



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
CITOTÓXICA *in vitro* de *Crinum x amabile***

AUTOR: SANTIAGO ANDRÉS PORTERO HERRERA

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA, M.Sc.

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Previo a la obtención del título de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Riobamba – Ecuador

2017

© 2017, Santiago Andrés Portero Herrera

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 del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* de *Crinum x amabile*, de responsabilidad del Sr. Santiago Andrés Portero Herrera, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza, M.Sc. _____

**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Elizabeth Escudero, Mg. _____

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Santiago Andrés Portero Herrera, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría, así como las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta.

Los textos contenidos en el documento provenientes de otras fuentes se hallan debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, 26 de octubre de 2017

SANTIAGO ANDRÉS PORTERO HERRERA

180336059-1

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación va dedicado en primera instancia a Dios, por permitir que esta meta se cumpla, su ayuda para superar todos los obstáculos que se me han presentado y su compañía en todos los momentos de mi vida.

A mi madre Gloria por sus bendiciones, su apoyo incondicional en todo momento y más aún al tratarse de mi estudio y por siempre ayudarme a superar las dificultades del día a día.

A mi padre Rodrigo sobre todo por el apoyo económico invertido en mí, por su compañía, sus consejos y apoyo incondicional que siempre recibí.

A mis abuelitos, tíos, primos y todos los demás quienes contribuyeron en mi desarrollo dentro como fuera de las aulas de clase.

A todos mis profesores de las diferentes etapas académicas que fueron mi guía durante todo el transcurso de mi desarrollo académico y personal.

Santiago

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por contribuir en mi formación profesional.

Al BQF. Diego Vinueza, MSc., Director de mi tesis por todo el conocimiento que me ha compartido y todo el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo de investigación.

A la MSc. Karen Acosta y BQF. Gissela Pilco por brindarme todo su conocimiento en el transcurso de esta investigación.

Al BQF. Marco Janeta por la ayuda brindada en la realización de este trabajo de investigación.

A laboratorio de Productos Naturales y de Análisis Clínicos por el apoyo brindado en cuanto a implementos y equipos necesarios para la presente investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	XIII
SUMMARY	XIV
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
CAPITULO I	
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Plantas Medicinales.....	4
1.1.1. <i>Definición</i>	4
1.1.2. <i>Historia de la investigación botánica en el Ecuador</i>	4
1.1.3. <i>Estudio etnobotánico en el Ecuador</i>	5
1.1.4. <i>Uso de plantas medicinales en el mundo</i>	5
1.1.5. <i>Uso de plantas medicinales en el Ecuador</i>	6
1.2. Familia Amaryllidaceae	6
1.2.1. <i>Descripción</i>	6
1.2.2. <i>Características</i>	7
1.3. Género Crinum.....	6
1.3.1. <i>Botánica</i>	7
1.3.2. <i>Usos farmacológicos</i>	8
1.4. <i>Crinum x amabile</i>	8
1.4.1. <i>Características</i>	8
1.4.2. <i>Taxonomía</i>	10
1.4.3. <i>Composición química</i>	10
1.4.4. <i>Usos</i>	11
1.5. Inflamación	11
1.5.1. <i>Definición</i>	12
1.5.2. <i>Importancia del proceso inflamatorio</i>	12
1.5.3. <i>Factores de la inflamación</i>	13
1.5.4. <i>Proceso de inflamación</i>	14
1.5.4.1. <i>Liberación de mediadores. el mastocito</i>	16
1.5.4.2. <i>Efecto de los mediadores</i>	17
1.5.4.3. <i>Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio</i>	18
1.5.4.4. <i>Regulación de la respuesta inflamatoria.</i>	22
1.5.4.5. <i>Reparación</i>	22

1.5.5.	Tipos de inflamación	22
1.5.5.1.	<i>Por la duración</i>	23
1.5.5.2.	<i>Por el carácter de exudado</i>	23
1.5.5.3.	<i>Por la etiología</i>	23
1.5.5.4.	<i>Por sus características morfológicas</i>	24
1.5.5.5.	<i>Por su localización</i>	24
1.5.6.	Terapia antiinflamatoria	25
1.5.6.1.	<i>Terapia convencional</i>	25
1.5.6.2.	<i>Fitoterapia</i>	25
1.6.	Alcaloides	26
1.6.1.	Actividad biológica	26
1.6.2.	Actividad antiinflamatoria	26
1.6.3.	Estudios in-vitro que describen la actividad antiinflamatoria	27
1.6.3.1.	<i>Ensayo colorimétrico con sales de tetrazolio</i>	27
1.7.	Citotoxicidad	27
1.7.1.	Estudios in-vitro que describen la actividad citotóxica	27
1.7.1.1.	<i>Ensayo colorimétrico con sales de tetrazolio</i>	28

CAPITULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	29
2.1.	Lugar de la investigación	29
2.2.	Recolección del material vegetal	29
2.3.	Identificación del material vegetal	29
2.4.	Materiales, equipos y reactivos	29
2.4.1.	<i>Material vegetal</i>	29
2.4.2.	<i>Material Biológico</i>	30
2.4.3.	<i>Material farmacológico</i>	30
2.4.4.	<i>Materiales de laboratorio utilizados</i>	30
2.4.5.	<i>Equipos</i>	31
2.4.6.	<i>Reactivos</i>	32
2.5.	Técnicas y métodos	33
2.5.1.	Determinación de los parámetros de control de calidad de la droga cruda	33
2.5.1.1.	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	33
2.5.1.2.	<i>Determinación de cenizas totales</i>	34
2.5.1.3.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	35
2.5.1.4.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	36
2.5.2.	Tamizaje Fitoquímico	36

2.5.2.1.	<i>Ensayo de Sudán</i>	39
2.5.2.2.	<i>Ensayo de Dragendorff</i>	39
2.5.2.3.	<i>Ensayo de Mayer</i>	40
2.5.2.4.	<i>Ensayo de Wagner</i>	40
2.5.2.5.	<i>Ensayo de Baljet</i>	41
2.5.2.6.	<i>Ensayo de Libermann-Burchard</i>	41
2.5.2.7.	<i>Ensayo de resinas</i>	41
2.5.2.8.	<i>Ensayo de la espuma</i>	42
2.5.2.9.	<i>Ensayo de Cloruro Férrico</i>	42
2.5.2.10.	<i>Ensayo de Shinoda</i>	43
2.5.2.11.	<i>Ensayo de Borntrager</i>	43
2.5.3.	Obtención del extracto metanólico	43
2.5.4.	Extracción de alcaloides	44
2.5.5.	Ensayo antioxidante	45
2.5.5.1.	<i>Ensayo de actividad antioxidante</i>	45
2.5.6.	Ensayo antiinflamatorio y citotóxico	46
2.5.6.1.	<i>Aislamiento de neutrófilos</i>	46
2.5.6.2.	<i>Ensayo antiinflamatoria in vitro</i>	47
2.5.6.3.	<i>Ensayo de citotoxicidad in vitro</i>	48

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
3.1.	Parámetros de control de calidad de hojas	50
3.2.	Tamizaje fitoquímico	51
3.2.1.	<i>Tamizaje fitoquímico de hojas de <i>Crinum x amabile</i></i>	51
3.2.2.	<i>Tamizaje fitoquímico de bulbos de <i>Crinum x amabile</i></i>	52
3.3.	Ensayo antioxidante	55
3.4.	Ensayo antiinflamatorio in vitro	58
3.5.	Ensayo Citotóxico in vitro	63
	CONCLUSIONES	68
	RECOMENDACIONES	69

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1 Características de la familia Amaryllidaceae.....	7
Tabla 2-1 Generalidades de <i>Crinum x amabile</i>	8
Tabla 3-1 Taxonomía de <i>Crinum x amabile</i>	10
Tabla 4-1 Factores endógenos y exógenos de la inflamación.....	13
Tabla 1-2 Materiales de laboratorio.....	30
Tabla 2-2 Equipos de laboratorio.....	31
Tabla 3-2 Reactivos.....	32
Tabla 4-2 Esquema para la realización del ensayo antiinflamatorio in-vitro.....	47
Tabla 5-2 Esquema para la realización de la actividad citotóxica in-vitro.....	48
Tabla 1-3 Resultados del control de calidad de las hojas de <i>Crinum x amabile</i>	50
Tabla 2-3 Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las hojas de <i>Crinum x amabile</i>	51
Tabla 3- 3 Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico del bulbo de <i>Crinum x amabile</i>	52
Tabla 4-3 Porcentaje de actividad inhibitoria de radicales libres.....	55
Tabla 5-3 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria in vitro, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto bruto del bulbo.	58
Tabla 6-3 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria in vitro, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto bruto de hojas.	59
Tabla 7-3 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria in vitro, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto alcaloidal del bulbo.....	60
Tabla 8-3 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria in vitro, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto alcaloidal de hojas.	60
Tabla 9-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto bruto del bulbo.	63
Tabla 10-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto bruto de hojas.	64
Tabla 11-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto alcaloidal del bulbo.	64
Tabla 12-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto alcaloidal de hojas.	65

INDICE DE FIGURAS:

Figura 1- 1 <i>Crinum x amabile</i>	10
Figura 2-1 Importancia de la inflamación en las enfermedades.....	12
Figura 3-1 Escenarios de actuación de la inflamación.....	13
Figura 4-1 Factores inductores de la inflamación.	14
Figura 5-1 Proceso de la inflamación.....	15
Figura 6-1 Respuesta del organismo a agresiones	15
Figura 7-1 Flujo de información desencadenado por una herida contaminada.....	17
Figura 8-1 La activación del receptor activado por proteasa del subtipo 1.....	18
Figura 9-1 Ensamblaje y activación del sistema calicreína-quinina (KKS) plasmático.	19
Figura 10-1 Interacción entre los sistemas calicreína-quinina (KKS) y renina-angiotensina (RAS) plasmáticos.	20
Figura 11-1 Cascada de adhesión leucocitaria	20
Figura 12-1 Fagocitosis por Neutrófilo.....	21
Figura 1-2 Proceso de extracción para tamizaje fitoquímico	37
Figura 2- 2 Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.....	38
Figura 3-2 Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.	38
Figura 4-2 Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.....	39
Figura 5-2 Diagrama del procedimiento de extracción de alcaloides.	45
Figura 1-3 Curva de actividad antioxidante de Ácido Gálico.....	55
Figura 3-3 Curva del porcentaje de actividad antioxidante del extracto bruto de bulbo.....	56
Figura 3- 4 Curva del porcentaje de actividad antioxidante del extracto bruto de hojas.	56
Figura 5-3 Curva del porcentaje de actividad antioxidante del extracto alcaloidal de bulbo.....	57
Figura 6-3 Curva del porcentaje de actividad antioxidante del extracto alcaloidal de hojas.	57
Figura 7-3 Curva del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto bruto de bulbo.	58
Figura 8-3 Curva del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto bruto de hojas.....	59
Figura 9-3 Curva del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto alcaloidal de bulbo. ...	59
Figura 10-3 Curva del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto alcaloidal de hojas...	60
Figura 11-3 Curva del porcentaje de viabilidad celular del extracto bruto de Bulbo.....	63
Figura 12-3 Curva del porcentaje de viabilidad celular del extracto bruto de hojas.....	63
Figura 13-3 Curva del porcentaje de viabilidad celular del extracto alcaloidal de bulbo.....	64
Figura 14-3 Curva del porcentaje de viabilidad celular del extracto alcaloidal de hojas.....	65

GLOSARIO:

μL : Microlitros

Ca^{++} : Calcio

cAMP: Adenosin monofosfato cíclico

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

E.A.B: Extracto alcaloidal de bulbo

E.A.H: Extracto alcaloidal de hojas

E.B.B: Extracto bruto de bulbo

E.B.H: Extracto bruto de hojas

ECF-A: Factor eosinófilo quimiotáctico de la anafilaxia

IgE: Inmunoglobulina E

IgM: Inmunoglobulina M

iL-1: Interleucina 1

LTB4: Leucotrienos B4

MHS: Solución modificada de Hans

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NCF: Factor quimiotáctico de los neutrófilos

nm: Nanómetros

$^{\circ}\text{C}$: Grados centígrados

PAF: Factor activador de plaquetas

PCR: Proteína C reactiva

PG: Prostaglandina

PGE2: Prostaglandina E2

ppm: Partes por millón

RPM: Revoluciones por minuto

WST-1: Cell proliferation reagent

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar las actividades antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de los extractos bruto y alcaloidal de *Crinum x amabile*. La especie vegetal *Crinum x amabile* fue recolectada en el cantón Muisne ubicado al oeste de la provincia de Esmeraldas en el Ecuador, aproximadamente en las coordenadas geográficas: 0°36'09.5" N 80°01'30.1" W. Los extractos brutos fueron obtenidos por separado mediante maceración durante 72 horas de las hojas y bulbo de *Crinum x amabile*, usando como solvente extractivo metanol. Por otra parte, los extractos alcaloidales de hojas y bulbo de la especie en estudio fueron obtenidos mediante extracción líquido-líquido usando solventes orgánicos. Las actividades antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* fueron evaluadas mediante el modelo de neutrófilos aislados, mismo que está basado en la reducción de una sal de tetrazolio (WST-1). La actividad antioxidante fue desarrollada mediante el método de captación de radicales libres DPPH. Los resultados obtenidos del ensayo de actividad antiinflamatoria demuestran que el extracto bruto del bulbo de *Crinum x amabile* a una concentración de 200 ppm posee una marcada actividad antiinflamatoria con un 56.35%±0.24 de inhibición inflamatoria. Sin embargo, el valor obtenido es inferior al exhibido por la sustancia de referencia (ácido acetilsalicílico), 70.28%±0.24 de inhibición inflamatoria. Los resultados de la actividad citotóxica demuestran que el extracto alcaloidal del bulbo de *Crinum x amabile* a una concentración de 12.5 ppm presenta mayor viabilidad celular con un 65.71%±0.31.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACIA>, <BULBO – HOJAS (*Crinum x amabile*)>, <AMARYLLIDACEAE>, <ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA>, <ACTIVIDAD CITOTÓXICA>, <SAL DE TETRAZOLIO (WST-1)>, <NEUTRÓFILOS AISLADOS>.

SUMMARY

The objective of this research was to evaluate the anti-inflammatory and cytotoxic activities *in vitro* of crude and alkaloidal extracts of *Crinum x amabile*. The *Crinum x amabile* vegetal species was collected in Muisne canton located west of the province of Esmeraldas in Ecuador, approximately at the geographic coordinates: 0°36'09.5" N 80°01'30.1" W. *Crinum x amabile* crude extracts, using as extractive solvent methanol. On the other hand, the leaf and bulb alkaloid extracts of the study were obtained by liquid-liquid extraction using organic solvents. In vitro anti-inflammatory and cytotoxic activities were evaluated using the isolated neutrophil model, which is based on the reduction of a tetrazolium salt (WST-1). The antioxidant activity was developed by the DPPH free radical scavenging method. The results obtained from de anti-inflammatory activity assay show that *Crinum x amabile* crude bulb extract at a concentration of 200 ppm possesses a market anti-inflammatory activity with a 56.35% \pm 0.24 of inflammatory inhibition. However, the value obtained is lower than that shown by the reference substance (acetylsalicylic acid), 70.28% \pm 0.24 of inflammatory inhibition. The obtained results of cytotoxic activity demonstrate that the alkaloidal extract of the bulb of *Crinum x amabile* at a concentration of 12.5 ppm presents greater cellular viability with a 65.75% \pm 0.31.

Key words: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACY>, <BULB-SHEETS (*Crinum x amabile*)>, <AMARYLLIDACEAE>, <ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY>, <CYTOTOXIC ACTIVITY>, <TETRAZOLIUM SALT (WST-1)>, <ISOLATED NEUTROPHILES>.

INTRODUCCIÓN

La pregunta de investigación que motivó el presente trabajo fue ¿Existen diferencias en la inhibición inflamatoria y la actividad citotóxica *in vitro* por efecto de los extractos brutos y alcaloidales de *Crinum x amabile*?

La tendencia de la investigación académica en cuanto a la aplicación de los extractos se centra en los tratamientos alternativos para inhibir procesos inflamatorios, ya sean de carácter agudo o crónico. (Rahman et al, 2013a, pp. 212-218)

Otra tendencia es la investigación de la actividad citotóxica, haciendo referencia a la actividad antitumoral que los alcaloides de esta planta presentan, como moléculas alternativas para limitar problemas tumorales. (Kittisak et al, 1993a, pp. 1331-1338)

Una perspectiva de interés radica en el estudio de los alcaloides presentes en la especie vegetal en estudio, la elucidación de su estructura y análisis de su estructura y análisis de sus características, ya que al ser una planta que se halla en investigación temprana, es necesario seguir investigándola a fin de tener la mayor cantidad de información de esta y poder determinar nuevas aplicaciones en diferentes campos. (Pham et al, 1998a, pp. 371-376)

La actividad antimicrobiana, ha sido muy estudiada con una gran cantidad de especies vegetales, y *Crinum x amabile* no podía ser la excepción. Variedad de alcaloides constituyen esta planta, los cuales son de gran importancia por su actividad antimicrobiana, demostrados en investigaciones anteriores en la familia Amaryllidaceae y el género *Crinum*. (Mahady, 2005, pp. 2405-2427)

La presente Tesis está constituida de la siguiente manera:

En el capítulo 1 se incluye el marco teórico que responde a las preguntas epistemológicas en cuanto a los temas de interés sobre la actividad antiinflamatoria y citotóxica, para lo cual se ha recolectado información de 58 artículos científicos. Se culmina el marco teórico realizando un análisis de las posibles relaciones en las variables.

En el capítulo 2 se presenta primeramente la metodología de la investigación y posteriormente la lógica de la investigación.

En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos en la investigación, al final de los cuales se discuten los resultados y los paradigmas relacionados al tema, además se comparó el aporte de otros investigadores con los mismos resultados.

En la parte final del trabajo de titulación se presentan las conclusiones en relación a los objetivos e hipótesis planteadas y los resultados obtenidos durante esta investigación. Se incluye un apartado de recomendaciones pertinentes a la investigación y la bibliografía de 58 artículos científicos con información sobre las variables.

Este trabajo de titulación forma parte de la RED CYTED BIFRENES Proyecto de investigación científica denominado “LA BIODIVERSIDAD DE AMARYLLIDACEAE COMO FUENTE DE RECURSOS NATURALES PARA SU EXPLOTACIÓN SOSTENIBLE”.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de *Crinum x amabile*.

