

Tabla 2-3: Análisis químico de la materia vegetal

PARÁMETROS	PORCENTAJE DROGA CRUDA <i>Clinopodium tomentosum</i>	VALORES DE REFERENCIA
Determinación de humedad	11,23 ± 0,0613	14%
Determinación de cenizas totales	3,49 ± 0,08798	5%
Determinación de cenizas solubles en agua	1,79 ± 0,07595	2%
Determinación de cenizas solubles en HCl	0,89 ± 0,0348	1%

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

Los valores obtenidos en la Tabla 2-3 muestran cada uno de los parámetros analizados de la materia vegetal como son la humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua, cenizas solubles en HCl teniendo todos sus resultados dentro de los valores de referencia por la Farmacopea

Española, 2012. Por lo tanto la droga cruda de *Clinopodium tomentosum* se encuentra dentro de los parámetros para garantizar que la droga es de calidad con una adecuada inocuidad.

3.3. Parámetros de calidad químico-cualitativo: tamizaje fitoquímico

Es realizar el tamizaje fitoquímico permite identificar cualitativamente los principales metabolitos de la planta y así poder orientarse cuál es el solvente adecuado para el aislamiento de los compuestos o metabolitos de mayor interés.

El tamizaje fitoquímico se realizó tanto en *Clinopodium tomentosum* como *Eupatorium glutinosum* planta de referencia para comparar su actividad antiinflamatoria al (Matico) que fue estudiada y comprobada la actividad antiinflamatoria. (De las Heras et al, 1998)

Tabla 3-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de la planta *Clinopodium tomentosum*

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

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

En el solvente etéreo se realizaron los ensayos respectivos evidenciado la presencia de aceites y grasas como también triterpenos y esteroides; mientras que en el solvente etanólico se presenciaron los siguientes compuestos cumarinas, triterpenos y esteroides, saponinas, fenoles y taninos, con una leve evidencia resinas, quinonas, flavonoides; y por último en el solvente acuoso se obtuvieron alcaloides y levemente saponinas, fenoles y taninos. Los resultados se pueden observar en la Tabla 4-3. El tamizaje permitió conocer los principales compuestos de *C. tomentosum*, como son aceites y grasas, cumarinas, triterpenos, fenoles y taninos, levemente se presenciaron resinas, flavonoides y quinonas.

La identificación de compuestos secundarios de esta especie se ha realizado en una investigación realizada por Verónica Bodero, 2010 donde los metabolitos secundarios identificados concuerdan con los obtenidos en la Tabla 3-3. (Bodero, 2010)

Se ha tomado en cuenta a especies pertenecientes a la misma Familia, en este caso un estudio realizado por QF. Beltrán Carlos, 2013 quien realizó un tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana en ella se incluye a *Hyptis Capitata* perteneciente a la familia de las Lamiaceae identificando los mismo compuesto que *C. tomentosum*, con la única diferencia que se pudo encontrar glucósido y los flavonoides fueron de una evidencia más clara. (Beltran et al., 2013).

Según Mohammad Amzad Hossain y otros, 2013 realizó un estudio de identificación de metabolitos de *Thymus vulgaris* en la cual se identificó compuestos similares a los de *C. tomentosum* siendo los más evidentes flavonoides, compuestos fenólicos y esteroides, esta muestra fue recogida en la Península de Iberia. (Hossain et al., 2013, pp.705-710)

En las Lamiaceae el género más utilizado para investigaciones es *Salvia officinalis*, una investigación de identificación de compuestos fue realizada por MSc. Ester Sánchez Govín y otros 2005 donde se encontró triterpenos, esteroides, carotenos, azúcares, fenoles, taninos, flavonoides, mucílagos y aceites esenciales, estos compuestos coinciden con la identificación de la planta en estudio. (Sánchez et al., 2005)

Tabla 4-3: Resultados del tamizaje fitoquímico de la planta *Eupatorium glutinosum* (Matico)

ENSAYO	TIPO METABOLITO	EXTRACTO ETÉREO	EXTRACTO ALCOHÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Sudan	Aceites y Grasas	-	-	
Dragendorff	Alcaloides	-	-	+
Mayer	Alcaloides	-	-	-

Wagner	Alcaloides	-		+
Baljet	Cumarinas	-	-	
Liebermann- Buchard	Triterpenos- Esteroides	+	+	
Catequinas	Catequinas		+	
Resinas	Resinas		+	
Fehling	Az. Reductores		-	-
Espuma	Saponinas		-	-
Cl ₃ Fe	Fenoles y Taninos		+	+
Borntrager	Quinonas			
Shinoda	Flavonoides		+	-
Antocianidina	Flavonoides		++	
Ninhidrina	Aminoácidos		-	
Mucílagos	Polisacáridos			-
Principios amargos	Principios amargos			+

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

En la planta que se utilizó como referencia se realizó el tamizaje fitoquímico correspondiente como se puede observar en la Tabla 5-3. Para el extracto etéreo se presencia una baja evidencia de un solo compuesto que es triterpenos y esteroides, mientras que en el extracto etanólico se identificó triterpenos y esteroide, catequinas y resinas, fenoles y taninos con una baja evidencia y flavonoides se evidencio claramente, en el extracto acuoso se presencié una baja evidencia de alcaloides, fenoles y taninos, en el extracto etanólico se evidencio levente los siguientes compuestos alcaloides, fenoles y taninos, como también principios amargos.

En estudios con respecto al *Eupatorium glutinosum* se realizó un tamizaje fitoquímico por Jorge Arroyo y otros, 2012 quienes tomaran a esta planta con otro tipo de sinonimia siendo *Piper aduncum* recolectado de la ciudad de Lima, los metabolitos secundarios que se identificó con una alta evidencia fue flavonoides, con evidencia normal se encontró alcaloides, saponinas, compuestos fenólicos, aceites y taninos y con una leve evidencia esteroides y quinonas, esto quiere decir que hay mucha semejanza a los resultados obtenidos de *Eupatorium glutinosum*. (Arroyo et al., 2012, pp. 275-280)

A los compuestos secundarios que les atribuye la actividad antiinflamatoria son los flavonoides y terpenos es por ello que los tamizajes realizados se enfocaron a presenciar estos compuestos los cuales están presentes en las dos especies analizadas.

3.4. Determinación de los requisitos organolépticos del extracto blando de *Clinopodium tomentosum*.

El realizar este tipo de ensayo permitió confirmar la identidad propia de la droga cruda, permitiendo comprobar que no esté contaminada por sustancias extrañas que puedan alterar a la planta modificando los resultados próximos a realizarse.

El control de calidad del extracto blando de *C. tomentosum* se realizó conforme lo indica Normas ramales para drogas crudas, extractos y tinturas, 1992

Tabla 5-3: Resultados de requisitos organolépticos.

Parámetros	Extracto de <i>C. tomentosum</i>
OLOR	Menta
COLOR	Verde
SABOR	Picante
pH	T° 18°C 4,31 ± 0,0513

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

En la Tabla 5-3 se observa cada uno de los parámetros obtenidos donde el olor fue similar a la fragancia de la menta, el color verde intenso, por ultimo presento un sabor amargo estas características obtenidas son propias de la planta.

El valor del pH determinado tiene un valor de $4,31 \pm 0,0513$, esto se debe a las sustancias que se extraen por medio del extracto, como es la presencia de flavonoides, fenoles y taninos, oleico, ácidos orgánicos que le dan el carácter ácido

3.5. Cromatografía en capa fina

3.5.1. Análisis cromatográfico para identificación de flavonoides

Para la fase móvil de identificación de flavonoides de *C. tomentosum* y *E. glutinosum* se utilizó los siguientes solventes acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:26) respectivamente como revelador Cloruro de aluminio 1% y potenciador Polietilenglicol 2%.

Clinopodium tomentosum



Figura 1-3: Cromatografía en capa fina para flavonoides de *C. tomentosum*

Realizado por: Ximena Culqui, 2016

Tabla 6-3: Resultado de Rf flavonoides *C. tomentosum*

Manchas observadas	Calculo Rf	Posible Compuesto Identificado
1	$Rf=5,01/8,5= 0,59$	Hiperosido

Elaborado por: Ximena Culqui, 2017

En la Tabla 6-3 se puede observar los resultados obtenidos del compuesto identificado de *Clinopodium tomentosum*, donde se calculó su RF respectivo 0,59; según fuentes bibliográficas de Wagner y Sabine Bladt.2003 pertenece a Hiperosido (glicósido flavonoideo) con un Rf de 0,6; siendo un compuesto derivado de la quercetina. (Wagner y Bladt, 1996)

Eupatorium glutinosum

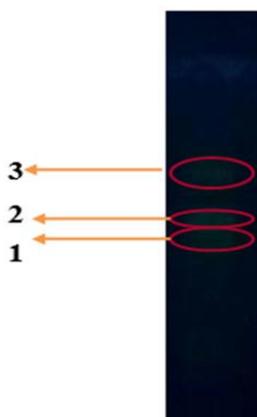


Figura 2-3: Cromatografía en capa fina para flavonoides de *E. glutinosum*

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

Tabla 7-3: Resultado de Rf flavonoides *E. glutinosum*.