Objetivos específicos

- Determinar cualitativamente la composición química de las hojas y el bulbo de *Crinum x amabile*.
- Obtener un extracto metanólico a partir de las hojas y el bulbo mediante maceración en frío.
- Extraer la porción alcaloidal mediante procesos de extracción líquido – líquido y variación de pH.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y alcaloideos extraídos mediante el método de DPPH.
- Determinar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* de los extractos metanólicos y alcaloideos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Plantas Medicinales

1.1.1. *Definición*

Es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica. (Cañigueral et al, 2003a, pp. 265-277)

1.1.2. *Historia de la investigación botánica en el Ecuador*

El Ecuador posee una diversidad cultural como resultado de un proceso milenario de interrelación con el medio y la llegada a través de la historia de nuevos pobladores y culturas del mismo continente como los Incas y de otros continentes como los españoles y africanos. (De La Torre et al, 2006a, pp. 246-267)

Este conocimiento acumulado en la larga relación de estas culturas en el diverso ecosistema ecuatoriano; su descubrimiento y relato ha sido el objetivo de muchos exploradores e investigadores en las distintas épocas. (De La Torre et al, 2006b, pp. 246-267)

Con el establecimiento definitivo de la colonización española en América, y la aparición de la Real Audiencia de Quito, quienes inicialmente recopilaban información sobre la utilidad de las plantas fueron los exploradores y conquistadores españoles, quienes se dedicaron a describir las distintas especies vegetales con potencial comercial para la Corona Española. (De La Torre et al, 2006c, pp. 246-267)

A partir de la conquista, en el Ecuador se implantó una ideología providencialista y antropocéntrica de la relación entre el hombre con la naturaleza. Al desintegrarse la sociedad aborígen del país, también eliminaron muchos de los conocimientos sobre el uso de plantas y animales y los ancestrales modelos de su manejo y utilización. (Varea A, et al, 1997, pp. 178)

Con el pasar de los años, la corona española perdió interés en el estudio de las plantas en América

y prosiguieron diferentes misiones, originarias de diferentes países que llevaron el estudio a otros niveles, determinando la taxonomía de las plantas, información de usos de especies andinas, especies utilizadas en la construcción y plantas con diferentes usos en agricultura. (De La Torre et al, 2006d, pp. 246-267)

Finalmente, en los últimos 20 años, se profundizó aún más el estudio de las plantas, descubriendo metabolitos activos en aquellas; especies utilizadas por shamanes y la población en general, y nuevas investigaciones llevadas a cabo a nivel de animales de experimentación, mediante el potencial uso que tienen estas plantas medicinales. (Zambrano et al, 2015a, pp. 97-108)

1.1.3. *Estudio etnobotánico en el Ecuador*

La etnobotánica estudia la relación entre el hombre y las plantas, lo que permite apreciar a estos recursos desde el punto de vista de quienes lo utilizan, así como la influencia del ambiente natural en las culturas que aprovechan este recurso. (De La Torre et al, 2006e, pp. 246-267)

La etnobotánica tiene como objetivo primordial la búsqueda del conocimiento y rescate del saber botánico tradicional, de manera especial en relación al uso de la flora. (Zambrano et al, 2015b, pp. 97-108)

El Ecuador debido a su gran variedad biológica y cultural, es considerado un país con gran potencial en cuanto a la medicina tradicional, con lo cual es importante determinar algunos aspectos como las formas en que se usa cada planta y los beneficios curativos que se adquiere a partir éstas. (Zambrano et al, 2015c, pp. 97-108)

El uso de medicina tradicional, con base en el conocimiento etnobotánico es una práctica llevada a cabo desde épocas ancestrales y ha demostrado ser una de las mejores opciones en cuanto a cuidados de la salud, particularmente en el área rural, que es donde más se lo practica, debido a la limitada posibilidad económica de estas regiones, donde en ocasiones no es fácil tener acceso a la medicina convencional. (Zambrano et al, 2015d, pp. 97-108)

1.1.4. *Uso de plantas medicinales en el mundo*

El uso de plantas medicinales a nivel mundial ha sido un punto muy importante desde épocas arcaicas, dado que su uso era muy importante para el tratamiento de enfermedades. Estos métodos con el tiempo han ido evolucionando, investigándose nuevas plantas para este fin y mejorando los procesos para su uso. Actualmente, en el mercado mundial apenas el 20% de las plantas tienen

finalidad terapéutica siendo un aproximado de 10.000 plantas medicinales, la mayoría utilizadas de forma tradicional, sin embargo solo un pequeño porcentaje se utiliza en cantidades significativas. (Cañigueral et al, 2003b, pp. 265-277)

Los principales países productores son países en desarrollo de América, África y Asia y van dirigidos al mercado de países desarrollados como EEUU y Japón. (Cañigueral et al, 2003c, pp. 265-277)

1.1.5. *Uso de plantas medicinales en el Ecuador*

El Ecuador es un país que cuenta con gran cantidad de recursos naturales en todas las regiones que el país posee. Muchas de estas plantas poseen características que pueden ser aprovechadas por su poder medicinal que, en conjunto con el conocimiento etnobotánico que las diferentes culturas mantienen, hace de las plantas medicinales poderosas herramientas de uso terapéutico. (Cerón Martínez, 2006a, pp. 285-293)

En el Ecuador el uso de plantas medicinales todavía se mantiene, debido a que la cultura de la gente aún hace que mantengan confianza en éstas. Generalmente, las plantas medicinales y su uso son llevadas a cabo por personas “especializadas” como curanderos o shamanes aunque en nuestros días el uso en mercados de la ciudad aún se ve vigente. (Cerón Martínez, 2006b, pp. 285-293)

A nivel de la zona andina del Ecuador se han descrito gran cantidad de plantas medicinales, gracias a los estudios de herbolarios, colecciones botánicas y el conocimiento etnobotánico. De allí se tienen datos de 432 especies medicinales de las cuales 273 corresponden a aquellas plantas que se expenden en los mercados y 255 son plantas silvestres. Se ha determinado que las plantas que pueden conseguirse en los mercados sirven para tratar 77 dolencias y las silvestres 74 (Cerón Martínez, 2006c, pp. 285-293).

1.2. Familia Amaryllidaceae

1.2.1. *Descripción*

Las amarilidáceas representan un grupo de plantas con una considerable importancia económica y cultural, muy utilizadas como condimento y con fines ornamentales, hortícolas y medicinales. (Henriette & Dutilh, 2005, pp. 244-256)

Comprende 75 géneros con 1100 especies en regiones tropicales, subtropicales y templadas cálidas. (López & Serna, 2002, pp. 3-6)

1.2.2. Características

Tabla 1-1 Características de la familia Amaryllidaceae

Planta	Herbácea con bulbos o rizoma
Hojas	Basales con limbo linear o acintado
Inflorescencia	Pocas flores, agrupadas en umbelas
Flores	Actimorfos, hermafroditas y muy vistosas
Perigonio	Verticilos de tres piezas libres o soldados
Androceo	Seis estambres ubicados en dos niveles
Gineceo	Un carpelo y ovario ínfero
Fruto	Cápsula o baya

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Fuente: Edward Gilman, 2014a, pp. 1-2

1.3. Género *Crinum*

Es un género de plantas perteneciente a la familia Amaryllidaceae con flores vistosas similares a los lirios (Calderón et al. 2010a, pp. 988-993). Comprende aproximadamente 160 especies que han sido descritas en zonas tropicales y cálidas de América, Asia, África y Australia, con especies representativas en cada uno de estos continentes. (Thi Ngoc Tram et al, 2002a, pp. 183-208)

En general las plantas del género *Crinum* destacan por sus usos como inductor emético, antirreumático, tratamiento para la otitis, tratamiento para VIH, animalárico, tos, resfriados, trastornos renales y hepáticos, tratamiento en afecciones de la piel, antibacteriano, antiparasitario y antivírico. (Thi Ngoc Tram et al, 2002b, pp. 183-208) (Lin et al, 1995, pp. 1295-1298) (Pham et al, 1998b, pp. 371-376) (Walk, 1995, pp. 329)

1.3.1. Botánica

Fue Linneo quien estableció el género *Crinum* con 4 especies, pero fue Herbert quien redefinió el género al reconocer 46 especies y dividiéndolas en dos secciones que son patentes y semipatentes. Baker la subdividió en tres géneros *Stenaster*, *Platyaster* y *Condonocrinum*, más tarde se llevó a cabo la combinación de *Stenaster* y *Platyaster*. Posteriormente, Traub modificó el nombre *Platyaster* a *Crinum*. (Thi Ngoc Tram et al, 2002c, pp. 183-208)

Verdoorn consideró que la clasificación en subgéneros era necesaria debido a la presencia de

intermediarios. Muchas especies inclusive de otros géneros han sido descritas como *Crinum*, desde hace mucho tiempo y hasta el día de hoy aún se siguen teniendo inconsistencias y errores. (Thi Ngoc Tram et al, 2002d, pp. 183-208)

1.3.2. Usos farmacológicos

Las raíces frescas se utilizan por su capacidad de inducir emesis, las semillas se utilizan como purgantes, diuréticos y tónicos y las hojas como expectorantes, tratamiento en afecciones de la piel y procesos inflamatorios (Thi Ngoc Tram et al, 2002e, pp. 183-208)

1.4. *Crinum x amabile*

1.4.1. Características

También llamada lirio de araña púrpura, lirio de *Crinum* rosado o lirio de araña gigante rosado, es una planta herbácea dotada de un bulbo de 3 a 4 ½ pulgadas de espesor, de aspecto carnoso. Las hojas son lineales y coriáceas que crecen en una roseta, son brillantes de color rojo verdoso, de una longitud de 2 a 4 pies. Sus flores rojas con rosado, cilíndricas de 1 a 3 pies de alto. Un tubo floral de 6 pulgadas de largo con seis pétalos, sépalos y estambres, rosados desde el sector medio hacia dentro, son abundantes en primavera, verano y otoño. Los frutos son lóbulos de cápsulas de semilla de 1 ½ pulgadas de espesor. (Gilman, 2014, pp. 1-2)

Es una planta herbácea perteneciente a la familia Amaryllidaceae. Derivado del griego *krinon*=un lirio y del epíteto latino *amabile*=digno de amor. Es un híbrido entre *Crinum asiaticum* x *Crinum zeylanicum*. (Calderón et al, 2010b, pp. 988-993)

Tabla 2-1 Generalidades de *Crinum x amabile*

<p>Información General</p>	<p>Nombre científico: <i>Crinum x amabile</i> Pronunciación: KRYE-num x uh-MAB-ill-lee Nombre (s) común (es): giant spider Lily</p>
<p>Origen</p>	<p>Vietnamita</p>

Descripción	<p>Altura: 3 a 5 pies</p> <p>Extensión: 3 a 5 pies</p> <p>Hábito vegetal: propagación</p> <p>Densidad de las plantas: abierto</p> <p>Tasa de crecimiento: moderada</p> <p>Textura: gruesa</p>
Follaje	<p>Arreglo de hojas: espiral</p> <p>Tipo de hoja: simple</p> <p>Margen foliar: entero</p> <p>Forma de la hoja: lineal</p> <p>Venación foliar: paralelo</p> <p>Tipo de hoja y persistencia: siempre verde</p> <p>Longitud de hoja: más de 36 pulgadas</p> <p>Color de la hoja: púrpura o rojo</p> <p>Color de la caída: ningún cambio del color a la caída</p> <p>Característica de otoño: no llamativo</p>
Flores	<p>Color de la flor: púrpura; rojo</p> <p>Característica de la flor: floración durante todo el año</p> <p>Fragancia agradable</p>
Fruto	<p>Forma de la fruta: redondo</p> <p>Longitud de la fruta: 1 a 3 pulgadas</p> <p>Cubierta de fruta: seca o dura</p> <p>Color de la fruta: verde</p> <p>Característica de la fruta: vistosa</p>
Tronco y Ramas	<p>Tronco / corteza / ramas: no muy llamativo</p> <p>Color de tallo y ramas: no aplicable</p> <p>Espesor del vástago / espiga: no aplicable</p>
Cultura	<p>Requerimiento de luz: la planta crece en parte sombra / parte sol</p> <p>Tolerancias del suelo: inundaciones prolongadas; arcilla; arena; ácido; ligeramente alcalino; marga</p> <p>Tolerancia a la sequía: moderada</p> <p>Tolerancias de la suciedad del suelo: desconocido</p> <p>Espaciamiento de la planta: 36 a 60 pulgadas</p>
Otros	<p>Raíces: generalmente no es un problema</p> <p>Interés del invierno: la planta tiene interés del invierno debido a la forma inusual, frutas persistentes agradables, tronco llamativo del invierno, o flores del invierno</p> <p>Planta destacada: la planta tiene características ornamentales sobresalientes y podría ser más plantada</p> <p>Potencial invasivo: no se sabe si es invasivo</p> <p>Resistencia a plagas: la salud a largo plazo no suele verse afectada por plagas</p>

Realizado por: Santiago Portero, 2017.
Fuente: Edward Gilman, 2014b, pp. 1-2



Figura 1- 1 *Crinum x amabile*

Fuente: Valeria Zapata, 2016, pp. 85

1.4.2. Taxonomía

Tabla 3-1 Taxonomía de *Crinum x amabile*

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Lilopsida
Subclase	Liliidae
Orden	Asparagales
Familia	Amaryllidaceae
Tribu	Amaryllideae
Subtribu	Crininae
Género	<i>Crinum</i>
Especie	<i>Crinum x amabile</i>

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Fuente: Edward Gilman, 2014c, pp. 1-2

1.4.3. Composición química

Entre los alcaloides representativos hallados en *Crinum x amabile* están: licorina, crinamabina, 4 α -Dehidroxicrinamabina, bufanisina, ambellina, flexitina y augustina, a los que se señala como responsables de los efectos terapéuticos de la planta. (Pham et al, 1998c, pp. 371-376)

A estos alcaloides de los bulbos les acompañan resinas y polisacáridos cuantificados en 5.4% de

sacáridos solubles en agua, 8.7% de pectinas y 8.2% de hemicelulosa. (Thi Ngoc Tram et al, 2002f, pp. 183-208)

Además de glicósidos como el amabilosido (3-hidroxi-4-O - \ beta-D-glucopiranosil-benzaldehído) del cual se estudió el potencial citotóxico y antipalúdico, pero no se encontró actividad relevante (Thi Ngoc Tram et al, 2002g, pp. 183-208) (Cordell, 1993a, pp. 4-7)

1.4.4. Usos

Se describen usos como emético, tratamiento de reumas y otitis, pero además se han descrito propiedades como actividad antiinflamatoria, citostática e inmunoestimulante (Thi Ngoc Tram et al, 2002h, pp. 183-208)

En Ecuador el conocimiento etnofarmacológico, describe usos como antiinflamatorio en el tratamiento de hemorroides en la región de Muisne al oeste de la Provincia de Esmeraldas.

Además, se han descubierto nuevos usos potenciales como antimicrobiano, antiviral y contra el Alzheimer. (Cubilla et al, 2010, pp. 988-993)

1.5. Inflamación

El ser humano, de igual manera que todos los organismos pluricelulares, mantiene mecanismos de defensa frente al ataque de cualquier agente agresor interno o externo. Este ataque activa una cascada defensiva, en la cual la inmunidad innata a través de la inflamación, aísla la lesión y repara el tejido, recuperando la funcionalidad del órgano afectado. (Wendie, 2014a, pp. 2261-2265)

De forma etimológica, la palabra inflamación proviene del latín *inflammatio*, que significa incendio o encender fuego. De allí que se utiliza este término en medicina, dado a cualquier órgano abultado con incremento de calor. (Wendie, 2014b, pp. 2261-2265)

De cualquier forma, el mayor problema a raíz de la inflamación es que el ataque se produzca tanto a agentes nocivos como no nocivos, de forma que puedan causar reacciones de hipersensibilidad, hasta inducción de lesiones graves. (Wendie, 2014c, pp. 2261-2265)

La inflamación es un proceso reparador que, aunque dolorosa, exige un enorme gasto de energía metabólica. (García, 2008a, pp. 91-159)

1.5.1. Definición

Es una respuesta de defensa del sistema inmunológico en nuestro organismo ante diferentes estímulos endógenos y exógenos, de origen mecánico, químico, infeccioso, autoinmune o por procesos radioactivos, donde intervienen reacciones de tipo nervioso, vascular, humoral y celular (Cañavate, 1995a, pp. 80-85)

1.5.2. Importancia del proceso inflamatorio

John Hunter, un respetado cirujano escocés, afirmó que la inflamación no es una enfermedad, sino más bien una respuesta inespecífica, que tiene un efecto beneficioso en el organismo.

De no ser por la inflamación, los procesos infecciosos no podrían ser controlados, la curación y reparación de heridas sería imposible, así como la recuperación del órgano afectado. (Wendie, 2014d, pp. 2261-2265)

Enfermedades en las que la inflamación juega un papel patológico importante	
Anafilaxis Artritis reumatoide Asma Aterosclerosis Colitis ulcerosa Dermatitis atópica Enfermedad de Alzheimer Enfermedad de Crohn (enteritis regional) Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) Esclerosis múltiple Espondilitis anquilosante	Gota Lupus eritematoso Osteoartritis Pénfigo Psoriasis Rechazo xenoinjerto Sarcoidosis Síndr. Isquemia-reperusión Síndr. Fiebre periódica Tiroiditis de Hashimoto Vasculitis
Enfermedades de origen infeccioso en las que la inflamación contribuye a la patología tanto como la toxicidad bacteriana	
Disenteria bacteriana Enfermedad de Chagas Filariasis Gastritis por <i>H. pylori</i> Glomerulonefritis postestreptocócica Hepatitis C	Lepra (forma tuberculoide) Meningitis neumocócica o neisseria Neumonitis fibrosa quística Neumonía viral Sepsis Tuberculosis
Enfermedades de origen diverso en las que la fibrosis postinflamatoria es una causa principal de patología	
Cirrosis hepática (alcohólica o vírica) Esquistosomiasis Fibrosis pulmonar idiopática	Fibrosis pulmonar postirradiación Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina Rechazo crónico alogénico

Figura 2-1 Importancia de la inflamación en las enfermedades

Fuente: Pedro García, 2008a, pp. 91-159.