Manchas observadas	Calculo Rf	Posible Compuesto Identificado
1	$Rf=3,2/8,5= 0,47$	-
2	$Rf=4,1/8,5= 0.51$	Ácido clorogénico
3	$Rf=5,0/8,5= 0,63$	Hiperosido (Derivado de quercetina)

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

En la TLC que se realizó a *E. glutinosum* se observaron 3 manchas muy claras como se puede observar en la Figura 2-3, en las que se identificó los posibles compuestos calculando sus respectivos Rf como indica la tabla 6-3 siendo evaluados según Wagner y Sabine Bladt, 2003; el primer con un Rf de 0,47 no perteneció a ningún compuesto, el segundo compuesto identificado con Rf de 0,51 es posiblemente el ácido clorogénico, mientras que con un Rf de 0,63 el permisible compuesto fue hiperosido que es un derivado de la quercetina. (Wagner y Bladt, 1996)

3.5.2. Análisis cromatográfico para identificación de triterpenos

Para la identificación de triterpenos en *C. tomentosum* como fase móvil se utilizó cloroforma y acetato de etilo en concentraciones 50:50, como revelador se trabajó con vainillina al 2% en ácido perclórico al 50%.

Clinopodium tomentosum

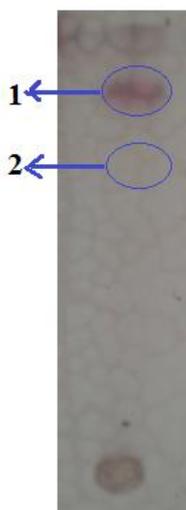


Figura 3-3: Cromatografía en capa fina para triterpenos de *C. tomentosum*

Realizado por: Ximena Culqui, 2016

Tabla 8-3: Resultado de Rf triterpenos *C. tomentosum*

Manchas observadas	Calculo Rf	Posible Compuesto Identificado
1	6,8/7,3=0,93	Ácido oleanólico
2	5,0/7,3=0,68	Ácido ursólico

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

Para la identificación de triterpenos en *C. tomentosum* con la cromatografía respectiva se observó 2 manchas las mismas que se pueden observar en la Figura 3-3, la primera mancha siendo más oscura con su Rf de 0,93 pudiendo tratarse del ácido oleanólico, la segunda es una mancha leve con su Rf de 0,68 del ácido ursólico, que fueron compuestos comparados con una fuente bibliográfica de un estudio realizado por Serrano Carlos y otros, 2016; quienes realizaron un estudio de Cuantificación de ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido rosmarínico con Rf de 0,52; 0,64 y 0,90 respectivamente, en tres especies peruanas de *Clinopodium* es por ello que los compuestos encontrados tienen similitud con esta investigación. (Serrano et al, 2016, pp.333-350) Este método no fue comprobado con estándares es por ellos que se compara con estudios realizados.

3.6. Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu

En la cuantificación de fenoles totales se elaboró una curva de calibración, como solución estándar se utilizó ácido gálico con concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm, mediante las absorbancias obtenidas se elaboró la ecuación de la recta $y=0,005+0,1925x$, con un coeficiente de correlación $R=0,9820$; la ilustración de la curva de calibración se puede observar en el ANEXO T.

Tabla 9-3: Resultado de cuantificación de Fenoles totales

Extractos	Concentración ppm	mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto	Porcentaje
<i>Clinopodium tomentosum</i>	2000 ppm	13,366 mgEQ/mL	1,337 %
<i>Eupatorium glutinosum</i>	1111 ppm	43,663 mgEQ/mL	4,366 %

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

En los resultados obtenidos en la cuantificación de fenoles totales se observa en la Tabla 9-3, donde 1,333% de porcentaje con 13,366 mgEQ/mL de extracto a una concentración de 2000ppm estos valores pertenecen a *C. tomentosum*, mientras que 4,366% de porcentaje con 43,663 mgEQ/mL a una concentración de 2000 ppm que pertenece a *E. glutinosum*; fueron realizados

con diferentes concentraciones (ppm) para que puedan ingresar a la curva de calibración. De las dos especies analizadas la que tuvo mayor porcentaje de compuestos fenólicos fue *E. glutinosum*. No se ha evidenciado investigaciones de la cuantificación de fenoles totales con respecto a *C. tomentosum*, es por ello que para su referencia se utilizó el estudio realizado por Bouterfasa K. y otros, 2016; que trabajo con *Marrubium vulgare* (Linnaeus) teniendo un valor de 40,7mgEQ/g, equivalente a 0,407 mgEQ/mL siendo un valor menor al valor obtenido de *C. tomentosum* (Bouterfasa et al., 2016, pp. 453-463.)

Un estudio realizado por Mouna Ben Farhata y otros, 2013 realizó la cuantificación de diferentes especies de *Salvia*, siendo sus valores de 67,67 a 72,02 mgEQ/g para extracto de *S. argéntea* y 112,93 a 161,37 mgEQ/g de extracto *Salvia officinalis*; de los valores analizados el segundo extracto tiene mayor similitud con respecto al valor obtenido de la cuantificación de fenoles totales. (Mouna et al, 2013)

Para tomar referencias con los valores obtenidos de *E. glutinosum* con respecto a la cuantificación de fenoles, no se han realizado estudios, esto puede deberse a que es una planta propia del Ecuador. Los valores de las cuantificaciones varía en cada una de las especies, esto puede deberse del lugar de donde proviene la muestra, la época en que ha sido recolecta, habitat, compuesto que lo conforman y sus condiciones de movilización.

3.7. Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico

En la cuantificación de flavonoide totales se realizó una curva de calibración, para ello se utilizó una solución estándar de quercetina a diferentes concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm; obteniendo la ecuación de la recta $y=0,0009+0,0066x$ su coeficiente de correlación de $R^2= 0,9991$. En el ANEXO U se encuentra la interpretación de la curva con sus respectivas interpolaciones.

Tabla 10-3: Resultado de cuantificación de flavonoides totales

Extractos	Concentración ppm	mg equivalentes de quercetina/mL de extracto	Porcentaje
<i>Clinopodium tomentosum</i>	5000 ppm	1,680 mgEQ/mL	0,168 %
<i>Eupatorium glutinosum</i>	1000 ppm	4,585 mgEQ/mL	0,459 %

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

Se puede observar en la Tabla 10-3, los resultados de la cuantificación de flavonoides para *C. tomentosum* con un porcentaje de 0,168% y para *E. glutinosum* presenta 0,459% siendo este

mayor, esto quiere decir que hay mayor presencia de flavonoides totales. A concentraciones de 5000 ppm de *C. tomentosum* se encontró 1,680 mg equivalentes de quercetina por cada mL de extracto, mientras que a una concentración de 1000ppm de *E. glutinosum* se identificó 4,585 mg equivalente de quercetina por cada mL de extracto, cada uno de los extractos se encuentran a diferentes concentraciones debido a que con estas pueden entrar en la curva de calibración y así poder tener el valor de la absorbancia adecuada.

Estudios de cuantificación de *C. tomentosum* de cuantificación de flavonoides totales no se ha realizado, por ello para poder referenciar se hizo con una especie *Marrubium vulgare* (Linnaeus), perteneciente a la misma familia, según Bouterfasa K. y otros, 2016 quienes al realizar la cuantificación de flavonoides se obtuvo un valor de 160mgEQ/g que es igual a 1,6mgEQ/mL siendo un valor similar al que se ha analizado. (Bouterfasa et al., 2016, pp. 453-463.)

Lo que concierne al *E. glutinosum* se obtuvo un valor de 4,585mgEQ/mL el cual se comparó con estudio de Soto Marilú, 2015; al realizar la cuantificación de flavonoides usando al Matico con una sinonimia de *Piper aduncum* teniendo un valor de 2,51mgEQ/100g siendo este valor menor al obtenido en la investigación. (Marilú, 2015)

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

Para la cuantificación de fenoles totales de los extractos se elaboró una curva de calibración con una solución estándar de ácido gálico, obteniendo una ecuación exponencial de $y = 0,799e^{-0,024x}$ con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,9817$; para la elaboración de la curva se utilizó concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm.

Para que los valores de las absorvancias sean los correctos se realizó diluciones con la finalidad de que estén dentro de la curva de calibracion. En el ANEXO V se encuentran las interpolaciones pertenecientes a las curva.

Tabla 11-3: Resultados obtenidos de los radicales libres por método de DPPH*

Extractos	Concentración ppm	Concentración inhibitoria media ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje de ACRL
<i>Clinopodium tomentosum</i>	2000ppm	47,751 $\mu\text{g/mL}$	64,25 %
<i>Eupatorium glutinosum</i>	1111 ppm	85,359 $\mu\text{g/mL}$	114,85 %

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

La actividad antioxidante fue evaluada por medio de la concentración inhibitoria media (CIM) la cual permite valorar la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH* al 50%.

En la Tabla 10-3 muestran los resultados obtenidos en cada especie *Clinopodium tomentosum* presentó un porcentaje de actividad captadora de radicales libres de 64,25% a 47,75 µg/mL con una concentración de 2000 ppm; en *Eupatorium glutinosum* su porcentaje de ACRL fue de 114,85% con 85,359 µg/mL a una concentración de 1111 ppm, como se puede observar el mayor porcentaje de ACRL presenta *E. glutinosum* esto se debe a que está relacionado con el contenido de flavonoides, es decir, si mayor es la cantidad de flavonoides mayor será el porcentaje de actividad captadora de radicales libres.

No se han realizado estudios de capacidad captadora de radicales libres para *C. tomentosum*, es por ello que como referencia se tomó a *Marrubium vulgare* (Linnaeus), donde utilizó diferentes solventes como metanol, cloroformo y acetato de etilo estos extractos presentaron el mayor porcentajes de inhibición a diferencia de los extractos acuosos y hexano, la concentración inhibitoria 50 (IC 50) varió desde 33,7 hasta 774 mg / ml según el solvente con el que se trabaje será su valor CIM. . (Bouterfasa et al., 2016, pp. 453-463.)

En un estudio trabajaron con diferentes tipos de extractos de *Salvia* para determinar la capacidad antioxidante, de todos los tipos de especie analizadas el extracto con más eficacia fue de *Salvia officinalis* que tuvo una capacidad antioxidante más potente con un valor de (10,08 a 3,37 g / ml), siendo estos valores mayor a la especie estudiada. (Mouna et al. 2013)

Para referenciar con respecto al *E. glutinosum* no se ha realizado estudios específicos de la actividad captadora de radicales libres, hay poca información y estudios debido que hay varias plantas denominados con su nombre común de “Matico”.

3.9. Evaluación de la actividad antiinflamatoria

3.9.1. Resultado de la administración del extracto

En el estudio realizado del extracto etanólico a diferente concentraciones de las hojas de *Clinopodium tomentosum*, para poder comprobar su actividad antiinflamatoria y que dosis es más efectiva para su actividad, los extractos fueron evidenciados en ratas albinas a la que se le produjo el edema plantar;

Tabla 12-3: Resultado del área de inflamación a diferentes tiempos

HORA S	PROMEDIO ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR TRATAMIENTOS					
	BLANCO	Diclofenaco sódico 100 mg/kg	<i>Eupatorium glutinsum</i> 100 mg/kg	<i>Clinopodium tomentosum</i> 300 mg/kg	<i>Clinopodium tomentosum</i> 100 mg/kg	<i>Clinopodium tomentosum</i> 25 mg/kg
Patrón	2,3525 ± 0,0439	2,4148 ± 0,0638	2,4240 ± 0,1315	2,499 ± 0,0829	2,4993 ± 0,0706	2,5230 ± 0,0947
0,5	2,3775 ± 0,0413	2,4883 ± 0,1105	2,4608 ± 0,1569	2,566 ± 0,0293	2,5658 ± 0,0847	2,5563 ± 0,0895
1	2,4540 ± 0,1039	2,5308 ± 0,1227	2,5263 ± 0,1333	2,623 ± 0,0520	2,6225 ± 0,1183	2,5888 ± 0,0892
2	2,5433 ± 0,1203	2,6138 ± 0,0668	2,6180 ± 0,1374	2,688 ± 0,0375	2,6883 ± 0,1278	2,6370 ± 0,0648
3	2,5795 ± 0,1287	2,6518 ± 0,0702	2,6730 ± 0,1388	2,736 ± 0,0429	2,7360 ± 0,1089	2,6950 ± 0,0583
4	2,6505 ± 0,1073	2,6233 ± 0,0604	2,6523 ± 0,1377	2,700 ± 0,0776	2,7003 ± 0,1121	2,7365 ± 0,0767
5	2,6670 ± 0,1081	2,5765 ± 0,0422	2,6063 ± 0,1624	2,677 ± 0,0787	2,6765 ± 0,1006	2,7705 ± 0,0464
6	2,6785 ± 0,0735	2,5465 ± 0,0625	2,5528 ± 0,1751	2,655 ± 0,0601	2,6553 ± 0,0893	2,8018 ± 0,0553
7	2,7080 ± 0,0919	2,4838 ± 0,0402	2,5015 ± 0,1548	2,637 ± 0,0662	2,6370 ± 0,0936	2,8330 ± 0,0639

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

Se realizaron las correspondientes mediciones del edema plantar inducido con carragenina, tomando en cuenta para su medición el área de la pata del animal de experimentación para cada uno de los grupos control como es blanco, diclofenaco, *Eupatorium glutinosum*, y para el tratamiento el extracto de *C. tomentosum* en dosis de 300, 100 y 25mg/Kg de extracto, que fueron administrados desde la hora 0 hasta la hora 7. En la tabla 11-3 se observa el promedio de cada una de las repeticiones realizadas por cada tratamiento junto a su desviación estándar.

Del promedios de las áreas obtenidos mediante los datos brutos que se tomó del proceso inflamatorio en cada uno de los tiempos, se observó que el recorrido de la inflamación del diclofenaco y el *Eupatorium glutinosum* son similares en cuanto a la disminución de la inflamación, a partir de la hora 3 en cuanto a los controles positivos (Diclofenaco, *E. glutinosum*) se evidencio que el área de la inflamación fue disminuyendo, mientras a la dosis de *C. tomentosum* que se utilizó para la investigación de la misma manera fueron disminuyendo a partir de la hora 3 y 4.

3.9.2. Análisis estadístico

Los datos de Tabla 13-3 muestran los resultados del porcentaje de inflamación descritos en la metodología, para obtener los resultados y las gráficas se utilizó Microsoft office Excel 2007. Una vez que se obtuvo el porcentaje de inflamación se procedió a realiza el análisis estadístico de los datos brutos, para ello se utilizó el programa SPSS versión 22 en el cual se analizó la varianza ANOVA y la prueba de Tukey para comprobar cuál es la diferencia significativa entre los tratamientos.

Tabla 13-3: Resultado del porcentaje de inflamación con cada tratamiento

Horas	PORCENTAJE DE INFLAMACIÓN					
	BLANCO	Diclofenaco sódico 100 mg/kg	<i>Eupatorium glutinosum</i> 100 mg/kg	<i>Clinopodium tomentosum</i> 300 mg/kg	<i>Clinopodium tomentosum</i> 100 mg/kg	<i>Clinopodium tomentosum</i> 25 mg/kg
0,5	1,0627	3,0031	1,5161	3,5491	2,3609	1,3179
1	5,3773	7,7426	5,7343	9,4050	7,3029	3,9239
2	13,4857	15,8733	13,7376	15,1566	14,8760	8,4423
3	23,1350	25,5567	24,0099	23,0793	24,3597	15,2596
4	35,8023	34,0756	33,4262	32,1921	32,4130	23,7218
5	49,1711	40,6844	40,9447	40,1670	39,5158	33,5315
6	63,0287	46,0674	46,2562	45,9081	45,7683	44,5799
7	78,1403	48,8866	49,4534	50,1566	51,2905	56,8668

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

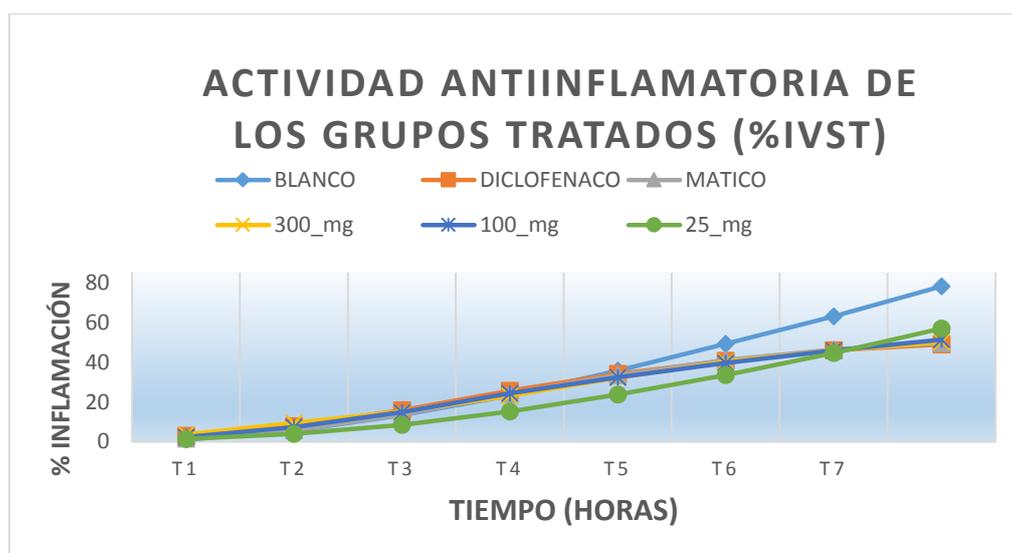


Grafico 1-3: Recorrido de cada tratamiento con sus respectivos tiempos

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

En la Tabla 13-3 se muestra los resultados acumulativos que se obtuvo del proceso inflamatorio, teniendo para cada uno de los controles blanco, diclofenaco (100mg/Kg), *Eupatorium glutinosum*, con los siguientes porcentajes 78,14%, 48,88%, 49,45% respectivamente, en cuanto al tratamiento con *Clinopodium tomentosum* en dosis de 300, 100 y 25 mg/Kg sus valores respectivos de porcentaje fueron 50,16%, 51,29% y 56,87%; siendo estos los resultados de todos los tratamiento se puede observar que las dosis aproximadas a los grupos de referencia son de 100 y 300mg/kg de *C. tomentosum*.

Las dosis de 100 y 300mg/Kg fueron las que se aproximan a los tratamientos de control como se observa en el grafico 1-3, es decir, son dosis que tuvo mayor actividad antiinflamatoria, donde el recorrido del proceso de inflamación que parte desde el tiempo cero hasta la última medición va conjuntamente con los controles de referencia. Mientras que la dosis de 25mg/Kg de *C. tomentosum* es la dosis que tuvo menor efecto.