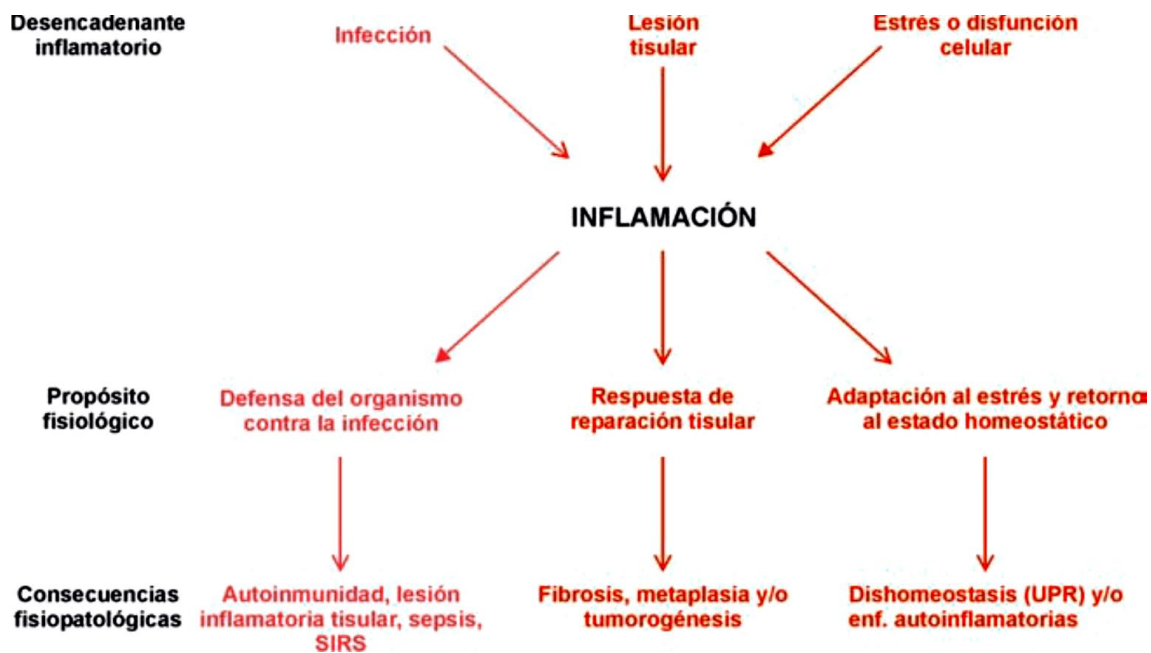


Figura 3-1 Escenarios de actuación de la inflamación

Fuente: Pedro García, 2008b, pp. 91-159.

1.5.3. Factores de la inflamación

Tabla 4-1 Factores endógenos y exógenos de la inflamación.

Factores endógenos	Factores Exógenos
Necrosis tubular	Mecánicos (corte)
Rotura ósea	Físicos (quemaduras)
	Químicos (corrosivos)
	Biológicos (microorganismos)
	Inmunológicos (hipersensibilidad)

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Fuente: Erika Villalba, 2014, pp. 226-2265.

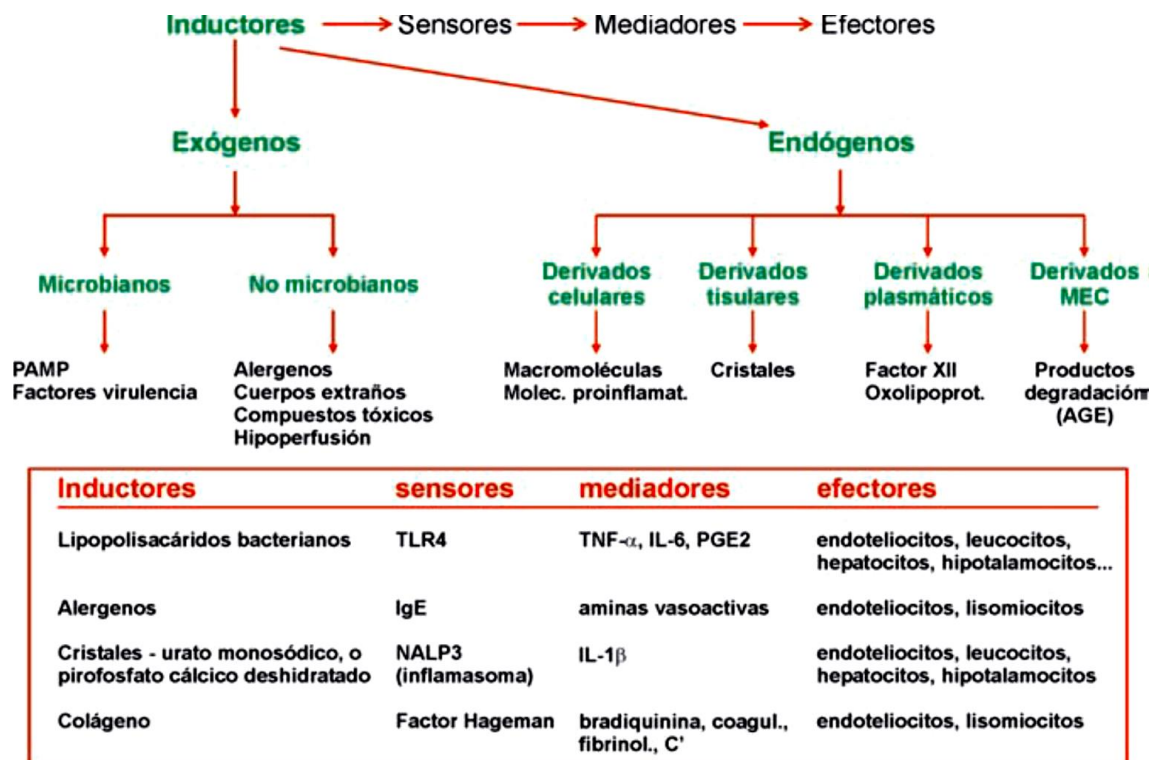


Figura 4-1 Factores inductores de la inflamación.

Fuente: Pedro García, 2008c, pp. 91-159.

1.5.4. *Proceso de inflamación*

El proceso inflamatorio inicia después de la lesión inicial, lo que genera vasodilatación desencadenando enrojecimiento e incremento de temperatura por la entrada de microbios y compuestos exógenos o endógenos (Gómez et al. 2011a, pp. 182-217) en la zona afectada desencadenado por mediadores bioquímicos como la histamina, cininas y prostaglandinas que generan una reacción en cascada cuyos efectos son la hinchazón o tumoración y la pérdida de función del tejido u órgano.(Cañavate, 1995b, pp. 80-85)

Tradicionalmente se ha considerado a la inflamación por cuatro signos de Celso: Calor, Rubor, Tumor y Dolor. El calor y rubor dados por las alteraciones vasculares, donde se observa una acumulación sanguínea en el sitio de la inflamación. El tumor producido por la acumulación de células inmunes y el dolor por la acción de determinados mediadores sobre terminaciones nerviosas del dolor.(Bordés et al, 2010a, pp. 9-12)

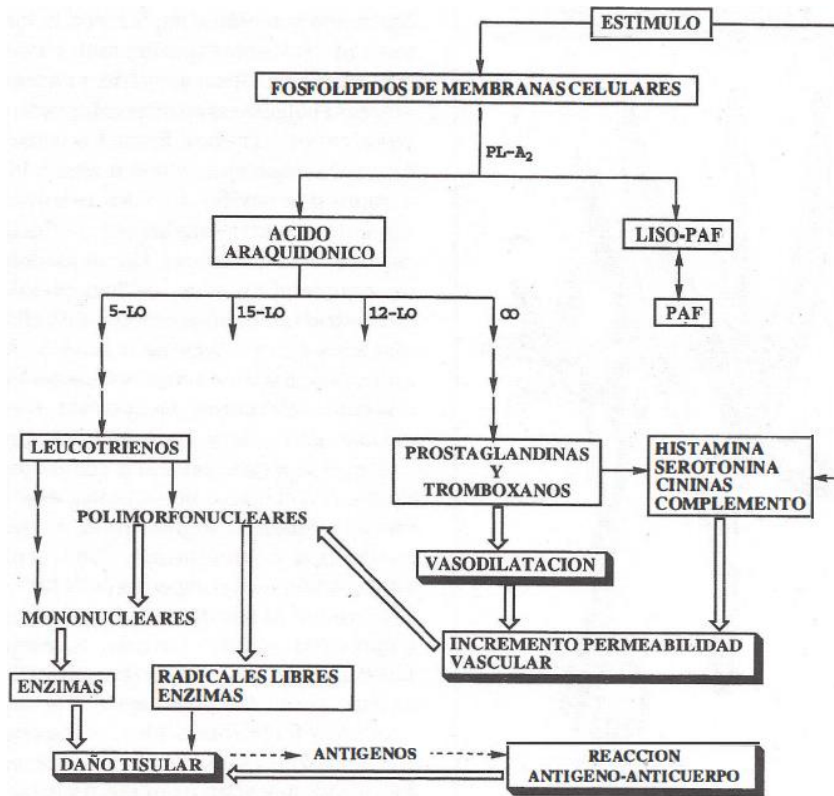


Figura 5-1 Proceso de la inflamación

Fuente: Ríos J, 2012. pp. 12

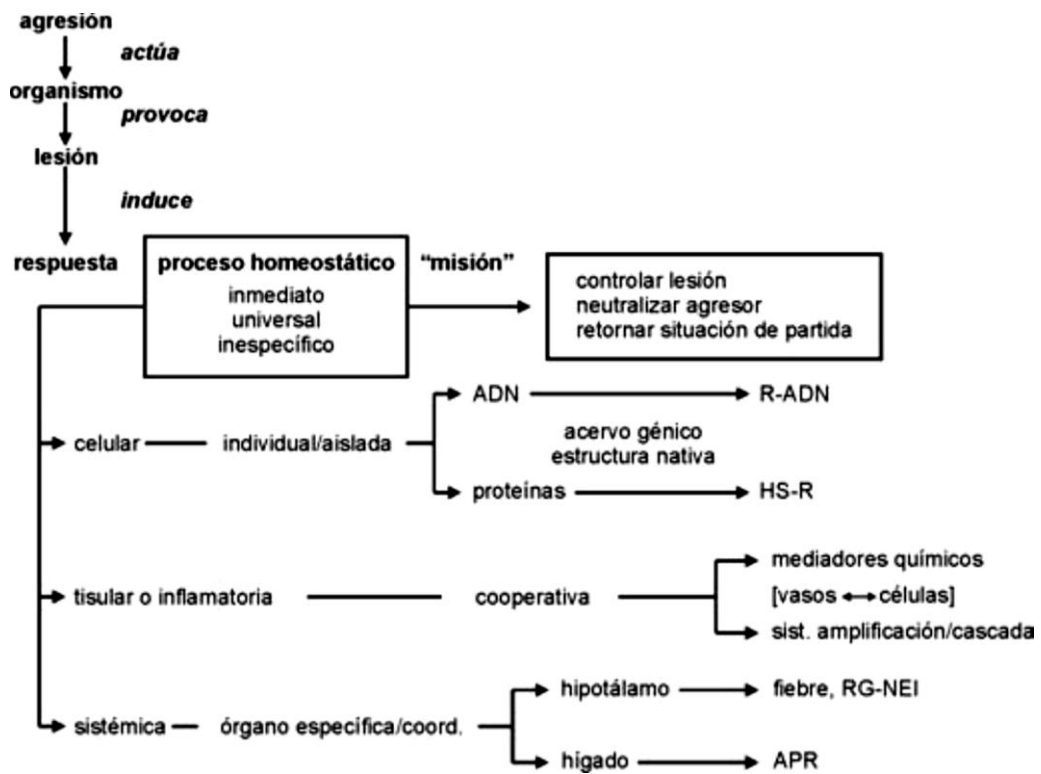


Figura 6-1 Respuesta del organismo a agresiones

Fuente: Pedro García, 2008d, pp. 91-159.

1.5.4.1. *Liberación de mediadores. el mastocito*

El mastocito es la principal fuente de mediadores de la inflamación, que se hallan en los gránulos en el citoplasma de éste. Procede de la médula ósea, se hallan casi en todos los tejidos, aunque sus mecanismos de diferenciación no son bien conocidos.

Cuando son activados, liberan dichos factores, junto con otros de carácter lipídico, sintetizados de novo. Todos estos factores son hallados principalmente en las cercanías de pequeños vasos, sobre los cuales actuarán al ser liberados.

La liberación de agentes mediadores tienen su origen en distintos procesos; sin embargo, quizá el más frecuente es el ataque directo a la célula por el agente agresivo. Cuando se activa la inflamación en primer lugar se activan factores del complemento el C3a y el C5a, los cuales actúan sobre los receptores de membrana, activando al mastocito y con ello la liberación de mediadores.

Otro mecanismo frecuente es mediante la IgE, cuando ésta es captada en la membrana del mastocito, que presenta receptores para la porción Fc de esta inmunoglobulina (FceR). Este antígeno activa al mastocito cuando dos IgE contiguas se conectan específicamente sobre la membrana.

Un mecanismo no muy conocido se produce en la membrana, con la activación de adenilato-ciclasa+ y fosfolipasa A2. La adenilato-ciclasa incrementa en un inicio la concentración intracitoplasmática de cAMP y la fosfolipasa A2 ataca a los lípidos de la membrana, lo cual genera ácido araquidónico. Al mismo tiempo se incrementa la permeabilidad del calcio Ca^{++} y con esto la concentración en el citoplasma.

El incremento en la cantidad de cAMP y Ca^{++} , permiten la formación de microtúbulos en el mastocito y la movilización de mediadores al espacio extracelular. Siendo estos mediadores histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo (ECF-A, eosinophil chemotactic factor), factor quimiotáctico del neutrófilo (NCF, neutrophil chemotactic factor) y heparina.

Existen dos vías metabólicas para el ácido araquidónico, ambas con resultados de carácter lipídico. La primera de la enzima ciclo-oxigenasa, que permite la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos. La segunda de la enzima lipooxigenasa que culmina en la formación de

leucotrienos. Son un segundo grupo de mediadores importantes de la inflamación, sintetizadas de novo por el mastocito.

Asimismo, el basófilo es una célula sanguínea que colabora con el mastocito en la liberación de mediadores, ya que sigue procesos similares a ésta, con la producción de metabolitos equivalentes a los producidos por los mastocitos. (Bordés et al, 2010b, pp. 9-12)

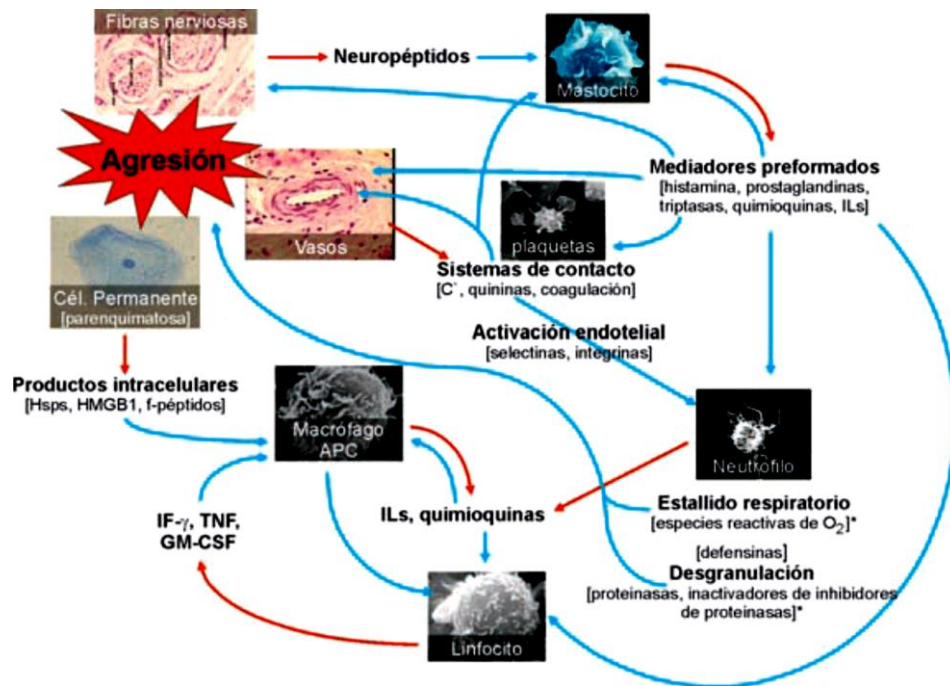


Figura 7-1 Flujo de información desencadenado por una herida contaminada

Fuente: Pedro García, 2008e, pp. 91-159.

1.5.4.2. Efecto de los mediadores

Mediadores preformados

- Histamina: Se halla en todo el organismo, producido por descarboxilación del aminoácido histidina, actúa sobre los receptores H1, produciendo vasodilatación e incremento de la permeabilidad y sobre los receptores H2 produciendo efectos inhibidores o reguladores de la inflamación.
- Enzimas proteolíticas: La más importante la kininogenasa, la cual actúa sobre proteínas sanguíneas llamadas kininógenos, donde se rompen en péptidos llamados kinina, las cuales producen vasodilatación, aumento de la permeabilidad y estimulan terminaciones nerviosas del dolor.

- Factores quimiotácticos: El ECF-A, atraen a eosinófilos al foco inflamatorio, activándolas al mismo tiempo. Mientras que el NCF, atrae y activa al neutrófilo.
- Heparina: Es un factor regulador, inhibe la coagulación con lo que favorece la llegada de moléculas y células al foco inflamatorio.

Mediadores sintetizados de novo

- PGE2: Prostaglandina más importante en la inflamación, genera inflamación y dolor, junto con el factor C5a y LTB4 incrementa la permeabilidad vascular.
- LTB4: Factor quimiotáctico para neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y macrófagos.
- Factor activador de plaquetas (PAF): Es un poderoso quimiotáctico y activador de neutrófilos, activa la agregación plaquetaria, libera mediadores para el proceso de coagulación, además produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. (Bordés et al, 2010c, pp. 9-12)

1.5.4.3. Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

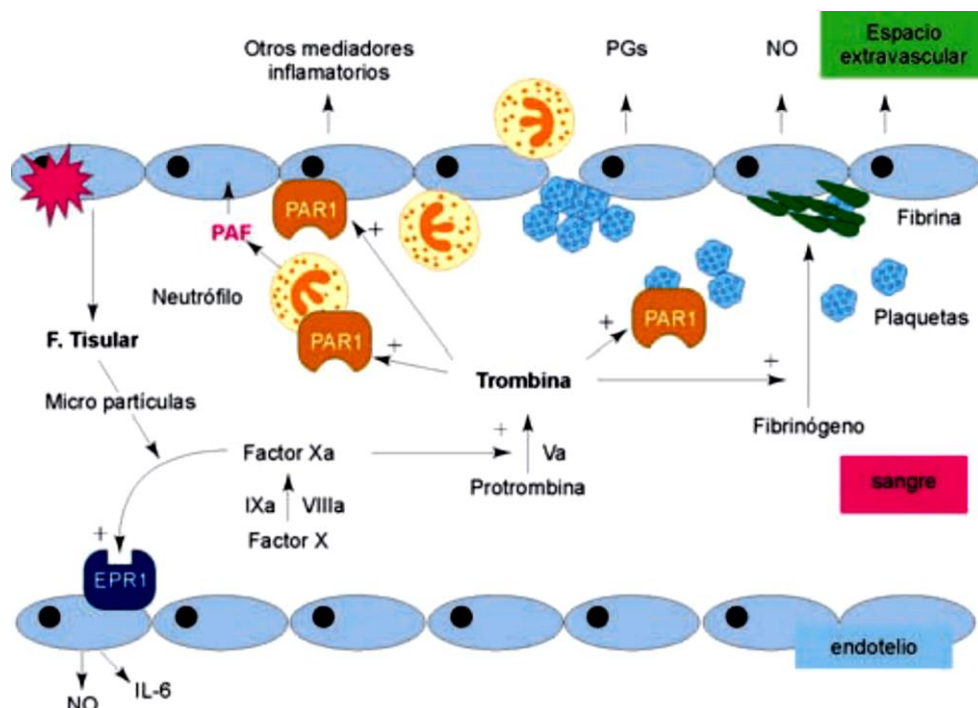


Figura 8-1 La activación del receptor activado por proteasa del subtipo 1

Fuente: Pedro García, 2008f, pp. 91-159.