3.9.2.1. Análisis estadístico de correlación de tiempo – tratamiento

Tabla 14-3: Resultado de Análisis estadístico ANOVA para cada tiempo

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
VARIABLE_T1	Entre grupos	,025	5	,005	,006	1,000
	Dentro de grupos	15,048	18	,836		
	Total	15,073	23			
VARIABLE_T2	Entre grupos	,155	5	,031	3,025	,037
	Dentro de grupos	,184	18	,010		
	Total	,339	23			
VARIABLE_T3	Entre grupos	,141	5	,028	2,485	,070
	Dentro de grupos	,204	18	,011		
	Total	,345	23			
VARIABLE_T4	Entre grupos	,104	5	,021	2,422	,076
	Dentro de grupos	,155	18	,009		
	Total	,258	23			
VARIABLE_T5	Entre grupos	,083	5	,017	1,603	,210
	Dentro de grupos	,185	18	,010		
	Total	,268	23			
VARIABLE_T6	Entre grupos	,079	5	,016	1,802	,163

	Dentro de grupos	,158	18	,009		
	Total	,237	23			
VARIABLE_T7	Entre grupos	,173	5	,035	4,001	,013
	Dentro de grupos	,155	18	,009		
	Total	,328	23			
VARIABLE_T8	Entre grupos	,290	5	,058	6,249	,002
	Dentro de grupos	,167	18	,009		
	Total	,457	23			

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

El análisis de ANOVA se realizó para poder observar si hubo diferencia significativa en cada uno de los tratamientos con respecto a los tiempos que fueron medidos, la diferencia significativa se verifica cuando $p < 0,05$ con un 95% de confiabilidad; en la Tabla 14-3 se puede observar el valor de la significancia de cada uno de las variables tiempo, presentando 3 tipos de variables con su significancia menor a 0,05 siendo estas las variable T2, T7 y T8 con 0,037, 0,013 y 0,002 respectivamente. Es por ello que para estas variables se realiza el test de Tukey-B.

3.9.2.2. Análisis de las variables

Tabla 15-3: Resultado de Tukey-B para variable T2 de la primera hora

Dosis_extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tukey B ^a Blanco	4	2,37750	
Matico100mg	4	2,47475	2,47475
Diclofenaco100mg	4	2,48825	2,48825
300mg	4	2,53525	2,53525
25mg	4	2,58875	2,58875
100mg	4		2,62250

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

La VARIABLE_T2 mostró una diferencia significativa menor a 0,05 es por ello que se procede a relizar la prueba de tukey B para poder analizar en cual de los tratamientos existio diferencia significativa como se puede observar en la Tabla 14-3 existen dos tipos de subconjuntos para esta variable, perteneciendo al subconjunto 1 solo el tratamiento del blanco, mientras que los tratamientos Matico (*Eupatorium glutinosum*), Diclofenaco, dosis de 300 y 25 mg/Kg de extracto pertenecen tanto al subconjunto1 como al subconjunto 2 esto quiere decir que la diferencia significativa de estos tratamientos esta compartida entre estos dos subconjuntos,siendo sus rangos

similares en cuanto a estos tratamientos; en el subconjunto 2 pertenece solo el tratamiento del extracto a dosis de 100mg/Kg.

Tabla 16-3: Resultado de Tukey-B para variable T7 de la sexta hora

Dosis_extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tukey B ^a 300mg	4	2,53250	
Diclofenaco100mg	4	2,57650	
Matico100mg	4	2,61900	2,61900
100mg	4	2,65525	2,65525
Blanco	4	2,66700	2,66700
25mg	4		2,80175

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

En la Tabla 16-3 se puede observar los resultados obtenidos por medio de análisis Tukey B la VARIABLE_T7 que corresponde a las medidas de la hora seis, donde formaron dos subconjunto con respecto a esta variable perteneciendo al subconjunto 1 los tratamientos de dosis de 300mg/Kg del extracto, Diclofenaco; en los subconjunto 1 y 2 pertenece la dosis de Matico (*Eupatorium glutinosum*) y 100mg/Kg del extracto, esto quiere decir que los datos de estos tratamientos pertenecen de forma imparcial tanto para el subconjunto 1 como al subconjunto 2, la dosis de 25mg/Kg pertenece solo al subconjunto 2 que solo existe diferencia significativa en este tipo de subconjunto.

Tabla 17-3: Resultado de Tukey-B para variable T8

Dosis_extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Tukey B ^a 300mg	4	2,49675	
Diclofenaco100mg	4	2,54650	
Matico100mg	4	2,56550	
100mg	4	2,63700	
Blanco	4	2,67850	2,67850
25mg	4		2,83300

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

La diferencia significativa de la ultima hora que fue $p < 0,05$ con un valor de 0,02 se realizó Tukey B donde en el subconjunto 1 se encuentra el tratamiento de dosis del extracto de 300 y 100mg/Kg, el Diclofenaco y Matico (*Eupatorium glutinosum*) siendo estos tratamientos similares con respecto a su rango, esto quiere decir que el efecto antiinflamatorio tiene similitud en dichos tratamientos, el subconjunto 2 solo se encontró la dosis de 25mg/Kg del extracto esto quiere

decir que no tiene diferencia significativa con otro tratamiento ya que este valor se encuentra solo para este tipo de subconjunto, como se puede observar en la Tabla 16-3.

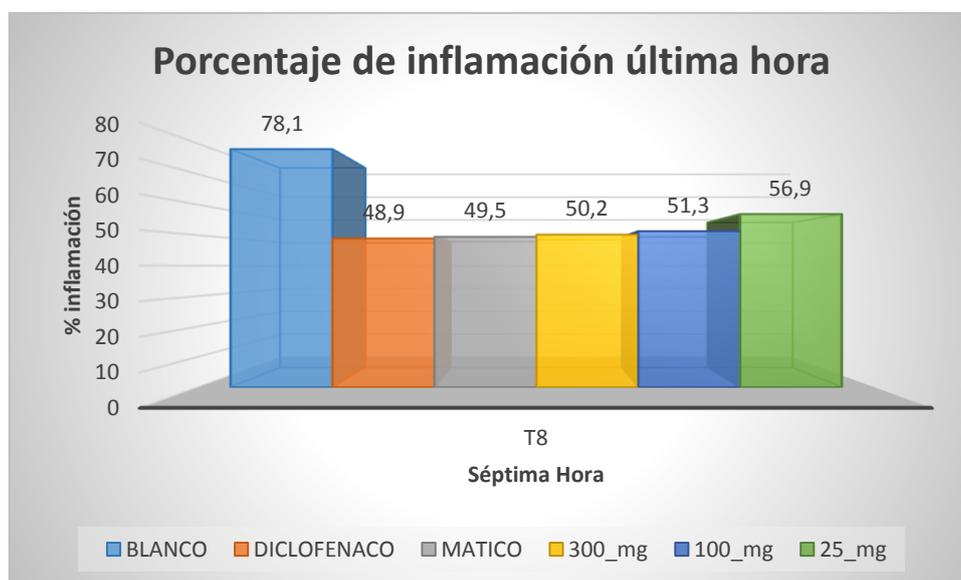


Grafico 2-3: Porcentaje de inflamación en la última hora

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

Para comprobar la efectividad del extracto se tomó en cuenta la última hora del porcentaje de inflamación de la pata del animal de experimentación ya que es el resultado final del diseño experimental, para verificar y analizar cuál de las tres dosis estudiadas fue la más efectiva se puede observar en el gráfico 2-3, se encuentran los valores finales de la inflamación de cada uno de los tratamientos para evidenciar cuál de todos ellos funciona se compara con los tratamientos de referencia (diclofenaco, matico) con 1,3% de diferencia la dosis de 300mg/Kg de *C. tomentosum* se aleja del fármaco de referencia (diclofenaco), mientras que con una diferencia de 0,7% la misma dosis se aleja de la planta de referencia con actividad antiinflamatoria. En cuanto a la dosis de 100mg/Kg con una diferencia de 2,4% de la inflamación se aleja del fármaco de referencia y con 1,8% se aleja del extracto de referencia. Esto quiere decir que las dosis con mejor actividad antiinflamatoria son de 100 y 300mg/Kg *Clinopodium tomentosum* ya que están cerca de los grupo control en función al efecto de la actividad antiinflamatoria.

CONCLUSIONES

Conforme a los parámetros físicos y químicos se pudo estipular que la droga cruda está en condiciones adecuadas para su utilización, los resultados obtenidos de cada ensayo humedad, cenizas totales, sustancias solubles e insolubles se encontraban dentro de los límites establecidos en la Farmacopea Española 2002, permitiendo decir que fue una materia prima inocua y no poseía problemas de estabilidad.