Fase inicial. Llegada de moléculas

Se producen cambios vasculares que facilitan la migración de moléculas desde la sangre hacia el foco inflamatorio y la formación de edema.

- Inmunoglobulinas: La IgM e IgG activan el complemento por vía clásica, al mismo tiempo la IgG se une a los receptores de membrana por la porción Fc (FcR), con lo que se potencia la fagocitosis.
- Factores del complemento: AL activarse el complemento, produce la lisis de la célula extraña inductora de la inflamación. Los factores C3a y C5a activan mastocitos y basófilos, lo que permite la liberación de mediadores y con esto amplifican la inflamación. El factor C5a es un potente agente quimiotáctico mientras que el factor C3b potencia a fagocitosis al unirse a receptores de membrana.
- Kininógenos: Dan origen a las kininas, cuando actúan sobre estas las kininogenasas.
- Proteínas de la fase aguda: Destaca la proteína C Reactiva (PCR) que fija determinados gérmenes y activa el complemento por vía clásica.
- Factores de coagulación.

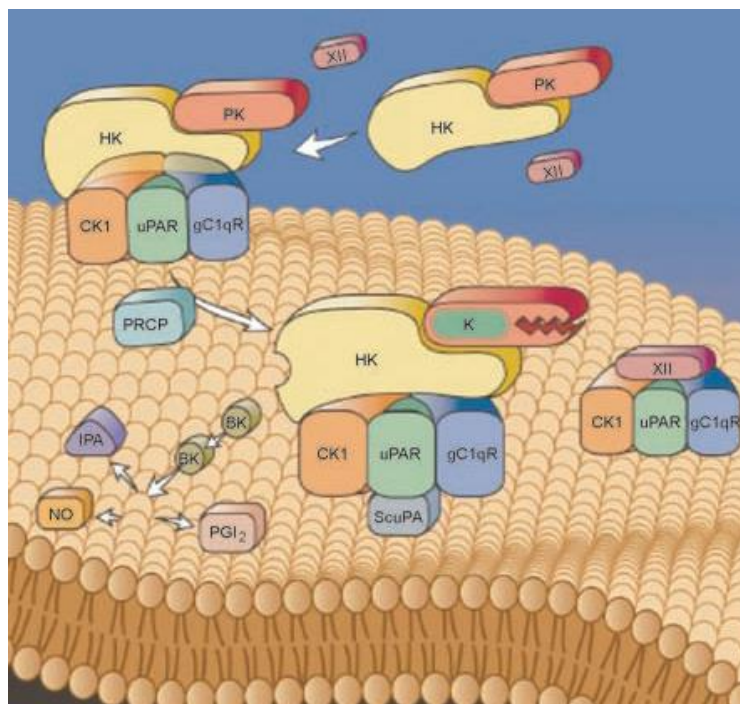


Figura 9-1 Ensamblaje y activación del sistema caliceína-quinina (KKS) plasmático.

Fuente: Pedro García, 2008g, pp. 91-159.

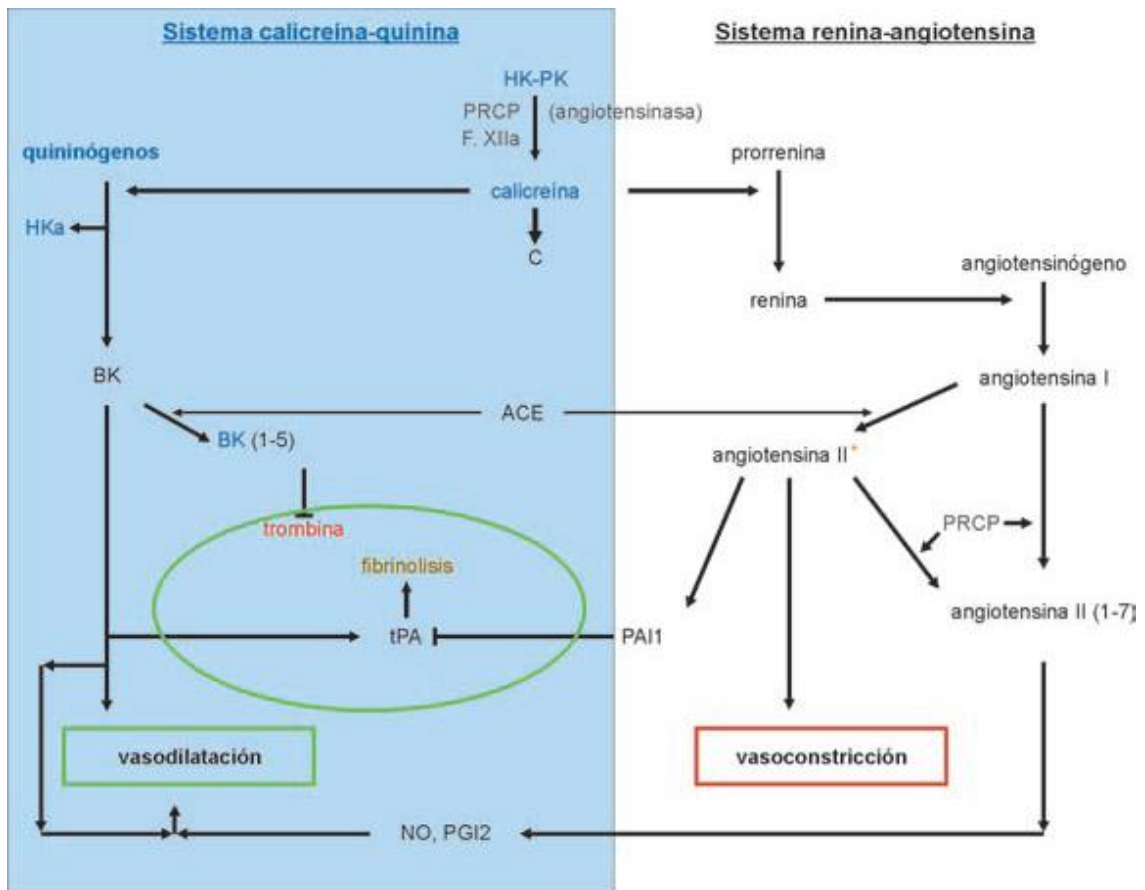


Figura 10-1 Interacción entre los sistemas caliceína-quinina (KKS) y renina-angiotensina (RAS) plasmáticos.

Fuente: Pedro García, 2008h, pp. 91-159.

Fase tardía. Llegada de células

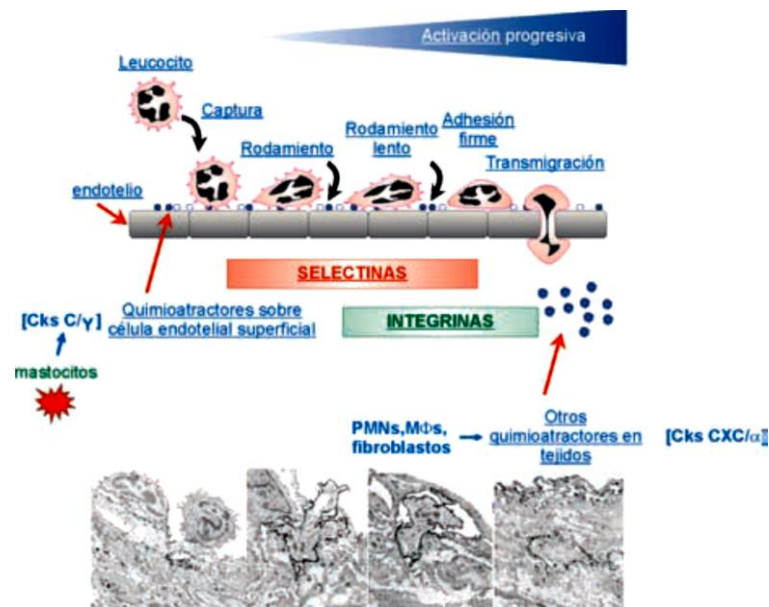


Figura 11-1 Cascada de adhesión leucocitaria

Fuente: Pedro García, 2008i, pp. 91-159.

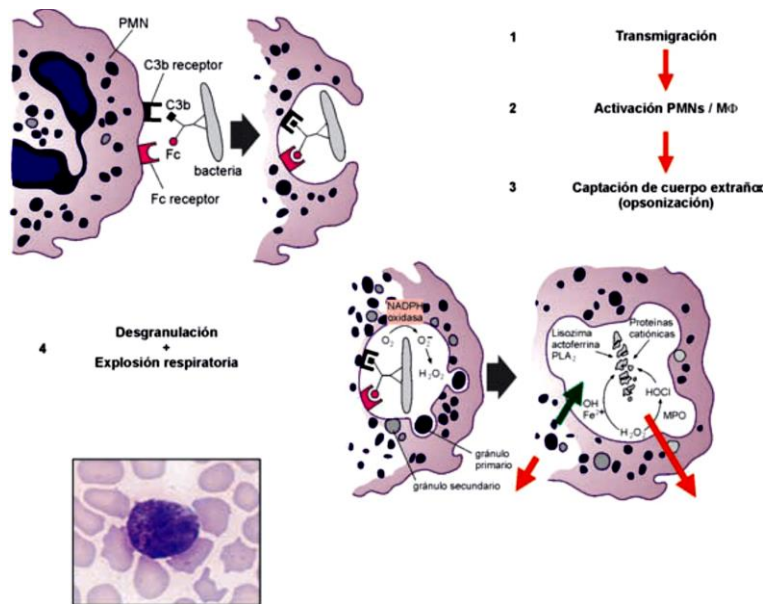


Figura 12-1 Fagocitosis por Neutrófilo

Fuente: Pedro García, 2008j, pp. 91-159.

- Basófilo: Libera mediadores junto con el mastocito.
- Neutrófilo: Es una de las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Elimina el germen mediante fagocitosis o mediante factores tóxicos presentes en sus gránulos.
- Monocito/Macrófago: Llegan al foco inflamatorio más tardíamente, actúan de manera similar al neutrófilo pero además, actúa como célula presentadora del antígeno a células específicas T y B, iniciando de esta forma la respuesta específica.

El macrófago sintetiza interleucina 1 (iL-1), es una hormona del sistema inmune, que determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de PGE en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del hipotálamo.

Asimismo, favorece la neutrofilia, actúa sobre el centro termorregulador de la médula ósea, e incrementa la síntesis de proteínas de la fase aguda.

De forma local la IL-1 activa la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B, con lo que contribuye a la respuesta específica. Finalmente activa la proliferación de fibroblastos y colágeno, indispensables en la fase de reparación.

- Linfocitos T y B: Son los responsables de iniciar la respuesta específica. Los linfocitos B

sintetizan IgE, que conjuntamente con el mastocito o basófilo, se potencia la inflamación. Los linfocitos T producen linfoquinas las que prolongan la inflamación mediante una respuesta inmune más elaborada.

- Eosinófilo: Tiene una función reguladora en la inflamación. (Bordés et al, 2010d, pp. 9-12)

1.5.4.4. *Regulación de la respuesta inflamatoria.*

- Histamina: Actúa sobre los receptores H₂, inhibiendo la liberación de mediadores del mastocito y el basófilo, limita la actividad del neutrófilo, inhibe la quimiotaxis y activa los linfocitos T supresores.
- PGE: Inhibe la liberación de mediadores de los mastocitos y la diferenciación y proliferación de linfocitos.
- Agonistas autonómicos: Células como el mastocito y basófilo presentan receptores α y β -adrenérgicos y β -colinérgicos, lo que indica que la liberación de mediadores tendría una regulación autónoma. Los receptores β -adrenérgicos producen una inhibición y los receptores α -adrenérgicos y β -colinérgicos inducen la estimulación.
- Heparina: Limita la activación de factores del complemento e inhibe la coagulación.
- Eosinófilo: Libera una serie de enzimas que degradan determinados mediadores potenciadores de la inflamación. La fosfolipasa actúa sobre el PAF, la arilsulfurasa sobre los leucotrienos y la histaminasa sobre la histamina. (Bordés et al, 2010e, pp. 9-12)

1.5.4.5. *Reparación*

Se inicia cuando el agente causante ha sido eliminado. En estos procesos se contempla la llegada a la zona de fibroblastos que sintetizan colágeno, proliferación de células epiteliales y vasos dentro de la herida. Aunque no se conocen los mediadores de este proceso, se considera que puede ser la iL-1 la responsable de la activación de fibroblastos. (Bordés et al, 2010f, pp. 9-12)

1.5.5. *Tipos de inflamación*

La clasificación de la inflamación se realiza considerando el tiempo de duración, carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización.

1.5.5.1. *Por la duración*

➤ *Inflamación aguda*

Es una respuesta a un agente causal, en un tiempo relativamente corto, se caracteriza por la presencia de exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos principalmente de neutrófilos. (Klinger et al, 2005, pp. 120-129)

Generalmente se produce una respuesta aguda en la que se presenta un cuadro clínico caracterizado por malestar, fiebre, así como modificaciones en el perfil de proteínas y células mediadoras como los leucocitos, sin embargo en ocasiones la inflamación aguda local puede generalizarse en un proceso que se denomina Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica en el cual mediante una secuencia de reacciones como una espiral sin control (Inflamación maligna), termina en fracaso multiorgánico, muriendo el individuo.(García, 2008b, pp. 91-159)

➤ *Inflamación crónica*

Es una respuesta a un agente causal, que se diferencia de la aguda por el tiempo de duración más prolongado que puede ser semanas, meses o años y se caracteriza por la infiltración de linfocitos y macrófagos con la proliferación de tejido conectivo y vasos sanguíneos. (Guimarães et al, 2009, pp. 304-310)

1.5.5.2. *Por el carácter de exudado*

➤ *Trasudado*

Caracterizada por la prevalencia de líquido extravascular, con un bajo contenido de proteínas, producido por un cambio ligero en la permeabilidad vascular. (Wendie, 2014e, pp. 2261-2265)

➤ *Exudado*

Presencia de líquido inflamatorio extravascular, con alto contenido de proteínas, con alta permeabilidad en los vasos sanguíneos. (Wendie, 2014f, pp. 2261-2265)

1.5.5.3. *Por la etiología*

➤ *Infecciosas: ya sea por bacterias, virus, parásitos o por toxinas microbianas*

- Traumáticas como golpes intensos con respuesta inmediata o tardía, como ocurre con los esguinces o higromas.
- Térmicas resultantes de, quemaduras por calor o congelamiento.
- Irradiaciones.
- Por exposición a agentes químicos ambientales.
- Necrosis tisular.
- Presencia de cuerpos extraños como astillas.
- Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad, a alérgenos comunes o procesos colagenopáticos. (Wendie, 2014g, pp. 2261-2265)

1.5.5.4. *Por sus características morfológicas*

- Serosa: por acúmulo de líquido tisular de bajo contenido proteico.
- Fibrinosa: con presencia de exudado con grandes cantidades de fibrinógeno.
- Supurativa o purulenta: se caracteriza por la producción de exudados purulentos que consta de leucocitos y células necróticas.
- Abscesos: presenta tejido inflamatorio purulento acompañado de necrosis licuefactiva.
- Úlceras: producidas por esfacelamiento de tejido necrótico inflamado. (Wendie, 2014h, pp. 2261-2265)

1.5.5.5. *Por su localización*

- Focales

Se producen en áreas y órganos específicos, en donde para nombrarlos se utiliza el sufijo (itis). (Wendie, 2014i, pp. 2261-2265)

- Diseminados

Se producen por la expansión de varios procesos inflamatorios persistentes, ya sea por vía canalicular, fistulización o metástasis. (Wendie, 2014j, pp. 2261-2265)

1.5.6. *Terapia antiinflamatoria*

1.5.6.1. *Terapia convencional*

Antiinflamatorios Esteroides o Glucocorticoides

Son los antiinflamatorios más potentes, inducen su actividad antiinflamatoria reduciendo el número de eosinófilos y la activación de estos, produciendo apoptosis, disminuyen la proliferación de células T, monocitos, mastocitos, células dendríticas, y otras células inflamatorias (Gómez et al, 2011b, pp. 182-217), limitando la cantidad de citoquinas y mediadores proinflamatorios y disminuyendo ciertos factores quimiotácticos como las IL-3 y 5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos eotaxina y la citoquina RANTES (citoquina de células T).

Fármacos: hidrocortisona, cortisona, mometasona, dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona. (Montoya, 2006a, pp. 123-126)

Analgésicos, antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Los AINES son sustancias de composición química diferente que actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, mediante la inhibición de las enzimas COX. Su uso está relacionado con de la intensidad del dolor. (Gómez et al, 2011c, pp. 182-217)

Fármacos: Paracetamol, ibuprofeno, ácido acetyl salicílico, indometacina, diclofenaco, meloxicam, piroxicam, entre otros. (Montoya, 2006b, pp. 123-126)

1.5.6.2. *Fitoterapia*

El uso de plantas medicinales como terapia alternativa para el tratamiento de la inflamación, permite mejorar el proceso y en ocasiones resolverlo completamente sin necesidad de efectos secundarios o adversos. (Gómez et al, 2011d, pp. 182-217)

Las ventajas de utilizar fitoterapia en comparación con la terapia convencional además de la reducida aparición de efectos secundarios, la posibilidad de actuar en varios niveles del proceso inflamatorio, que a pesar que las plantas poseen un efecto reducido con respecto a los medicamentos convencionales, la diversidad de compuestos que las plantas poseen, permite tener una acción potenciada del efecto farmacológico deseado. (Gómez et al, 2011e, pp. 182-217)

Las sustancias responsables de la actividad antiinflamatoria en las plantas son compuestas fenólicas, flavonoides, alcaloides, terpenos, saponinas y compuestos relacionados, lignanos, entre otros. (Gómez et al, 2011f, pp. 182-217)

1.6. Alcaloides

1.6.1. Actividad biológica

Los alcaloides son el grupo más grande de metabolitos secundarios que contienen las plantas. Poseen diversas actividades beneficiosas, aunque algunas tóxicas también. Entre las actividades biológicas de los alcaloides tenemos: eméticos, anti-colinérgicos, antitumorales, diuréticos, simpaticomiméticos, antivirales, antihipertensivos, hipno-analgésicos, antidepresivos, mio-relajantes, antitusígenos, antimicrobianos y antiinflamatorios. (Souto et al, 2011a, pp. 8515-8534)

1.6.2. Actividad antiinflamatoria

La warifteína, un alcaloide bisbencilisoquinolina, aislado de *Cissampelos sympodialis* inhibe la incorporación de eosinófilos, la eotaxina y la producción de cisteinil leucotrieno en los pulmones de ratones alérgicos, así como la limitación de la producción de mediadores de óxido nítrico.