Según el tamizaje fitoquímico el extracto fluido de *C. tomentosum* evidencio compuestos como flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos y esteroides, en su composición lo que permite justificar las propiedades antiinflamatorias que indagan esta especie. En la cromatografía de capa fina se identificaron los posibles compuesto en el *C. tomentosum* un flavonoide que es hiperosido siendo este un glucósido derivado de la quercetina y triterpenos como ácido oleanólico y ácido ursólico; con respecto a la cuantificación de compuesto fenólicos y flavonoides el *E. glutinosum* tiene un porcentaje mayor en las dos cuantificación con respecto al *C. tomentosum*, en cuanto a la capacidad captadora de radicales libres directamente proporcional con la presencia de flavonoides, siendo mayor el en extracto de *E. glutinosum*.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de la formulación del extracto blando de *C. tomentosum* a diferentes concentraciones, utilizando el modelo de edema plantar inducido por carragenina en *Rattus norvegicus*. El efecto antiinflamatorio que tuvo mayor eficacia fueron las dosis de 100 y 300mg/Kg que al comparar con grupo control (Diclofenaco) su porcentaje de inflamación fue de 48,88%, mientras que de estas dosis fueron de 50,15% y 51,29% respectivamente; siendo estas las más próximas a presentar una disminución semejante a la del grupo control; las dosificaciones restantes de 25mg/Kg presentó 56,87% en cuanto al porcentaje de inflamación estas dosificación se aleja más al comparar con al grupo control.

Después de haber analizado los resultados, se ha llegado a concluir que las dosis de 100 y 300mg/Kg de extracto blando de *C. tomentosum* nos permitió evidenciar que existe actividad antiinflamatoria ya que esta tuvo una función similar al grupo control tanto del fármaco como el *E. glutinosum*, usando estos dos como referencia.

RECOMENDACIONES

- Elaborar un fitofármaco tratando de potenciar y mejorar la actividad antiinflamatoria de la forma farmacéutica (suspensión)
- Realizar estudios de toxicidad con dosis mayores a 300mg/Kg de la formulación elaborada.
- Realizar estudios de estabilidad para la estimación de vida útil de las formulación
- Continuar con el estudio de plantas medicinales en búsqueda de productos funcionales y efectivos
- Comparar dicha actividad con la fase apolar del extracto (aceites esenciales) para comprobar su eficacia.

BIBLIOGRAFÍA

- ACTON, A.** “Advances in Lamiaceae Research and Application.” *ScholarlyPaper*. (2012). [Consulta: 20 marzo 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books/about/Advances_in_Lamiaceae_Research_and_Appli.html?id=dwdaKZvRz5sC&redir_esc=y
- AHMET SONMEZDAG, A.; KELEBEK, H., Y SELLI, S.** “Identification of Aroma Compounds of Lamiaceae Species in Turkey Using the Purge and Trap Technique.” *MDPI AG* .nº 6. (2017). (Turquía),
- AMBIENTE, MAE.** *Estrategia-Nacional-de-Biodiversidad-2015-2030* [en línea]. Quito: Ministerio del Ambiente, 2016. [Consulta: 28 Febrero 2017]. Disponible en: <http://maetransparente.ambiente.gob.ec/documentacion/WebAPs/Estrategia%20Nacional%20de%20Biodiversidad%202015-2030%20-%20CALIDAD%20WEB.pdf>
- ARROYO, J. Et al,** “Efecto antihipertensivo del extracto de Piper aduncum ‘matico’ sobre la hipertensión inducida por L-NAME en ratones.” *Scielo*, nº 73(4) (2012), pp. 275-280. [Consulta: 21 de marzo 2017]. 1025-5583. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832012000400002&script=sci_arttext
- BARICEVIC, S. D.** “Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid”. *Journal of Ethnopharmacology*, nº 75(2-3) (2001), pp 125-132.
- BELTRAN, C., DÍAZ, F., Y GÓMEZ, H.** “Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, nº 18(4) (2013). [Consulta: 21 de marzo 2017] 1028-4796 Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400013
- BENZO, M., et.al.** Determination of the threshold odor concentration of main odorants in essential oils using gas chromatography–olfactometry incremental dilution technique. *Journal of Chromatography A*, nº 1150(1-2) (2007), pp 131-135.
- BODERO, Veronica.** Estudio farmacognósico y actividad antimicrobiana (in vitro) de los extractos fluidos de arrayán y pumín y su aplicación en una pasta dentífrica. [En línea] (tesis). (Maestría) Escuela Superior Politecnica de Chimorazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Riobamba –Ecuador. 2010. pp. 82- 86. [Consulta:

2017-03-12].

Disponible

en:

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/721/1/56T00239.pdf>

BOUTERFASA, K., et.al. “Antioxidant activity and total phenolic and flavonoids content variations of leaves extracts of white Horehound (*Marrubium vulgare* Linné) from three geographical origins”. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, nº 74(6) (2016), pp. 453-463.

BRAVO VELASQUEZ, E. *Apuntes sobre la Biodiversidad del Ecuador* [En línea]. Ecuador: Universitaria Abya-Yala, 2011. [Consulta: 1 de marzo 2017]. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5581/1/APUNTES%20SOBRE%20LA%20BIODIVERSIDAD%20.pdf>

BRUNETON, J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales* [En línea]. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales, 2011. [Consulta: 1 de marzo 2017]. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema6.pdf>

BURK, D.; et.al. “Suppression of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages by aqueous extract of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae)”. *Journal of Ethnopharmacology*, nº 126(3) (2009), pp. 397-405.

CABEZAS, J. A.; LÓPEZ, M.; Y IBÁÑEZ, E. Antiinflamatorios no esteroideos (I). Clasificación. Mecanismo de Acción. Indicaciones. Efectos Secundarios. Interacciones. Empleo en Situaciones Clínicas Especiales. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* nº 8(28) (2001), pp.1440-1448.

DAMJANOF, I. *Patplogías Secretos*. 3ra ed. Barcelona, S.A. ELSEVIER ESPAÑA, 2010, pp. 356.368

DE LAS HERAS, et al. “Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador”. *J Ethnopharmacol.*, nº 61(1998), pp. 161-166.

DINIZ, A.; et al. “In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae).” *Journal of Ethnopharmacology*, nº 125(2) (2009), pp.361-363.

E, RUBIN., Y FABER, J. *Patología Fundamentos*. 4ta ed. México D.F.: Medica Panamericana. 1992 [Consulta 16 de marzo 2017] Disponible en [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scieloOrg /php/reflinks.php?refpid=S2304-3768201400040000500003&pid=S2304-37682014000400005&lng=es](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S2304-3768201400040000500003&pid=S2304-37682014000400005&lng=es)

FERRER, A.; et al., “Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L’Herit”. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, n° 38(1) (2007), pp.243-247.

FRANCO, L.; JENNY, C.; & OCAMPO, Y. (Marzo de 2013). Antiinflammatory, antioxidant and antibacterial activity of two species of *Tabebuia* genus. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1).

HALL, V.; et al., Antiinflamatorios no esteroideos. *CIMED*, n° 34(6).

HERNÁNDEZ, T; et al., “*Salvia*. Fitoquímica, farmacología y terapéutica”. *Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. UCM*. n° 16(7) (2002), pp. 59-64

HIMANSHU, S.; et al., Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats. *ELSEVIER*, n° 72(2015), pp.1277-1282.

HOSSAIN, M, et al, Q. “Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*.” *Elvevier*, n° 3(9) (2013), pp.705-710.

ISMAEL, M. *Fitofármacos. Intervención Educativa*. 2da ed. España: 2012

KHAMIS AL-JADIDI, H. S., Y AMZAD HOSSAIN, M. Determination of the total phenols, flavonoids and antimicrobial activity of the crude extracts from locally grown neem stems. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, n° 6(5) (2016), pp. 376-379.

KUMAR, V., et al., *Patología Estructural y Funcional*. 7ma ed. Madrid: Elsevier. 2007

MARILÚ, S. Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. n° 6, pp.1105-1116

MARLENE, H. *Enfermería médico-quirúrgica*. 2da ed. México: El manual moderno. 2013. pp. 234-254

- MARTÍNEZ-GORDILLO, et al.**, “Genera of Lamiaceae from Mexico, diversity and endemism”. *ELSEVIER*, nº 86(1)(2016), pp.3086.
- MICHAEL, B.** “Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales”. *Scielo*, nº 94(4)(2010), pp. 538-546.
- MIRANDA, M.** *Manual de prácticas de Laboratorio de Farmacognosia*. Pueblo y Educación. 1986
- MOUNA BEN, F; et al.**, “Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats”. *Industrial Crops and Products ELSEVIER*, nº 49 (2013), pp. 904-914.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD.** *Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales*. [En línea]. Organización Mundial de la Salud, 2014 [Consulta: 6 de marzo 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
- PEDERSEN, J. A.** “Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy”. *Biochemical Systematics and Ecology ELSEVIER*, nº 28(3)(2000). pp. 229-253
- PEPPER, I.** *Mecanismos de enfermedad y de reacción del organismo* [En línea]. Unidad de patología general, 2005. [Consulta: 4 de Marzo 2017] Disponible en: <https://www.google.com.bo/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fecaths1.s3.amazonaws.com%2Fspm%2F1036570497.inflamacion.pdf&ei=q6dXU7ucEPapsASr8YDQCA&usg=AFQjCNHwSQfDaWu4T330ERihk-iac-JMqg>
- PÉREZ, J. L.** *Manual de Patología General*. 7ma ed.. Barcelona: Elsevier Masson. 2013
- PRIETO, J.** “Antiinflamatorios No Esteroides (AINEs).¿Dónde estamos y hacia dónde nos dirigimos?”. *Revista Científica*. nº 4(3) (2007)., pp. 203-212.
- QUINTERO, E.** “The effects of NSAIDS on the gastrointestinal mucosa”. *Elsevier* nº 27(2000). pp. 19-24:.