La matrina y oxymatrina, alcaloides de quinolizidina aislados de *Sophora subprostrata*, inhiben la ciclooxigenasa y poseen una apreciable actividad antioxidante in vitro.

Alcaloides indólicos como la brucina y brucina-N-óxido, han demostrado poseer propiedades antiinflamatorias y analgésicas en varios modelos. Son inhibidores del enema producido por carragenano. Disminuyen la permeabilidad vascular inducida por ácido acético e inhibido la liberación de PGE2 sobre el tejido inflamado.

El caulerpin, un alcaloide bisindólico encontrado en las algas *Caulerpa racemosa*, demostró tener actividad antiinflamatoria al ser administrado por vía oral en una concentración de 100 µmol/kg. Este efecto probablemente por su núcleo fármaco-fólico bisindólico.

Alcaloides como la riparina I (N-benzoil tiramina) y II (N-(2-hydroxybenzoil) tyramina), hallados en el fruto maduro de *Aniba riparia*, disminuyeron el edema inducido por carragenano. Al parecer el grado de hidroxilación del resto benzoilo incrementa la actividad antiinflamatoria. (Souto et al, 2011b, pp. 8515-8534)

1.6.3. Estudios in-vitro que describen la actividad antiinflamatoria

Los estudios antiinflamatorios se han realizado en células leucocitarias y macrófagos, que responden a estímulos ocasionando la liberación de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno en un proceso denominado estallido oxidativo.

1.6.3.1. Ensayo colorimétrico con sales de tetrazolio

El estallido oxidativo dado por los neutrófilos, se mide mediante espectrofotometría y en tejidos por la determinación de sales de tetrazolio que se reduce intracelularmente en formazán insoluble, mediada por el NADPH oxidasa.

Ensayos realizados con WST-1, muestran una mayor sensibilidad, debido a la baja absorbancia de fondo y su eficiente reducción por el superóxido a formazán soluble en agua con gran capacidad de absorción molar.

Hay que considerar que las sales de tetrazolio han sido los más estudiados en cuanto a actividad metabólica celular, ya que la reducción de sales de tetrazolio por el NADH se relaciona con las mitocondrias, sus membranas y el citoplasma.

Con ello el uso de sales de tetrazolio adquiere una gran importancia en el desarrollo de investigaciones sobre el metabolismo celular y sus aplicaciones en biología celular. (Tan & Berridge, 2000a, pp. 59-68)

1.7. Citotoxicidad

La citotoxicidad es el daño causado a las células mediante la acción de agentes químicos. Los estudios in vitro sobre citotoxicidad se realizan mediante términos de viabilidad celular, es decir, células que son viables metabólicamente o que se encuentren metabólicamente activas con su membrana totalmente intacta. (Nair et al, 2016a, pp. 107-156)

La citotoxicidad tiene su importancia en estudios llevados a cabo en líneas celulares tumorales y cancerosas, donde la investigación y experimentación con nuevas moléculas se vuelve primordial.

1.7.1. Estudios in-vitro que describen la actividad citotóxica

Los estudios de citotoxicidad in vitro se realizan con el uso de células y otros seres vivos como al

artemia salina, en el cual se describe la citotoxicidad mediante el número de organismo o células que se mantienen vivas.

1.7.1.1. *Ensayo colorimétrico con sales de tetrazolio*

El WST-1 es una sal de tetrazolio (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) el cual se transforman en formazán por la rotura de un enlace por el complejo sistema mitocondrial-succinato-tetrazolio-reductasa, que es activo únicamente en células viables. De allí resulta la relación directa entre la cantidad producida de formazán con el número de células vivas, medidas espectrofotométricamente. (Venderrel & Serra, 2008, pp. 42-43)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de la investigación

Se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Recolección del material vegetal.

Se recolectaron muestras de la planta *Crinum x amabile*, en la playa del cantón Muisne, en la provincia de Esmeraldas, verificándose las coordenadas geográficas: 0°36'09.5" N 80°01'30.1" W.

2.3. Identificación del material vegetal

Se tomaron dos muestras diferentes del material vegetal, las mismas que fueron analizadas e identificadas en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por el Ing. Jorge Caranqui y posteriormente las muestras se trasladaron al Laboratorio de Productos Naturales.

2.4. Materiales, equipos y reactivos

Para el desarrollo de la presente investigación, fueron necesarios los siguientes materiales, equipos y reactivos detallados a continuación.

2.4.1. *Material vegetal*

Se utilizaron las hojas y el bulbo de la planta *Crinum x amabile*. La planta fue secada a temperatura ambiente, en un lugar seco fuera del alcance de los rayos del sol. Posteriormente fue triturada en un molino marca Arthur H. Thomas C.O hasta obtener partículas de 2 – 3 mm, para poder utilizarla en la obtención de extractos pertinentes.

2.4.2. *Material Biológico*

Para el ensayo de la actividad antiinflamatoria y citotóxica fue necesario aislar neutrófilos a partir de sangre humana.

2.4.3. *Material farmacológico*

Se utilizó 100 mg de ácido acetil salicílico sin cafeína como control positivo en el ensayo de la actividad antiinflamatoria.

2.4.4. *Materiales de laboratorio utilizados*

Tabla 1-2 Materiales de laboratorio

Análisis	Materiales
Control de Calidad de Materia Prima	Cápsulas de porcelana
	Piseta
	Reverbero
	Crisoles de porcelana
	Pinzas para cápsula
Tamizaje Fitoquímico	Frascos ámbar de 1000ml
	Embudos simples
	Pipetas graduadas de 1mL, 5mL y 10mL
	Gradilla
	Tubos de ensayo
	Vasos de precipitación de 250mL
	Trípodes
	Algodón
	Papel Filtro
Obtención del Extracto bruto	Pipetas de 5mL y 10mL
	Probeta de 250mL
	Embudo Buchner
	Kitasato
	Frasco tapa rosca de 10mL
	Embudos de separación 150mL
	Tubos de ensayo

Extracción de Alcaloides	Vaso de precipitación de 250mL
	Balones esmerilados de 150mL
	Pipetas Pasteur
	Pipeta graduada 10mL
Ensayo Antiinflamatorio y Citotóxico	Alcohol antiséptico
	Algodón
	Jeringas 1mL, 3mL, 5mL, 10mL y 20mL
	Torniquete
	Tubos de ensayo
	Microposillos
	Micropipeta automática graduable 10 μ L - 100 μ L
	Micropipeta automática graduable 100 μ L - 1000 μ L
	Puntas azules
	Vasos de precipitación de 25mL
Ensayo actividad antioxidante	Puntas amarillas
	Balones aforados 10mL y 250mL
	Tubos de ensayo
	Pipetas 5mL y 10mL
	Paleta
Piseta	

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

2.4.5. Equipos

Tabla 2-2 Equipos de laboratorio

Análisis	Equipo
Control de Materia Prima y Tamizaje Fitoquímico	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Estufa Memmert SNB400
	Sonicador Marca Branson 2510
	Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C
	Desecador
	Balanza analítica Radwag
Obtención del extracto bruto	Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath
	Vórtex mixer MRC S1 – 100

	Sonicador Marca Branson 2510
	Agitador magnético Dragon LAB MS-S
Extracción de Alcaloides	Sonicador Marca Branson 2510
	Estufa Memmert SNB400
Ensayo Antiinflamatorio, Citotóxico y Antioxidante	Vórtex mixer MRC S1 – 100
	Sonicador Marca Branson 2510
	Agitador magnético Dragon LAB MS-S
	Lector de microplacas
	Centrífuga
	Balanza analítica Radwag

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

2.4.6. *Reactivos*

Tabla 3-2 Reactivos

Análisis	Reactivos
Tamizaje Fitoquímico	Reactivo de Dragendorff
	Reactivo de Mayer
	Reactivo de Wagner
	Reactivo de Baljet
	Reactivo de Liberman Buchard
	Reactivo para catequinas
	Reactivo para resinas
	Reactivo de Fehling
	Reactivo de FeCl ₃
	Reactivo de Borntrager
	Reactivo de Shinoda
	Reactivo de antocianidinas
	Magnesio metálico
Cloruro de sodio	
Obtención del extracto bruto	Metanol
Extracción de Alcaloides	Metanol
	Ácido sulfúrico al 2%
	Eter etílico
	Hidróxido de amonio al 25%
	Acetato de etilo

	Sulfato anhidro de sodio
	Goma arábica
Ensayo Antiinflamatorio	Agua destilada
	Ficoll Paque
	Zimozan
	Reactivo WST-1
	Solución modificada de Hans al 9.5g/L
	Dimetil sulfóxido al 5%
	Tritón X al 0.1%
	Solución de aspirina
Ensayo Citotóxico	Agua destilada
	Ficoll Paque
	Reactivo WST-1
	Solución modificada de Hans al 9.5g/L
	Dimetil sulfóxido al 5%
	Tritón X al 0.1%
Ensayo Antioxidante	Solución patrón de ácido gálico
	Metanol
	Solución de DPPH
	Agua destilada

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

2.5. Técnicas y métodos

2.5.1. Determinación de los parámetros de control de calidad de la droga cruda

Una vez recolectada la planta en cantidades suficientes, se realizó el control de calidad de la droga cruda, para lo cual se realizó ensayos por triplicado, en base a métodos fisicoquímicos, con lo cual se garantizó la calidad de la droga. Se detalla los procedimientos que se realizó establecidos en el folleto de Farmacognosia y Productos naturales.

2.5.1.1. Determinación del contenido de humedad

Es un análisis que nos permite determinar la cantidad de agua que posee la planta, como indicador de estabilidad es de gran importancia ya que un exceso de humedad puede incrementar el riesgo de contaminación microbiana al igual que la hidrólisis de ciertos metabolitos que pueda presentar

la droga.

El método más utilizado es el gravimétrico, por su sencillez, aunque no es recomendable hacerlo cuando la muestra presenta drogas volátiles.

Procedimiento

Se pesaron 2 g de droga seca y triturada en una balanza analítica, a esta se la colocó en una cápsula de porcelana previamente tarada. Se desecó la muestra en la cápsula a 105 °C en una estufa de aire caliente, durante tres horas, luego se la colocó en un desecador durante 15 minutos hasta que se enfrió, la pesamos y nuevamente se la llevó a la estufa durante una hora más.

Se sacó nuevamente la cápsula y se la dejó enfriar en el desecador, pesando cada cierto tiempo hasta que se obtuvo un peso constante.

Expresión de Resultados

$$Hg = \frac{M2 - M1}{M2 - M} \times 100$$

Donde:

Hg = pérdida en peso por desecación (%).

M2 = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M1 = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

2.5.1.2. Determinación de cenizas totales

Las cenizas totales son todo el contenido inorgánico que presenta la droga y que es detectada al incinerarla. Este contenido inorgánico pertenece a los minerales que posee la droga.

Procedimiento:

Se pesó 2 g de la muestra pulverizada en un crisol de porcelana previamente tarado. Se calentó suavemente la muestra hasta carbonizar y posteriormente se incineró en una mufla a 750 °C durante dos horas.

Se enfrió el crisol en un desecador y se pesó, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas no difirieron en más de 0.5 mg por g (masa constante).

Fue necesario añadir peróxido de hidrógeno concentrado para blanquear la muestra, debido a que nos quedaron trazas de carbón.

Expresión de resultados:

$$C = \frac{M2 - M1}{M2 - M} \times 100$$

Donde:

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = masa del crisol vacío (g)

M1 = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M2 = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático para los cálculos.

2.5.1.3. *Determinación de cenizas solubles en agua*

Son parte de las cenizas totales, con la diferencia que se disuelven en agua.

Procedimiento:

A las cenizas totales obtenidas en el apartado anterior se le añadió 15 mL de agua, se tapó el crisol y se hirvió suavemente con el mechero durante 5 minutos. Se filtró y las cenizas restantes se colocaron nuevamente en el crisol inicial, se carbonizó e incineró nuevamente en la mufla por 2 horas más. Se enfrió el crisol en un desecador y se pesó, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas no difirieron en más de 0.5 mg por gramo.

Expresión de resultados:

$$C = \frac{M2 - M1}{M2 - M} \times 100$$

Donde:

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M2 = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M1 = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.5.1.4. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.*

Es el residuo que se obtiene después de disolver las cenizas restantes en ácido clorhídrico al 10%.

Procedimiento:

Una vez se obtuvo las cenizas totales, se le añadió 2 – 3 mL de ácido clorhídrico al 10% en un crisol, luego éste se tapó con un vidrio reloj y se calentó en un baño de agua hirviente durante 10 minutos.

Se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y unido al resto del crisol. Se filtró a través de papel filtro, se lavó el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico al cual se añadió dos gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L no mostró presencia de cloruros.

Se desecó en una estufa a 105 °C por 2 horas, posteriormente se colocó en un desecador y se pesó, repitiéndose el proceso hasta que dos pesadas no difirieron en más de 0.5 mg por gramo.

Expresión de resultados:

$$C = \frac{M2 - M1}{M2 - M} \times 100$$

Donde:

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

M2= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático.

2.5.2. *Tamizaje Fitoquímico*

El “screening” o tamizaje fitoquímico, es una de las etapas iniciales de la investigación, que permite la determinación cualitativa de los principales grupos químicos presentes en las plantas.

Consiste en la maceración con solventes de diferente polaridad con el fin de maximizar la

extracción de metabolitos. Permite una evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducible y de bajo costo.

Sin embargo los resultados del tamizaje fitoquímico son únicamente una orientación que debe ser interpretada en conjunto con los resultados de screening farmacológico o con bases científicas de sus posibles acciones terapéuticas.

Procedimiento:

Las hojas y bulbos de la planta seca trituradas, por separado, se extrajeron con solventes de diferente polaridad como se muestra en el siguiente esquema basado en las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas. (Rodríguez & Moran, 2008a, pp. 19-23)

Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico.

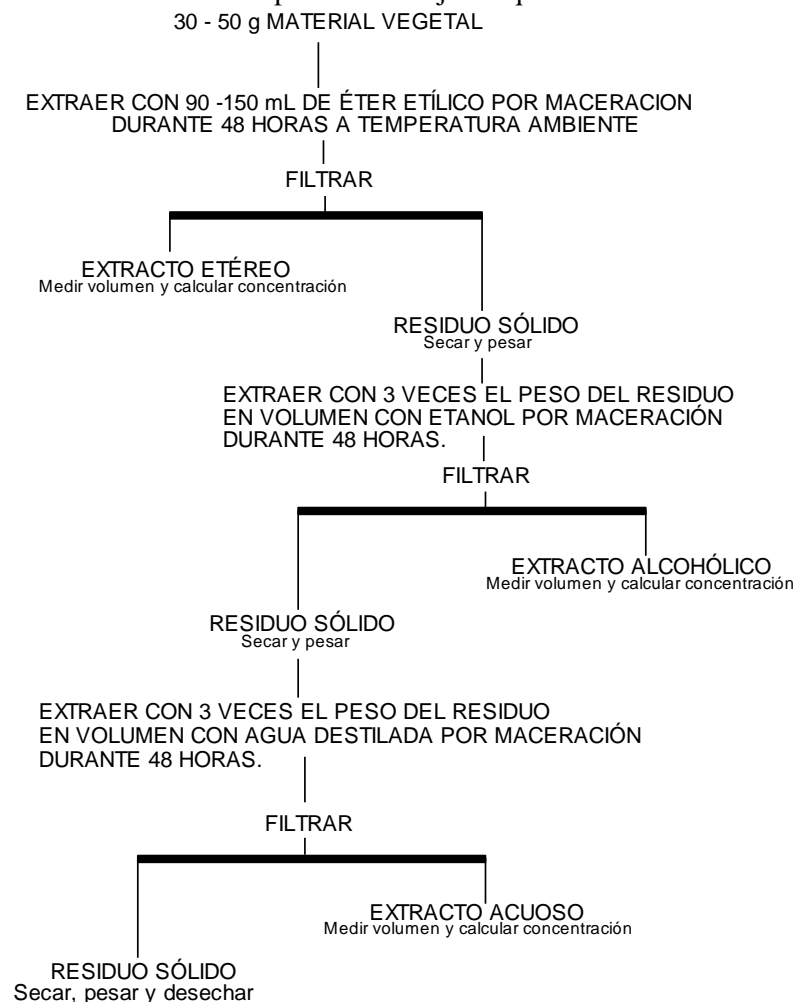


Figura 1-2 Proceso de extracción para tamizaje fitoquímico

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 40a)

Una vez obtenidos todos los extractos, se procedió a realizar la identificación de metabolitos secundarios, basándose en los esquemas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas. (Rodríguez & Moran, 2008b, pp. 19-23)

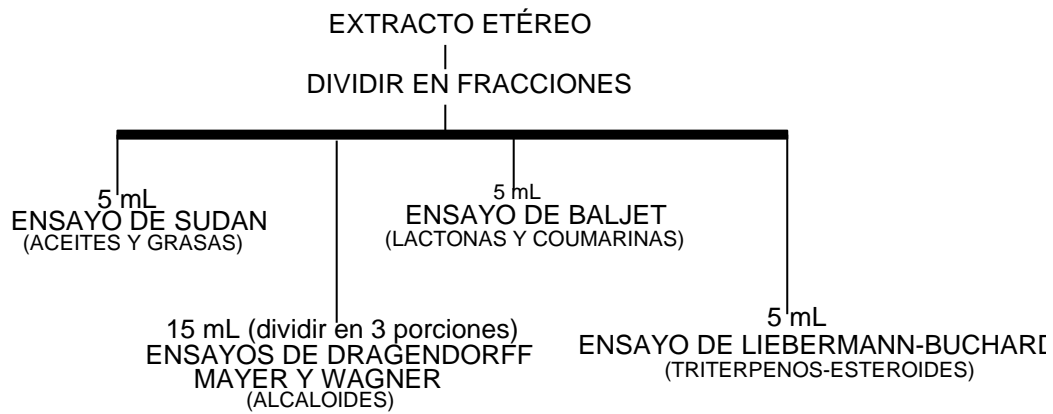


Figura 2- 2 Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 40b)