RIOS, D., *Capítulo III. Inflamación y reparación*. 3ra ed. La Paz, Curso de Patología. En D. Rios 1996. pp.29-46

ROBBISON, Y COTRAN. *Patología Estructural y Funcional*, 9na ed. Barcelona: Elsevier Saunders. 2015, pp. 543-587

RULE, R., NOVARINI, M., Y A, B. *Revisión de la concepción actual de los mediadores químicos de la inflamación*. [blog]. 2010. [Consulta: 3 de Marzo 2017] Disponible en: <<http://www.sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11061>.>

SÁNCHEZ GOVÍN, et al., “Caracterización farmacognóstica de *Salvia officinalis* L”. *Rev Cubana Plant Med*, n° 10(1)(2005)

SARIKURKCU, et al., “Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of acetone, methanol and water extracts of *Clinopodium vulgare* L. subsp.” *Industrial Crops and Products ELSEVIER*, n° 76, (2015), pp. 961-966.

SERRANO, C., et al., “Quantification of oleanolic acid, ursolic acid and rosmarinic acid in three Peruvian species of *Clinopodium* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae)”. n° 23(1)(2016), pp.333-350.

SIDDIQI, M. A. *Lamiaceae* (Vol. 118). 10ma ed. Department of Botany.1995

SOSTRES, C., Y LANAS, A. “Appropriate prescription, adherence and safety of non-steroidalanti-inflammatory drugsKeywords”. *Pudmed*, n°146(6)(2015), 267–272.

TAMAMES, S., Y C, M. *CIRUGÍA. Fisiopatología general. Aspecto general. Manejo del paciente*. Madrid: Panamericana. 1997

ULUBAY et al., The use of diclofenac sodium in urological practice: A structural and neurochemical based review. *Diario de la Química Neuroanatomía. Elsevier*, 1472(5), 1.6.

UNIVERSIDAD DE GRANADA. *Inflamación. El proceso de inflamación*. [blog] Espana: 2014. [Consulta: 6 de marzo 2017]. Disponible en: <<https://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>>

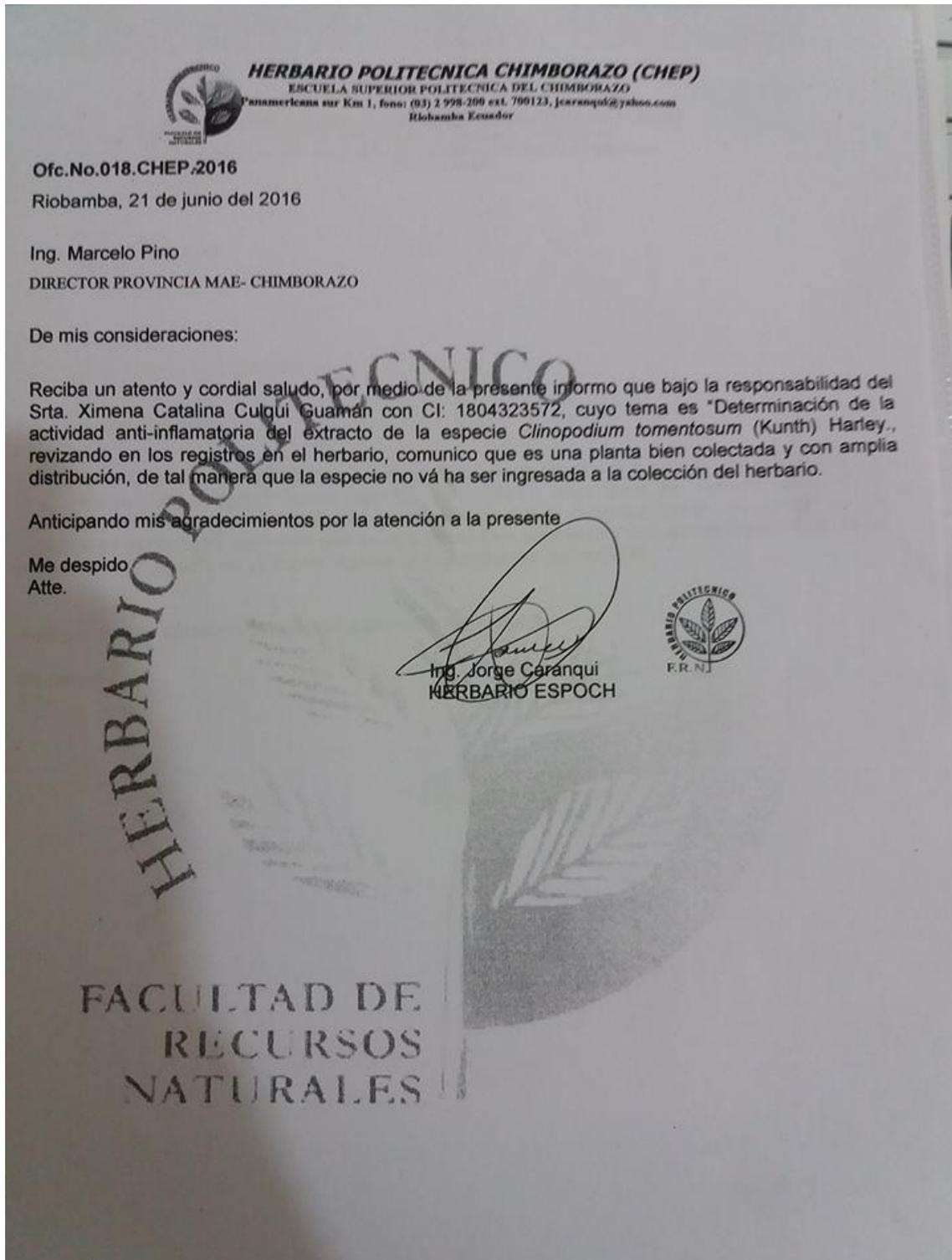
VERA, M., & NARANJO, F. “Phenolic compounds from *Clinopodium tomentosum* (Kunth) govaerts (Lamiaceae)”. *Revista de la Sociedad Química de Brasil*, nº 25(11) (2012).

VILLALBA, E. W. INFLAMACIÓN. *Revista Boliviana*, nº II(43)(2014).

WAGNER, H., Y BLADT, S. *PLANT DRUG ANALYSIS*. 2da ed. Springer.1996

ANEXOS

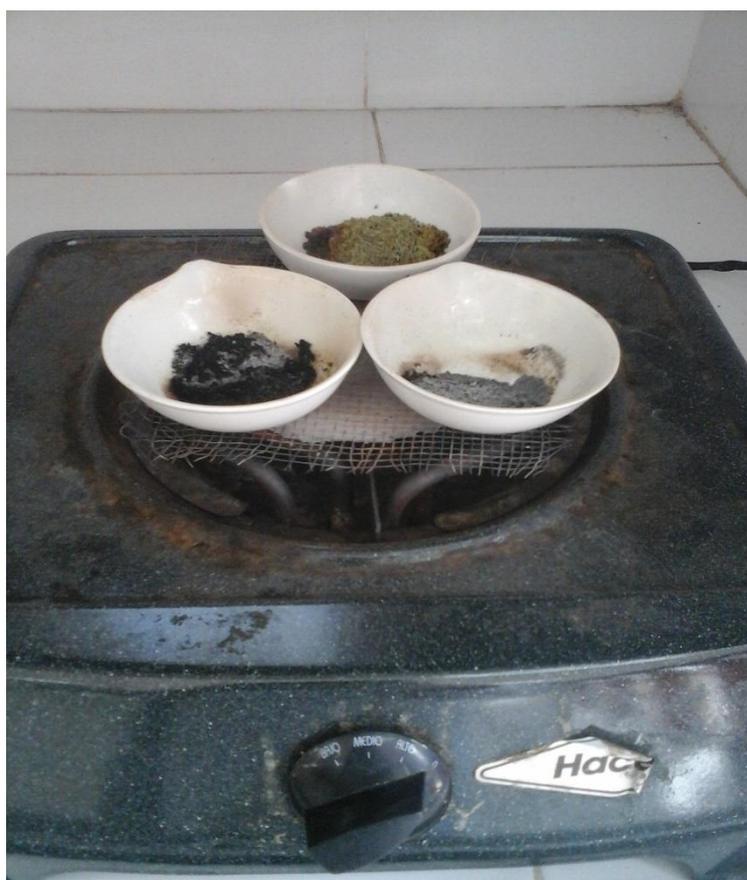
ANEXO A: Identificación y comprobación de la especie *Clinopodium tomentosum*