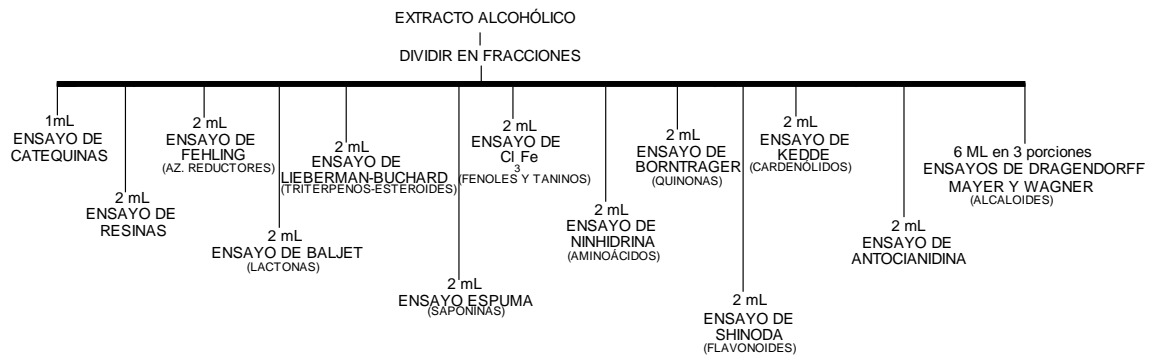


Figura 3-2 Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 40c)

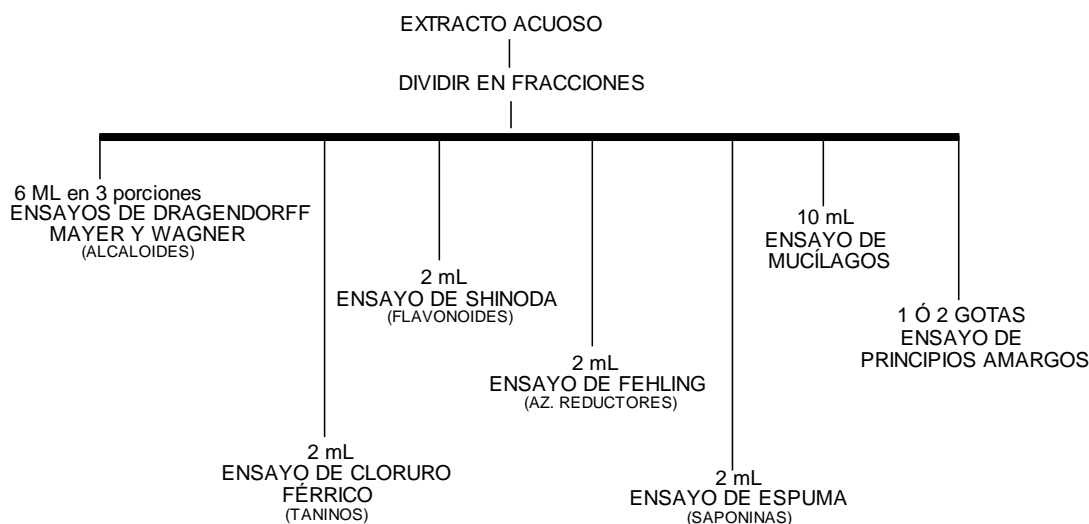


Figura 4-2 Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 41d)

2.5.2.1. *Ensayo de Sudán*

El ensayo de Sudán revela la presencia de compuestos grasos.

Procedimiento:

Se tomaron 5 mL del extracto al que le añadimos 1 mL de colorante de Sudán III o Sudán IV y se calentó en un baño de agua hasta que se volatilizó el solvente.

Resultado positivo:

Se considera positivo cuando se observa la presencia de gotas o una fina laminilla coloreada de color rojo en el líquido o a su vez en las paredes del tubo de ensayo.

2.5.2.2. *Ensayo de Dragendorff*

Es un ensayo que permite la detección de alcaloides.

Procedimiento:

Se tomó una alícuota del extracto y se lo evaporó hasta eliminar todo el solvente, a ese residuo se le añade 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si es el extracto acuoso, se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado y se adicionó 3 gotas de reactivo de Dragendorff.

Resultado positivo:

Se considera positivo a tres niveles, (+) cuando hay opalescencia, (++) turbidez definida y (+++) si presenta precipitado.

2.5.2.3. Ensayo de Mayer

Es un segundo método para detectar alcaloides.

Procedimiento:

Se procedió de la misma manera que en el ensayo de Dragendorff, pero a lo que obtuvimos la solución ácida, se añadió una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y filtró, y finalmente se agregó 3 gotas de reactivo de Mayer.

Resultado positivo:

Se considera positivo a tres niveles, (+) cuando hay opalescencia, (++) turbidez definida y (+++) si presenta precipitado.

2.5.2.4. Ensayo de Wagner

Es un tercer método de detección de alcaloides.

Procedimiento:

Se tomó una alícuota del extracto y se lo evaporó hasta eliminar todo el solvente, a ese residuo se le añadió 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si es el extracto acuoso, se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado y se adicionó 3 gotas de reactivo de Wagner.

Resultado positivo:

Se considera positivo a tres niveles, (+) cuando hay opalescencia, (++) turbidez definida y (+++) si presenta precipitado.

2.5.2.5. *Ensayo de Baljet*

Detecta la presencia de compuestos que posean grupos lactónicos, como las cumarinas.

Procedimiento:

Se tomó una alícuota del extracto y se lo evaporó hasta eliminar todo el solvente, a ese residuo se le añadió 1 mL de alcohol etílico y se homogenizó y se adicionó 1 mL de reactivo de Baljet.

Resultado positivo:

Se considera positivo, (++) cuando se produce una coloración rojiza y (+++) cuando hay presencia de un precipitado rojo.

2.5.2.6. *Ensayo de Libermann-Burchard*

Nos permite detectar la presencia de compuestos triterpénicos y o esteroidales.

Procedimiento:

Se tomó una alícuota del extracto y se lo evaporó hasta eliminar todo el solvente, a ese residuo se le añadió 1 mL de cloroformo, posteriormente se añadió 1 mL de anhídrido acético, se mezcló y se dejó resbalar por las paredes del tubo de ensayo 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

Resultado positivo:

Se considera positivo al existir un brusco cambio de coloración:

- Rosado - Azul (muy rápido).
- Verde intenso - visible (aunque rápido).
- Verde oscuro – negro - final de la reacción

2.5.2.7. *Ensayo de resinas*

Como su nombre lo indica, permite detectar resinas.

Procedimiento:

Se tomó una alícuota del extracto etanólico, al que se añadió 10 mL de agua destilada y se dejó reposar.

Resultado positivo:

Se considera positivo al observarse la aparición de un precipitado.

2.5.2.8. Ensayo de la espuma

Detecta la presencia de saponinas esteroidales y triterpénicas.

Procedimiento:

Se tomó 2 mL de extracto etanólico, diluyéndolo en 5 veces su volumen de agua, se mezcló y agitó por 10 minutos.

Resultado positivo:

Se considera positivo si se observa la presencia de espuma de más de 2 mm de altura en la superficie del líquido y persiste por un tiempo.

2.5.2.9. Ensayo de Cloruro Férrico

Permite reconocer la existencia de compuestos fenólicos y taninos en el extracto alcohólico y más aún en el acuoso.

Procedimiento:

Se tomó una alícuota del extracto al que se añadió acetato de sodio para neutralizarlo, de allí se añadió 3 gotas de cloruro férrico al 5% en solución salina.

Resultado positivo:

Se considera positivo al presenciar un cambio de coloración:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos

2.5.2.10. *Ensayo de Shinoda*

Permite detectar la presencia de flavonoides en el extracto.

Procedimiento:

Se diluyó una alícuota del extracto etanólico y/o acuoso con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y una pequeña tira de magnesio metálico. Se esperó hasta que terminara la reacción de allí se adicionó alcohol amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta la separación de sus fases.

Resultado positivo:

Se considera positivo cuando el alcohol amílico se tiñe de color amarillo, naranja, carmelita o rojo.

2.5.2.11. *Ensayo de Borntrager*

Detecta la presencia de quinonas en los extractos.

Procedimiento:

Se tomó una alícuota del extracto y se lo evaporó hasta eliminar todo el solvente, a ese residuo se le añadió 1 mL de cloroformo, posteriormente se añadió 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua. Se mezcló y dejó reposar hasta que se separaron sus fases.

Resultado positivo:

Se considera positivo cuando la fase superior o acuosa alcalina toma una coloración rosada.

2.5.3. *Obtención del extracto metanólico*

Se realizó el extracto con metanol por su capacidad de extracción de compuestos.

Procedimiento:

Se pesó 20 g de bulbos y hojas secos y triturados, fueron colocadas cada muestra en una botella ámbar de 1 L, luego se colocó 400 mL de metanol concentrado, se sonicó durante 2 horas y se dejó macerando por 72 horas. AL término de la maceración se colocó otros 400 mL de metanol y se sonicó nuevamente por 1 hora más.

Se procedió a filtrar con algodón en un embudo, recogiendo toda la porción líquida en otro recipiente. A esta solución se le concentró usando el rotavapor y finalmente se guardó en un frasco tapa rosca.

2.5.4. Extracción de alcaloides

Los alcaloides son bases solubles en solventes orgánicos y prácticamente insolubles en agua, mientras que sus sales son lo contrario.

Así podemos mencionar que la extracción de alcaloides se podrá realizar después de poner en libertad la base de sus combinaciones por un álcali o haciendo actuar un ácido por sus pasajes sucesivos del alcaloide de la fase acuosa a la orgánica, después de acidificarlo. (Nina 2014)

Procedimiento:

Al tener el extracto metanólico concentrado de hojas y bulbos, se disolvió cada uno en 150 mL de ácido sulfúrico al 2%, obteniendo el extracto ácido.

Se procedió a desengrasar con éter etílico colocando 50 mL de extracto ácido en un embudo de separación juntamente con 50 mL de éter, se mezcló y separó la porción etérea de la fase acuosa ácida. Fue realizado por cuadruplicado cada desengrase.

Se basificó la fase acuosa ácida con hidróxido de amonio al 25% hasta que se alcanzó un pH de 10 y se obtuvo la fase acuosa básica.

Se procedió a realizar lavados con acetato de etilo colocando 50 mL de fase acuosa básica con 20 mL de acetato, repitiendo 4 veces cada 50 mL de muestra. Finalmente se recogió la porción con acetato. Se le colocó sulfato de sodio anhidro y goma arábica y se filtró con algodón.

Finalmente se concentró la solución en el rotavapor y almacenado en un frasco tapa rosca.

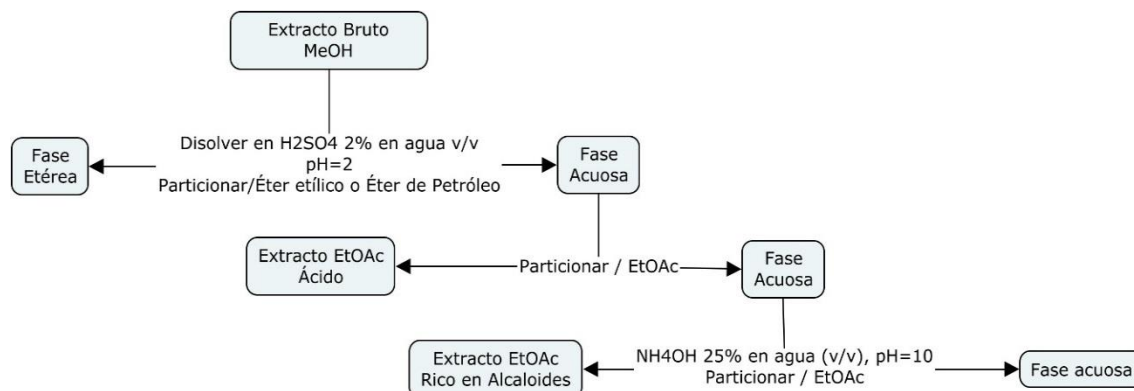


Figura 5-2 Diagrama del procedimiento de extracción de alcaloides.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

2.5.5. *Ensayo antioxidante*

2.5.5.1. *Ensayo de actividad antioxidante*

El método de eliminación de radicales libres α , α -difенил- β -picrilhidrazil (DPPH), ofrece el primer enfoque que permite evaluar la actividad antioxidante los extractos. El ensayo se basa en la medición de la capacidad de eliminación de antioxidantes hacia ella.

El electrón impar de átomo de nitrógeno en DPPH se reduce recibiendo un átomo de hidrógeno de antioxidantes a la hidrazina correspondiente. (Kedare & Singh, 2011a, pp. 451-456)

DPPH se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón de repuesto sobre la molécula en su conjunto (Figura 1), de modo que las moléculas no dimerise, al igual que la mayoría de los otros radicales libres. La deslocalización también da lugar al color violeta intenso, con una absorción en solución de etanol en torno a 520 nm. Al mezclar la solución de DPPH con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, da lugar a la forma reducida con la pérdida de color violeta. Representando el radical DPPH por $Z \cdot$ y la molécula donante por AH, la reacción primaria es: (Kedare & Singh 2011b, pp. 451-456)



Procedimiento:

Se preparó soluciones madre en metanol de cada uno de los extractos a partir de los cuales se obtuvo concentraciones de 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ppm. Luego se preparó soluciones patrón de ácido gálico a concentraciones de 10, 20, 40 60, 80 y 100 ppm.

Se preparó la solución estándar de DPPH, mezclando 5.9 mg de DPPH sólido con 250 mL de metanol. Se tuvo que esperar que esta solución se estabilizara en una absorbancia entre 0.6 – 0.8 en un lapso de 1 hora, realizando para ello varias mediciones en el espectro.

Luego se procedió a realizar las diluciones de cada solución preparada en sus diferentes concentraciones, mezclando 3.9 mL de solución de DPPH + 100 µL de solución muestra o estándar.

Finalmente se dejó reposar por una hora en absoluta oscuridad para medirlos en el espectrofotómetro a 515 nm.

Además, se preparó soluciones de quercetina a concentraciones de 1, 10, 25, 50, 125 y 250 ppm, con el fin de realizar una comparación con las soluciones muestra, siguiéndose el mismo procedimiento.

2.5.6. Ensayo antiinflamatorio y citotóxico

El ensayo antiinflamatorio y citotóxico in vitro se realizó a los cuatro extractos obtenidos 2 extractos brutos y 2 extractos alcaloidales.

2.5.6.1. Aislamiento de neutrófilos

Procedimiento:

Se extrajo 20 mL de sangre venosa de un paciente sano en un tubo de ensayo al que previamente se colocó 2 mL de heparina sódica al 5%. Se colocó MHS en relación 1:1 con la cantidad de sangre y se homogenizó.

Se colocó sangre suavemente sobre ficoll paque previamente adicionado en el tubo en relación 4:3 en 8 tubos de ensayo.

Se dejó reposar durante 5 minutos y se centrifugaron a 1500 RPM durante 30 minutos.

Se separó al paquete de neutrófilos en otro tubo de ensayo, al que se colocó MHS en relación 1:3 y se sometió a centrifugación durante 30 minutos a 1500 RPM, se desechó el sobrenadante, se guardó el suero sobrante y se lisó las células rojas restantes con una solución de cloruro de amonio al 0.83%. Se centrifugó nuevamente el tubo de ensayo por 20 minutos y al finalizar se eliminó el sobrenadante.

Finalmente, los neutrófilos fueron resuspendidos con cantidad suficiente de MHS para obtener una concentración de 10^7 células/mL y almacenados a 37 °C.

2.5.6.2. *Ensayo antiinflamatoria in vitro*

La evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos estudiados en la presente investigación, se realizó en base al protocolo definido por Tan y Berridge.

Se preparó soluciones madre de cada uno de los extractos a partir de los cuales se obtuvo concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm, todos ellos fueron disueltos en solución de DMSO al 5%.

Posteriormente fue necesario la preparación de los controles:

- Control Positivo: Solución de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS
- Control negativo: Solución de Tritón X-100 0.1% en MHS
- Control positivo comparativo: Ácido acetilsalicílico a 200 ppm (mg/L) en DMSO 5%

Fue necesario la utilización de Micropocillos para esta determinación en la cual se colocaban los diferentes controles y muestras en el siguiente orden.

Tabla 4-2 Esquema para la realización del ensayo antiinflamatorio in-vitro

Tratamiento	Compuesto de prueba / controles, μL	Suspensión de células, μL	WST-1, μL
Control DMSO 5%	100	140	10
Control Tritón X – 100 0.1%	100	140	10
Control aspirina 200 ppm	100	140	10
200 ppm	100	140	10
100 ppm	100	140	10
50 ppm	100	140	10
25 ppm	100	140	10
12.5 ppm	100	140	10

Fuente: Tan y Berridge, 2000, pp. 59-68

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Se dejó incubar los Micropocillos en una estufa durante 1 hora a 37 °C, a los cuales se les añadió 50 μL de Zymosan A opsonizado.

La opsonización del Zymosan se realizó colocando 1.5 mL de suero sobre 3.8 mg de Zymosan en

polvo, luego se centrifugó a 3000 RPM durante 5 minutos y resuspendido en MHS. Luego de colocado el Zymosan, se dejó incubar los micropocillos por 1 hora a 37 °C. Al término de éste, se midieron las absorbancias en un lector de placas.

Cálculo del porcentaje de inhibición inflamatoria

$$\% \text{ inhibición inflamatoria} = 100 - \left(\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del DMSO 5\%}} \right) \times 100$$

2.5.6.3. Ensayo de citotoxicidad in vitro

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos estudiados en la presente investigación, se realizó en base al protocolo definido por Berridge et al.

Se prepararon soluciones madre de cada uno de los extractos a partir de los cuales se obtuvo concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm, todos ellos fueron disueltos en solución de DMSO al 5%. Posteriormente fue necesario la preparación de los controles:

- Control Positivo: Solución de Dimetilsulfóxido al 5% en MHS
- Control negativo: Solución de Tritón X-100 0.1% en MHS

Fue necesario la utilización de Micropocillos para esta determinación en la cual se colocaban los diferentes controles y muestras en el siguiente orden.

Tabla 5-2 Esquema para la realización de la actividad citotóxica in-vitro

Tratamiento	Compuesto de prueba / controles, μL	Suspensión de células, μL	WST-1, μL
Control DMSO 5%	100	140	10
Control Tritón X – 100 0.1%	100	140	10
200 ppm	100	140	10
100 ppm	100	140	10
50 ppm	100	140	10
25 ppm	100	140	10
12.5 ppm	100	140	10

Fuente: Berridge et al. 1996: pp 4-9

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Se dejó incubar los micropocillos en una estufa durante 3 horas a 37 °C. Al término de éste, se

midieron las absorbancias en un lector de microplacas.