ANEXO B: Extracto blando de *Clinopodium tomentosum*



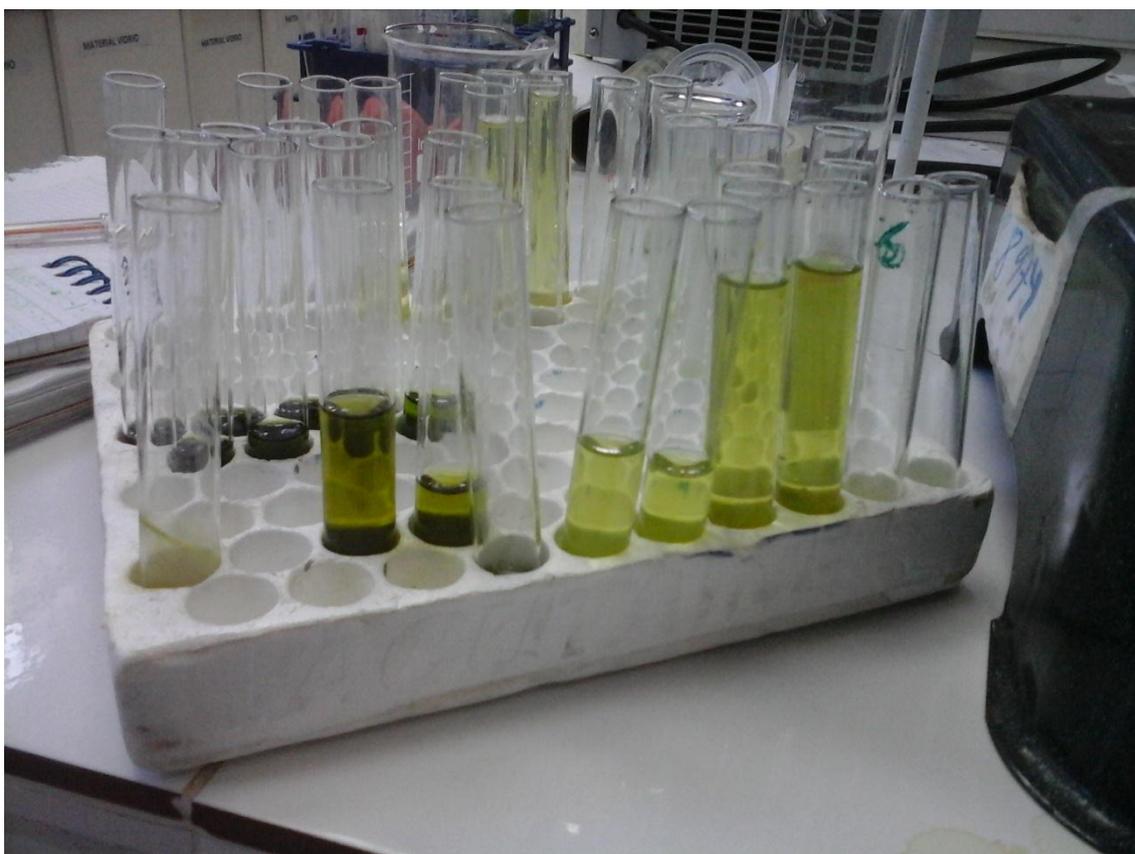
ANEXO C: Determinación de cenizas totales



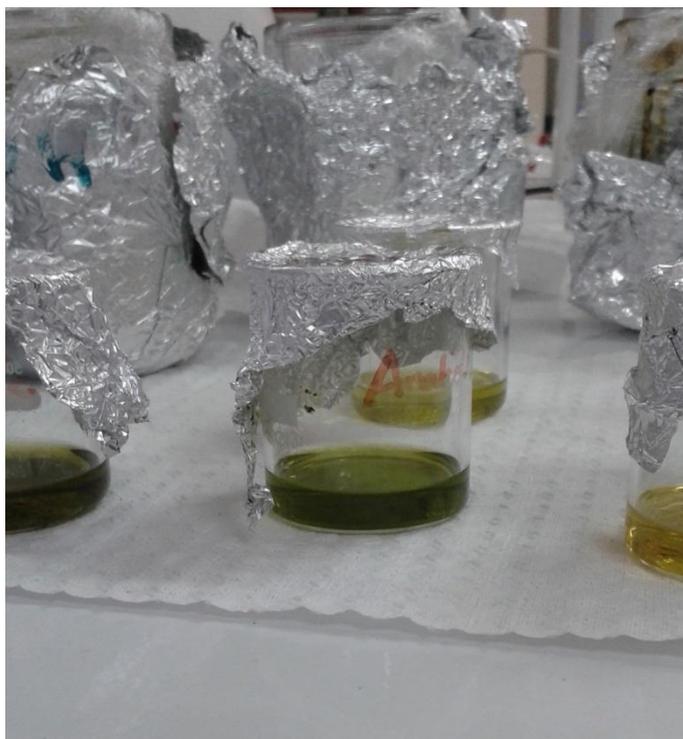
ANEXO D: Determinación de humedad



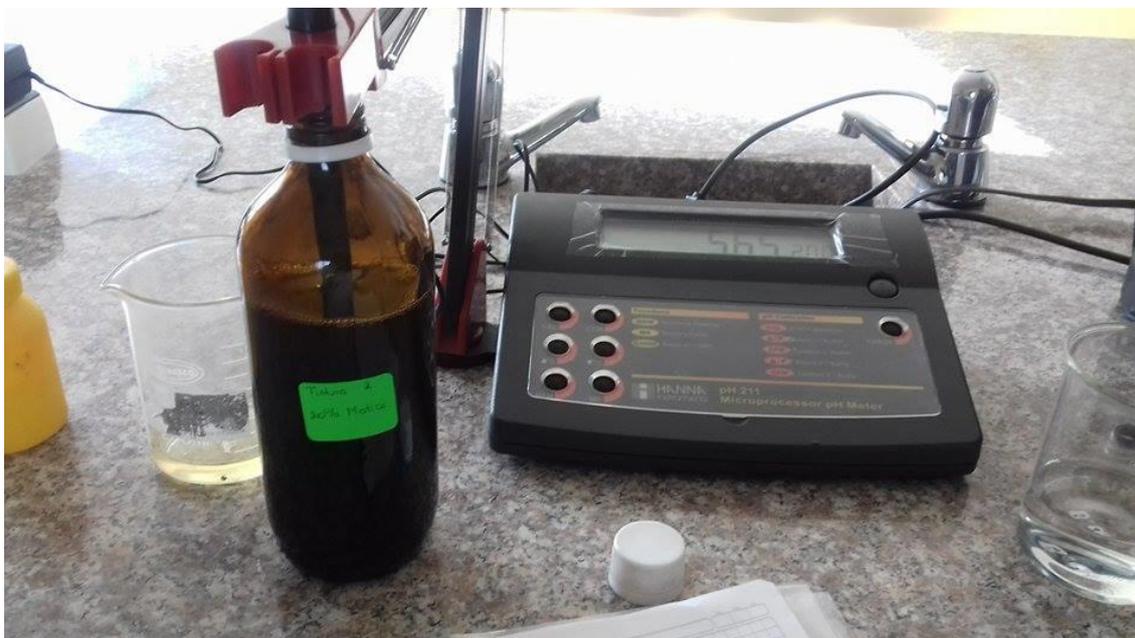
ANEXO F: Tamizaje fitoquímico del extracto



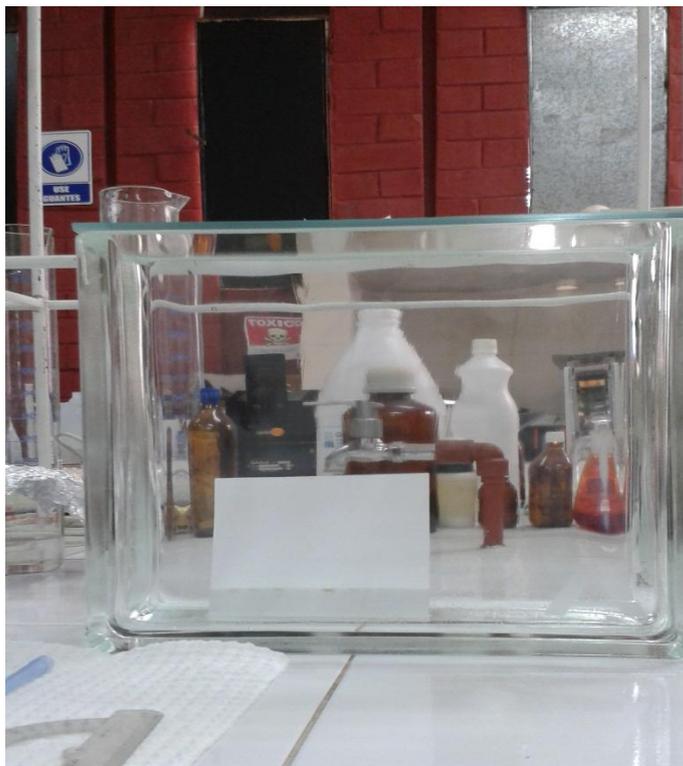
ANEXO G: Determinación de análisis organoléptico