Cálculo del porcentaje de Viabilidad Celular

$$\% \text{ viabilidad celular} = \left(\frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del DMSO 5\%}} \right) \times 100$$

CAPÍTULO III

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

3.1. Parámetros de control de calidad de hojas.

Tabla 1-3 Resultados del control de calidad de las hojas de *Crinum x amabile*

Parámetros	Resultado	Referencia Farmacopea Española
Cenizas totales %	4.81 ± 0.0351	Máx 5%
Cenizas solubles en agua %	2.02 ± 0.0361	Máx 2%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico %	1.01 ± 0.0100	Máx 1%
Contenido de humedad %	19.31 ± 0.0321	Máx 14%

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Los resultados obtenidos en la presente tabla, indican que los valores conseguidos de cenizas totales, cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico de las hojas de *Crinum x amabile*, se encuentra dentro de los valores aceptables con respecto a la normativa de la (Real Farmacopea Española, 2002), lo que indica que las hojas fueron recolectadas, secadas y almacenadas de forma adecuada. Las cenizas totales representan el contenido de sales como fosfatos, carbonatos, nitritos, etc. Las cenizas solubles en agua pueden determinar el contenido de metales pesados y las insolubles en ácido clorhídrico pueden representar a silicatos provenientes de arena y tierra silíceas. (World Health Organization, 1998, pp. 29)

La cantidad de humedad obtenida fue de 19.31%, valor que excede al expuesto en la Real Farmacopea Española, lo cual puede deberse a la gran cantidad de mucílago que las hojas presentan, debido a que la función del mucílago es almacenar el agua en grandes cantidades, como una fuente de reserva para la planta, y en las semillas en estado de germinación, etc. (Cabrera et al. 2013, 567 - 574)

No existen datos obtenidos sobre estudios realizados en *Crinum x amabile* sobre parámetros de calidad con los que se pueda comparar.

3.2. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de bulbos y hojas de *Crinum x amabile* se realizó en base a las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006, pp. 38-64), con los siguientes resultados:

3.2.1. Tamizaje fitoquímico de hojas de *Crinum x amabile*

Tabla 2-3 Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Crinum x amabile*.

Determinación de metabolitos	Indicadores	Tipo de extracto		
		ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
SUDAN (Aceites - grasas)	Coloración roja (+)	(+)		
BALJET (Lactonas - cumarinas)	Rojo (++) Precipitado rojo (+++)	(++)	(++)	
DRAGENDORFF (Alcaloides)	Opalescencia (+) Turbidez definida (++)	(+)	(+)	(+++)
WAGNER (Alcaloides)	Precipitado (+++)	(++)	(++)	(+)
MAYER (Alcaloides)		(++)	(++)	(+)
LIEBERMANN BURCHARD (Triterpenos- esteroides)	Rosado-azul Verde intenso Verde oscuro negro (+)	(+++)	(+++)	
CATEQUINAS	Mancha verde carmelita (+)		(++++)	
RESINAS	Precipitado (+)		(-)	
FEHLING (Azúcares reductores)	Rojo Precipitado rojo (+)		(+)	(+)
CLORURO FÉRRICO (Fenoles -taninos)	Rojo vino Verde intenso Azul (+)		(+)	(+)
ESPUMA (Saponinas)	Presencia de espuma por más de 2 minutos.		(-)	(-)
NINHIDRINA (Aminoácidos libres o aminas)	Azul violáceo (+)		(-)	
BORNTRAGER (Quinonas)	Rosado (++) Rojo (+++)		(++)	
SHINODA (Flavonoides)	Amarillo - Naranja Carmelita o Rojo (+)		(+)	(+)
ANTOCIANIDINAS (Secuencias de grupos de flavonoides)	Rojo (++) Marrón (+++)		(-)	
MUCÍLAGOS	Consistencia gelatinosa (+)			(+++)
PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES				(+)

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

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

3.2.2. Tamizaje fitoquímico de bulbos de *Crinum x amabile*

Tabla 3- 3 Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico del bulbo de *Crinum x amabile*.

Determinación de metabolitos	Indicadores	Tipo de extracto		
		ETÉREO	ALCOHÓLICO	ACUOSO
SUDAN (Aceites - grasas)	Coloración roja (+)	(+)		
BALJET (Lactonas - cumarinas)	Rojo (++) Precipitado rojo (+++)	(-)	(-)	
DRAGENDORFF (Alcaloides)	Opalescencia (+) Turbidez	(-)	(+++)	(++)
WAGNER (Alcaloides)	definida (++) Precipitado (+++)	(-)	(++)	(++)
MAYER (Alcaloides)		(-)	(+++)	(-)
LIEBERMANN BURCHARD (Triterpenos- esteroides)	Rosado-azul Verde intenso Verde oscuro negro (+)	(-)	(-)	
CATEQUINAS	Mancha verde carmelita (+)		(-)	
RESINAS	Precipitado (+)		(-)	
FEHLING (Azucars reductores)	Rojo Precipitado rojo (+)		(+)	(+)
CLORURO FÉRRICO (Fenoles -taninos)	Rojo vino Verde intenso Azul (+)		(-)	(-)
ESPUMA (Saponinas)	Presencia de espuma por más de 2 minutos.		(+)	(-)
NINHIDRINA (Aminoácidos libres o aminas)	Azul violáceo (+)		(NA)	
BORNTRAGER (Quinonas)	Rosado (++) Rojo (+++)		(-)	
SHINODA (Flavonoides)	Amarillo - Naranja Carmelita o Rojo (+)		(+)	(-)
ANTOCIANIDINAS (Secuencias de grupos de flavonoides)	Rojo (++) Marrón (+++)		(+)	
MUCÍLAGOS	Consistencia gelatinosa (+)			(-)
PRINCIPIOS AMARGOS Y ASTRINGENTES				(-)

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

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

En el ensayo de Sudán la coloración roja evidenciada en los extractos etéreos de bulbos y hojas de *Crinum x amabile* se interpreta como resultado positivo. No se encontró investigaciones anteriores que informen de la presencia de aceites y grasas en esta planta.

Los ensayos de Dragendorff, Mayer y Wagner en los tres extractos fueron positivos. En cuanto a las hojas se evidenció una mayor cantidad de alcaloides mediante los ensayos de Mayer y Wagner, sin embargo, el resultado más evidente provino del ensayo de Dragendorff en el extracto acuoso. Se ha reportado la presencia de alcaloides en *C. asiaticum* una especie del género *Crinum* de la cual es híbrido *Crinum x amabile* (Asmawi et al, 2011a, pp. 1-5). En cuanto al bulbo, podemos

mencionar que los alcaloides son los metabolitos que en mayor abundancia se encuentran y son el grupo más representativo que posee esta planta, además de ser los responsables de los efectos terapéuticos que esta tiene. Se ha descubierto que existe una gran variedad de alcaloides que componen al bulbo entre ellos los más representativos están la licorina, bufanisina, augustina, ambelina, flexinina, crinamabina (Pham et al, 1998d, pp. 371-376), amabilosida (Cordell, 1993b, pp. 4-7) y otros en cantidades inferiores como galantamina, narvedina, galantina, hipeastrina, crinidina, crinamina (Kittisak et al. 1993, pp.1331-1338). Un estudio anterior demostró que el tipo y proporción de alcaloides puede diferir entre las especies del género *Crinum*, de allí la diferencia en la actividad biológica que éstos poseen (Refaat et al. 2013, pp.1239-1252).

El ensayo de Baljet nos da evidencia del contenido de estructuras con un grupo funcional lactona. En las hojas se obtuvo una apreciable evidencia de lactonas en ambos extractos, sin embargo, no se describe su presencia en estudios previos. En el bulbo no se obtuvo evidencia alguna de lactonas. Se ha descrito resultados similares sobre *Crinum macowanii* (Uche-Okerefor;Nkemdinma et al, 2016a, pp. 4172) y *Crinum giganteum* (Elizabeth et al. 2016a, pp.22-25) en los cuales existe ausencia de lactonas en el tamizaje de sus bulbos, sin embargo no se encontró datos sobre el ensayo de Baljet para lactonas en *Crinum x amabile*.

La prueba de Libermann Burchard da evidencia de triterpenos y esteroides. Se demostró una elevada presencia en las hojas, contrario con el bulbo en el cual no se encontró presencia alguna de estos. Se ha demostrado la ausencia de triterpenos en las hojas de *Crinum giganteum* (Elizabeth et al, 2016b, pp. 22-25) y *Crinum asiaticum* (Chen et al, 2011, pp. 411-419). Estudios anteriores describen la presencia de esteroides en el bulbo de *Crinum macowanii* (Uche-Okerefor;Nkemdinma et al, 2016b, pp. 4172). Sin embargo, no se encontró datos anteriores sobre la evidencia de triterpenos y esteroides en *Crinum x amabile*.

El ensayo de catequinas da evidencia de un subgrupo de flavonoides, los flavan-3-oles (Kricun 2011a, pp. 249-255). Se determinó una muy elevada evidencia de catequinas contenidos en las hojas, mientras que no se halló evidencia en el bulbo.

El ensayo de Fehling confirmó la presencia de azúcares reductores, en hojas y bulbos. Son polisacáridos propios de las plantas (Ávila et al, 2012, 129-135); se ha reportado la presencia de Amabilosido, un glucósido presente en el bulbo de *Crinum x amabile* (Cordell, 1993c, pp. 4-7), así mismo se ha descrito la presencia en bulbos de *Crinum macowanii* mediante screening fitoquímico (Uche-Okerefor, et al. 2016, pp. 4182). En otras especies como *C. giganteum* (Elizabeth et al, 2016c, pp. 22-25) y *C. asiaticum* (Asmawi et al. 2011b, pp. 1-5), se ha descrito la presencia de glicósidos contenidos en las hojas.

El ensayo de cloruro férrico demostró la presencia de fenoles y taninos. Se evidenció su presencia en hojas, pero se halló que está ausente en el bulbo. En investigaciones anteriores se describe la presencia de taninos en el bulbo de *C. macowanii* (Uche-Okerefor;Nkemdinma et al. 2016c, pp. 4172), compuestos fenólicos como ácido trans-cafeico, ácido-4-caumático, ácido 4-hidroxibenzónico, etil-4-hidroxibenzoato, 2-(3,4-dihydroxyfenil)1,3-benzodioxole-5-carboxaldehído (Sun et al, 2009a, pp. 447-449) 1-(2-hydroxy-4-hydroxymetil)fenil-6-O-caffeoil-b-D-gluco-piranosido (Sun et al, 2008, pp. 432-437) encontrados en el bulbo de *C. asiaticum* y una cantidad mínima de compuestos fenólicos descubiertos en el bulbo de *C. bulbispermum* (Ramadan et al, 2000, pp. 981-986). Estudios realizados en hojas de *C. asiaticum* (Asmawi et al, 2011c, pp. 1-5) y *C. giganteum* (Elizabeth et al, 2016d, pp. 22-25) demostraron que no hay evidencia del contenido de fenoles en las hojas de estas, sin embargo hay que considerar que a pesar de no coincidir con los resultados que se obtuvieron, es necesario realizar nuevas investigaciones para poder confirmarlos.

El ensayo de espuma permitió la determinación de saponinas en el extracto etanólico del bulbo, que son glucósidos hidrosolubles propias de las plantas (Mena et al, 2015a, pp. 106-116). En contraste con datos de investigaciones previas sobre otras especies, datan la presencia de saponinas en hojas de *C. giganteum* (Elizabeth et al, 2016e, pp.22-25); y bulbos de *C. macowanii* (Uche-Okerefor;Nkemdinma et al, 2016d, pp. 4172).

El reactivo de Borntrager permitió evidenciar quinonas en extracto alcohólico de las hojas y la ausencia en el bulbo. No se hallaron datos anteriores de su evidencia en *Crinum x amabile* y otras especies de *Crinum*.

El resultado positivo para la prueba de Shinoda indica la presencia de flavonoides, resultado que coincide con la información bibliográfica disponible para otra especie. *C. asiaticum*, donde se especifican flavonoides como (2S)-3',7-dihydroxy-4'-methoxyflavan, 7-hydroxyflavanone, 4',7-dihydroxyflavone (Sun et al, 2009b, pp. 447-449) *C. giganteum* (Elizabeth al, 2016e, pp. 22-25) y *C. macowanii* (Uche-Okerefor;Nkemdinma et al, 2016e, pp. 4172), en los cuales se describe la presencia de flavonoides.

Se encontró además antocianidinas, mucílagos y principios amargos, el primero en hojas y bulbo y los demás solo en hojas. No se hallaron datos anteriores de su evidencia en *Crinum x amabile* y otras especies de *Crinum*.

3.3. Ensayo antioxidante

La capacidad antioxidante de *Crinum x amabile* fue evaluada mediante el método de barrido de radicales libres DPPH*. Fue necesario un tiempo de espera de 60 minutos para que la medición de la absorbancia sea estable.

En este estudio el efecto del estudio de barrido de radicales libres de los cuatro extractos de se compararon con el ácido gálico como estándar.

Se utilizó el software B-LeSq, para medir el valor de IC50.

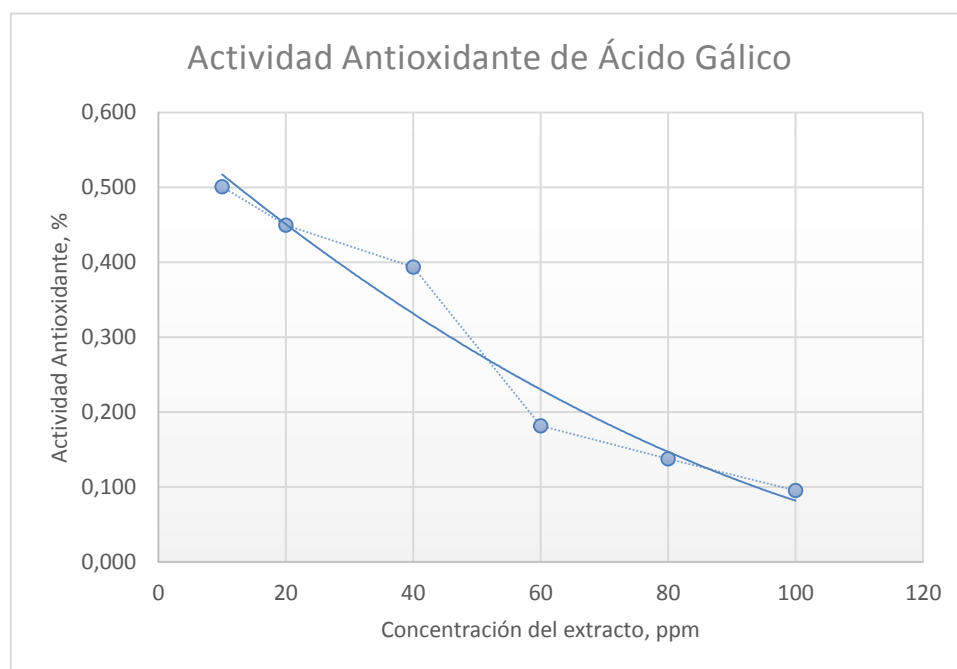
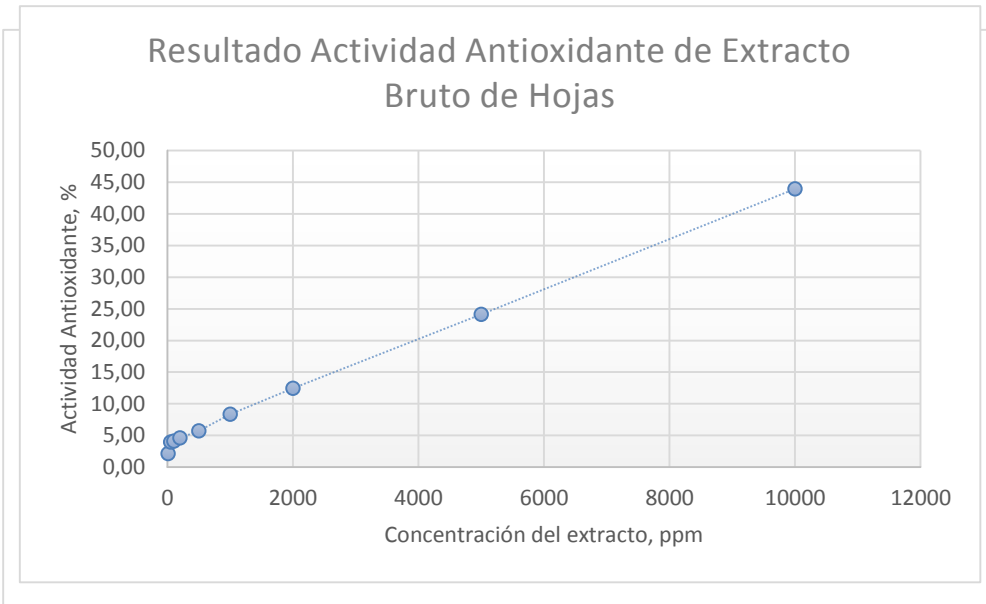


Figura 1-3 Curva de actividad antioxidante de Ácido Gálico.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Actividad Antioxidante				
CONCENTRACIÓN (ppm)	Tipo de extracto			
	E.B.B	E.B.H	E.A.B	E.A.H
10	3,44	2,13	3,61	3,77
50	3,44	3,93	3,61	3,77
100	3,77	4,10	4,10	4,43
200	4,10	4,59	5,25	4,75
500	4,59	5,74	6,89	8,52
1000	5,90	8,36	15,74	12,62
2000	8,03	12,46	26,07	21,97
5000	12,62	24,10	50,33	47,87
10000	15,90	43,93	81,48	79,34

Tabla 4-3 Porcentaje de actividad inhibitoria de radicales libres.



Realizado por: Santiago Portero

Figura 2-3 Curva del porcentaje de actividad antioxidante del extracto bruto de bulbo.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

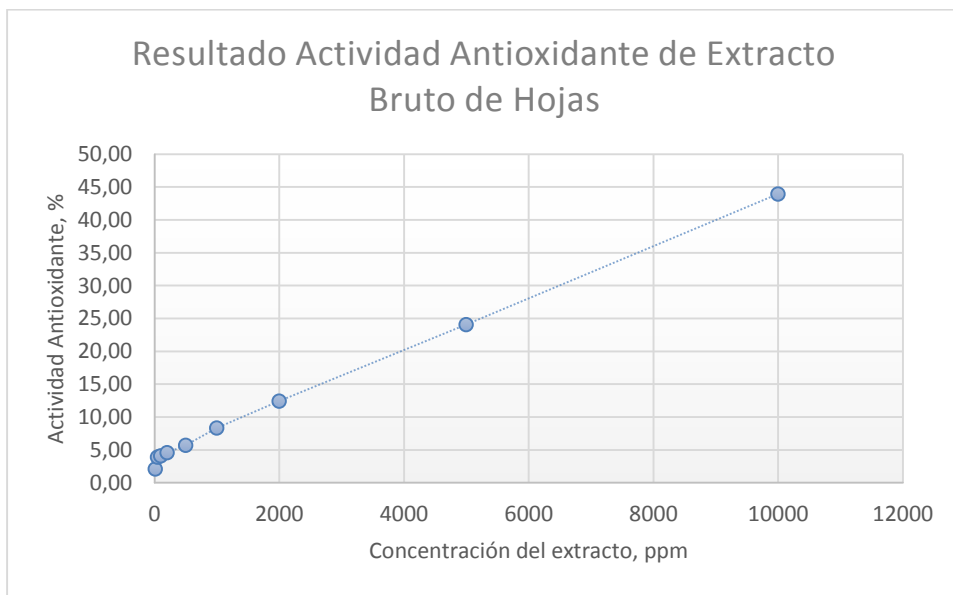


Figura 3- 3 Curva del porcentaje de actividad antioxidante del extracto bruto de hojas.