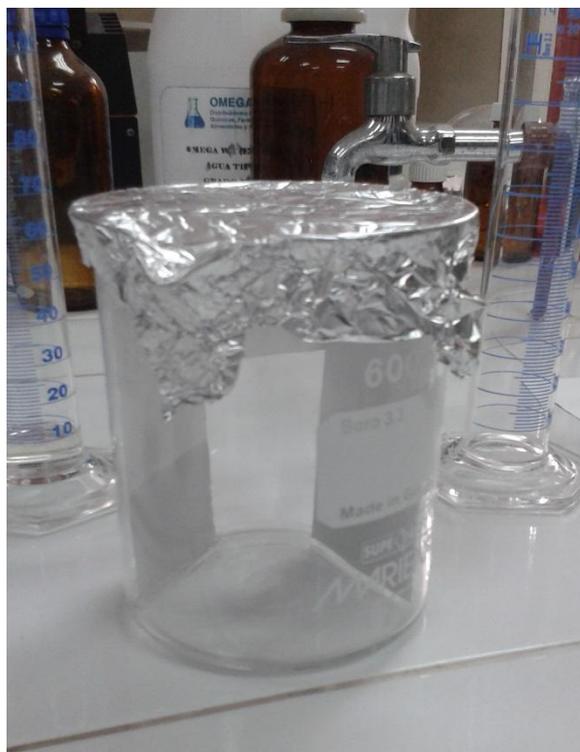
ANEXO H: Determinación del pH



ANEXO I: Cromatografía de flavonoides



ANEXO J: Cromatografía de triterpenos



ANEXO K: Cuantificación de fenoles totales



ANEXO L: Cuantificación de capacidad captadora de radicales libres DPPH*



ANEXO M: Materiales para realizar el diseño experimental



ANEXO N: Animal de experimentación



ANEXO O: Cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación



ANEXO P: Inducción del edema con solución de carragenina al 1%

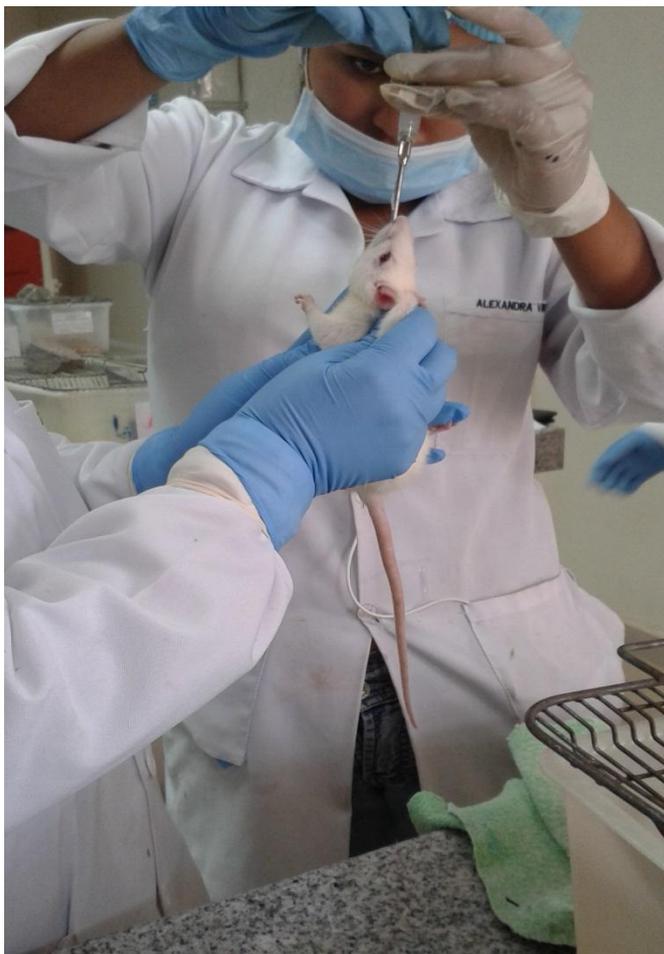


ANEXO Q: Tabla de valores para dosificación de animales de experimentación

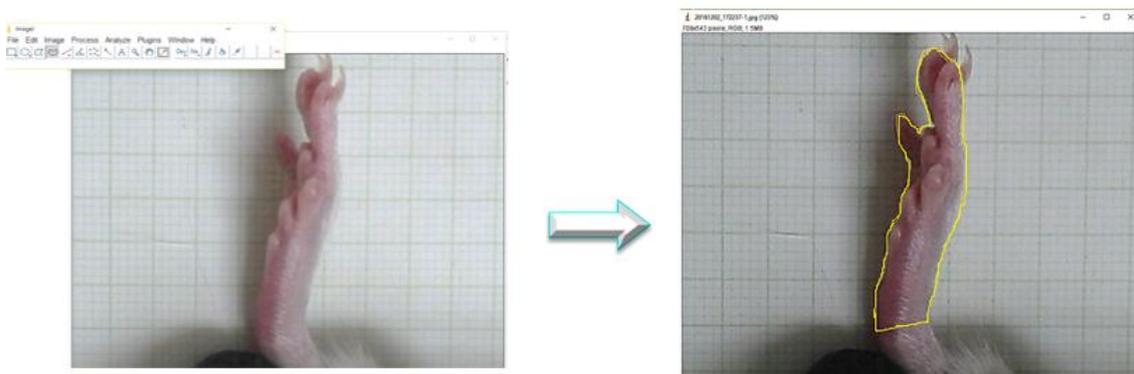
TRATAMIENTOS	PARÁMETROS (g)	REPETICIONES			
		R1	R2	R3	R4
Diclofenaco 100mg/kg	Peso de la rata	192,4	201,5	207,8	223,8
	volumen de principio activo	0,05936	0,062	0,064	0,069
<i>Eupatorium glutinosum</i> 100mg/Kg	Peso de la rata	195	203,9	219,3	243
	volumen de principio activo	0,01950	0,062	0,022	0,024
<i>C. tomentosum</i> 300mg/kg	Peso de la rata	192,8	203	207	238,1
	volumen de principio activo	0,05784	0,06090	0,062	0,071
<i>C. tomentosum</i> 100mg/kg	Peso de la rata	190,1	203,7	208,2	240,9
	volumen de principio activo	0,01901	0,02037	0,021	0,024
<i>C. tomentosum</i> 25mg/kg	Peso de la rata	181,6	202,4	215,6	212,3
	volumen de principio activo	0,00454	0,00506	0,005	0,005

Realizado por: Ximena Culqui, 2017

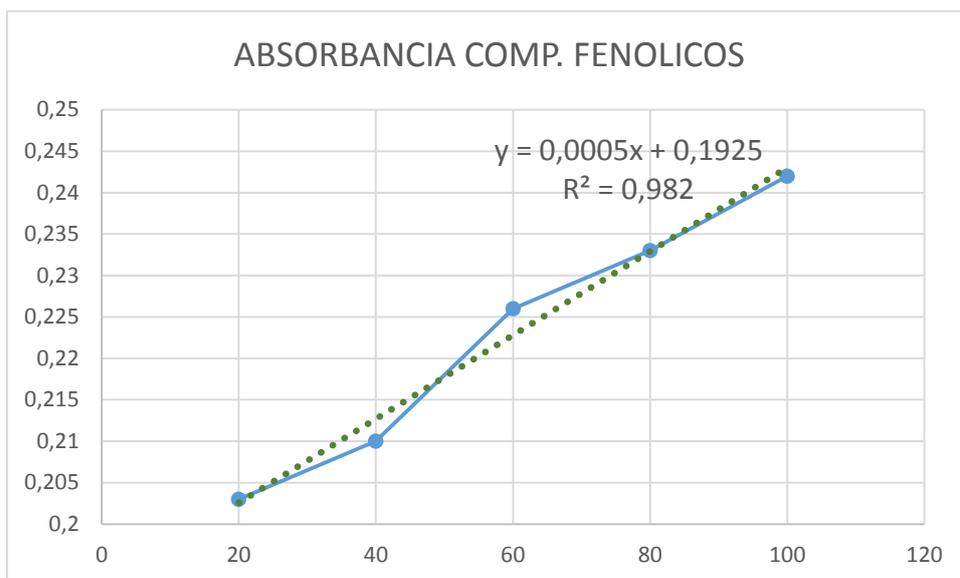
ANEXO R: Administración del extracto en forma de suspensión por vía oral



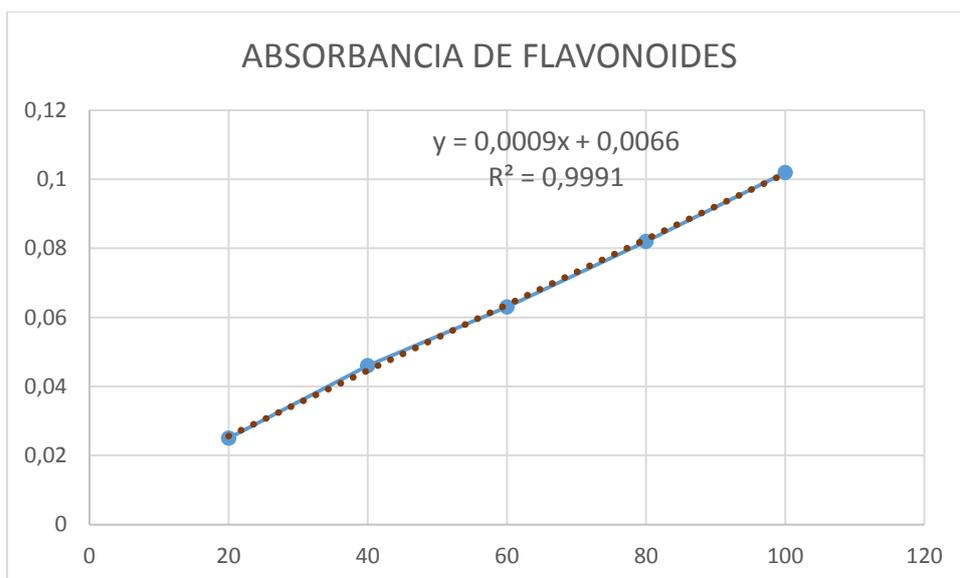
ANEXO S: Medición de la pata derecha inflamada, por el software IMAGEJ



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



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



ANEXO V: Curva exponencial de calibración para ácido gálico usada en la cuantificación de capacidad captadora de radicales libres.