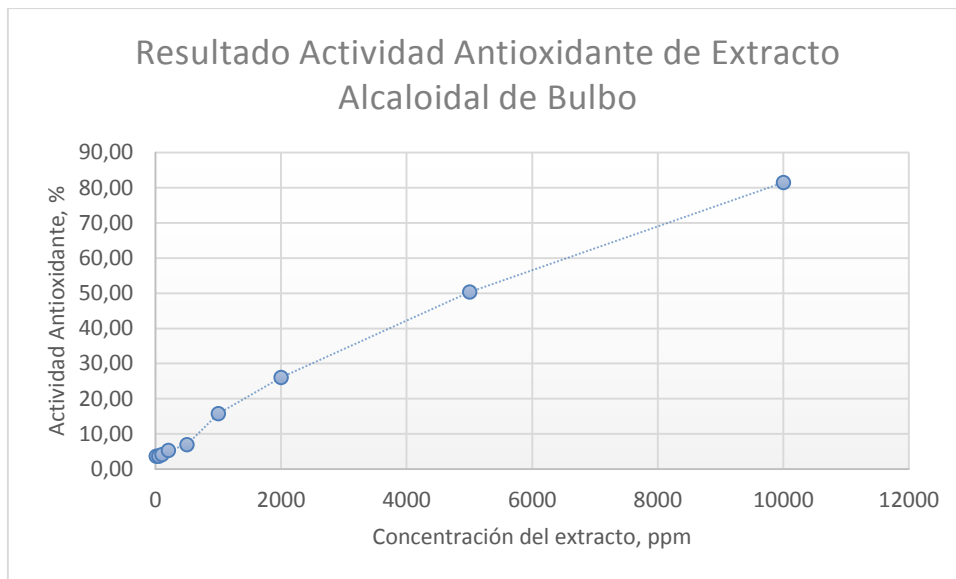


Figura 4-3 Curva del porcentaje de actividad antioxidante del extracto alcaloidal de bulbo.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

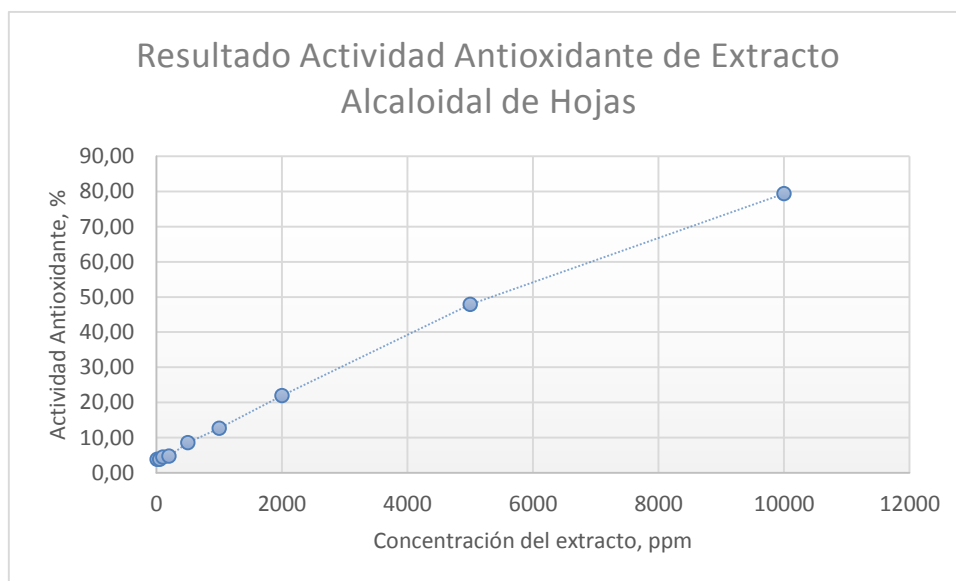


Figura 5-3 Curva del porcentaje de actividad antioxidante del extracto alcaloidal de hojas.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Entre nueve mediciones diferentes utilizadas (10 a 10000 ppm) (ANEXO J), se obtuvieron los siguientes IC 50: 5.04×10^7 ppm (E.B.B.), 112080.7 ppm (E.B.H.), 6818.24 ppm (E.A.B.), 8344.1 ppm (E.A.H.), que al compararlos con el ácido gálico con un IC 50 de 36.8, indica que todos los extractos obtenidos de *Crinum x amabile* poseen capacidad de neutralizar radicales libres, sin embargo lo realiza a concentraciones muy elevadas. Existe una marcada diferencia en la comparación entre el estándar y los diferentes extractos.

3.4. Ensayo antiinflamatorio *in vitro*

El ensayo antiinflamatorio se llevó a cabo mediante el método colorimétrico modificado (Tan & Berridge 2000b, pp. 59-68), en el cual se mide la reducción de sales de tetrazolio (WST-1 [2- (4-Yodofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disulfofenil) -2H- Tetrazolio]) a compuestos de formazán coloreados por succinato-tetrazolim reductasa, en presencia de neutrófilos aislados activados.

La inhibición de (ROS) % hace referencia a las especies reactivas de oxígeno captadas por los extractos.

Después de realizado las mediciones espectrofotométricas se obtuvo los siguientes resultados detallados en las siguientes tablas.

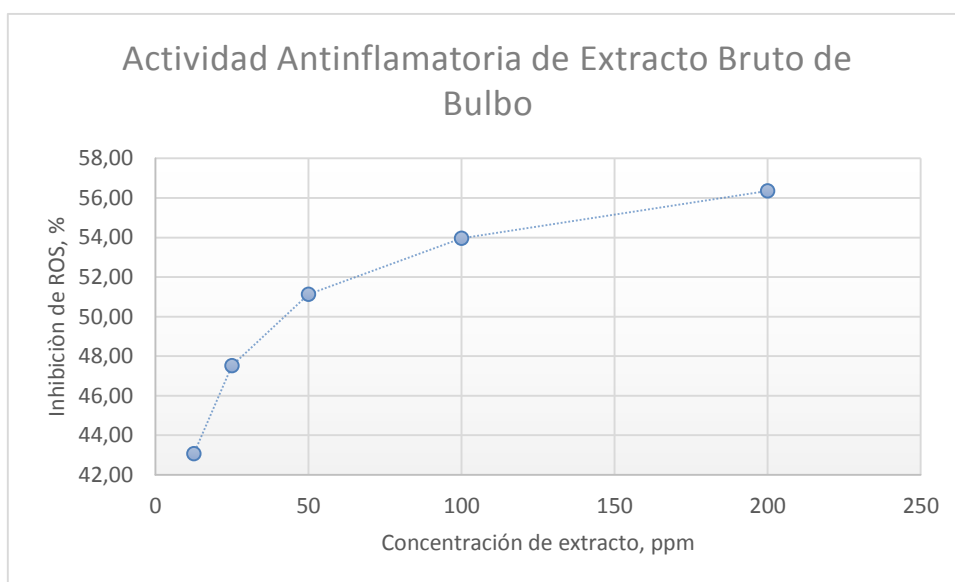


Figura 6-3 Curva del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto bruto de bulbo.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Tabla 5-3 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vitro*, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto bruto del bulbo.

Concentraciones	% medio de Inhibición inflamatoria
AAS 200ppm	70.28 ± 0.24
200 ppm	56.35 ± 0.24
100 ppm	53.97 ± 0.19
50 ppm	51.13 ± 0.15
25 ppm	47.52 ± 0.19
12.5 ppm	43.07 ± 0.15

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

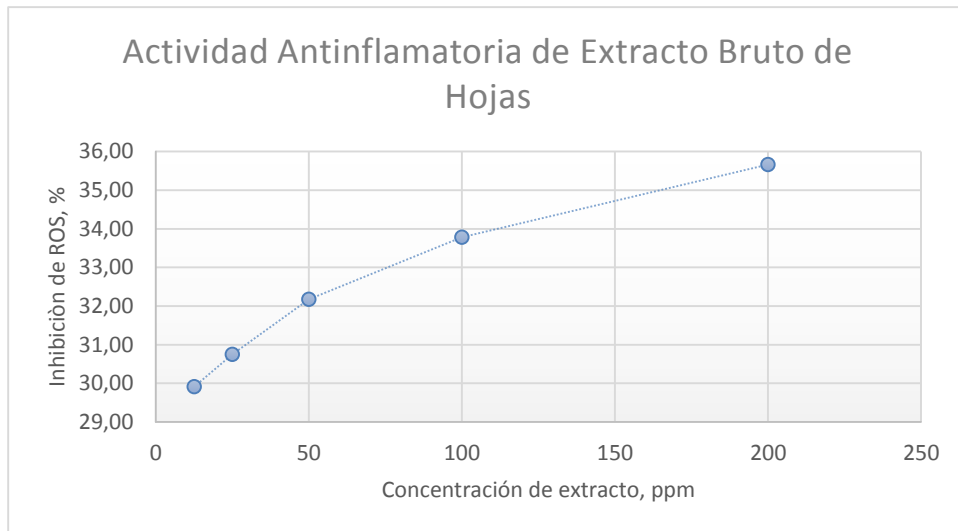


Figura 7-3 Curva del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto bruto de hojas.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Tabla 6-3 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria in vitro, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto bruto de hojas.

Concentraciones	% medio de Inhibición inflamatoria
AAS 200ppm	69.83 ± 0.24
200 ppm	35.66 ± 1.16
100 ppm	33.79 ± 0.24
50 ppm	32.17 ± 0.29
25 ppm	30.75 ± 0.15
12.5 ppm	29.91 ± 0.19

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

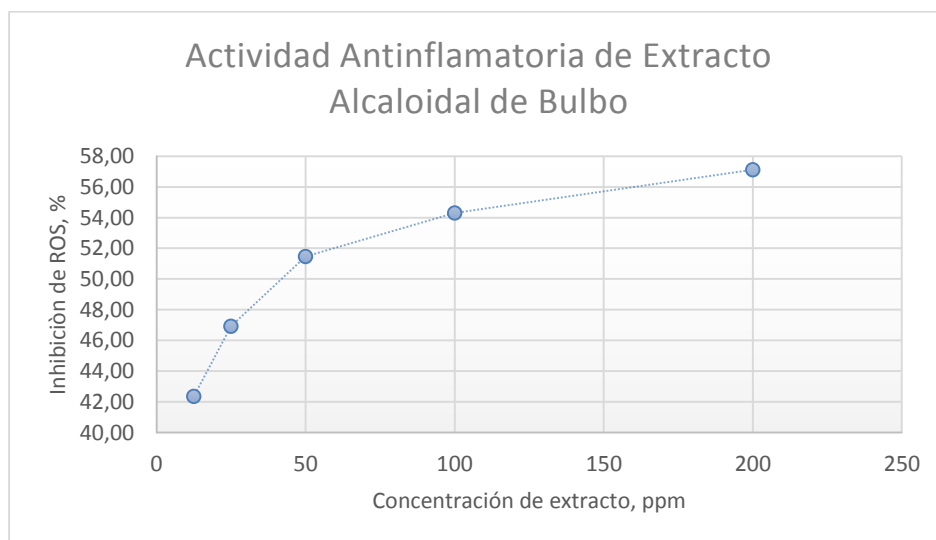


Figura 8-3 Curva del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto alcaloidal de bulbo.

Realizado por: Santiago Portero, 2017

Tabla 7-3 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria in vitro, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto alcaloidal del bulbo.

Concentraciones	% medio de Inhibición inflamatoria
AAS 200ppm	69.70 ± 0.14
200 ppm	57.12 ± 0.14
100 ppm	54.30 ± 0.14
50 ppm	51.48 ± 0.24
25 ppm	46.92 ± 0.34
12.5 ppm	42.36 ± 0.10

Realizado por: Santiago Portero, 2017

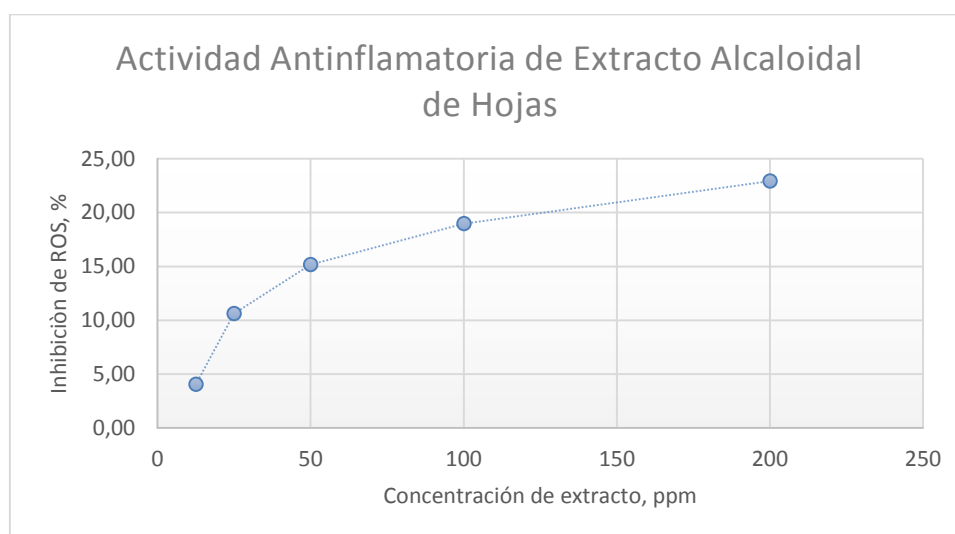


Figura 9-3 Curva del porcentaje de inhibición inflamatoria del extracto alcaloidal de hojas.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Tabla 8-3 Resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria in vitro, expresada en porcentaje de inhibición antiinflamatoria para diferentes concentraciones del extracto alcaloidal de hojas.

Concentraciones	% medio de Inhibición inflamatoria
AAS 200ppm	69.38 ± 0.24
200 ppm	22.93 ± 5.57
100 ppm	18.96 ± 0.24
50 ppm	15.18 ± 0.34
25 ppm	10.62 ± 0.15
12.5 ppm	4.04 ± 0.78

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Los resultados obtenidos, se analizaron estadísticamente utilizando un diseño factorial, para poder determinar si existen diferencias significativas entre la inhibición inflamatoria con respecto a la parte de la planta, tipo de extracto y concentración utilizada.

Después de realizado el análisis univariado, mediante el gráfico de pruebas de efectos intersujetos se determinó que existen diferencias significativas en los resultados de la inhibición inflamatoria al aplicar diferentes partes de la planta con diferentes tipos de extracto a diferentes concentraciones, por lo que se obtuvo un valor de $p=0$ en todos los casos, se rechaza la hipótesis nula (H_0 : No existen diferencias en el porcentaje de inhibición inflamatoria por efecto de la aplicación de concentración, tipo de extracto, parte de la planta y sus interacciones. $p>0=0.05$).

La prueba de Tukey, determinó que todas las concentraciones utilizadas son diferentes, es decir que el porcentaje de inhibición inflamatoria difiere de acuerdo a la concentración que se utilice, teniendo resultados diferentes con cada concentración. La prueba de Tukey no se pudo analizar para los factores: parte de la planta y tipo de extracto, ya que hay menos de tres grupos en cada uno de ellos.

Los resultados obtenidos en el primer gráfico de perfil, demuestran que los extractos tanto brutos como alcaloidales del bulbo poseen mejor actividad inhibiendo la inflamación frente al de las hojas; de igual forma nos indica que la concentración a 200 ppm es la que mayor actividad antiinflamatoria presenta tanto en el extracto bruto como alcaloidal.

Así mismo, en el siguiente gráfico de perfil, se indica que los extractos brutos son superiores a los alcaloidales en cuanto a inhibición inflamatoria y que la concentración a 200 ppm es la que mayor actividad antiinflamatoria presenta tanto en el bulbo como en las hojas.

Estudios de actividad antiinflamatoria con otras plantas del género *Crinum* datan el potencial antiinflamatorio que poseen. Extracto alcohólico de hojas y bulbo de *Crinum asiaticum* (Rahman et al, 2013b, pp. 212-218)(Rahman et al, 2011, pp. 34-37), extracto acuoso del bulbo de *Crinum glaucum* (Okpo et al, 2001, pp. 207-211), extracto acuoso del bulbo de *Crinum giganteum* (Kapu et al, 2001, pp. 7-13), son algunas de las investigaciones que datan de la potencial actividad antiinflamatoria que posee este género de plantas.

La actividad antiinflamatoria de los alcaloides presentes en el bulbo de *Crinum x amabile* ha sido demostrada en otras investigaciones en las cuales se describen a la licorina con una potencial actividad antiinflamatoria, en algunos casos, mayor que el ácido acetil salicílico en estudio en ratas (Saltan Çitoğlu et al, 2012, pp. 81-87). En otro estudio al analizar la actividad antiinflamatoria en ratas la licorina no presenta un gran potencial antiinflamatorio (Çitoğlu et al, 1998a, pp. 205-206).

Entre 5 mediciones del IC50 (ANEXO K) cabe destacar que los valores obtenidos del bulbo 46.28 ppm (E.B.B.), 48.59 ppm (E.A.B.), fueron superiores con respecto a las hojas con valores de 86297.1 ppm (E.B.H.), 1319.6 ppm (E.A.H.).

Hay que considerar la posibilidad de sinergismos con otros compuestos, ya que la actividad antiinflamatoria no es exclusiva de los alcaloides, sino también de otras moléculas como lactonas (Ruiz-reyes & Suarez, 2015, pp. 9-24), saponinas (Mena et al, 2015b, pp. 106-116), catequinas (Kricun, 2011b, pp. 249-255), antocianidinas (Ortíz et al, 2011, pp. 16-22), flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos (Mohammed et al, 2014a, pp. 275-285). Considerando que en el tamizaje fitoquímico tabla 3-3 se encontró en el bulbo: saponinas y flavonoides y las hojas tabla 2-3: cumarinas, flavonoides, taninos, terpenos, es muy probable que la superioridad de la actividad antiinflamatoria sea de los extractos brutos por su variedad de metabolitos secundarios.

Los flavonoides han sido catalogados como agentes con gran potencial antiinflamatorio. Se ha descubierto que poseen actividad sobre fases proliferativas y exudativas de la inflamación. Posee actividad sobre células inflamatorias como los mastocitos, así como un gran potencial modulando diversos mediadores de la inflamación por diversos procesos (Çitoğlu et al, 1998b, pp. 205-206).

Taninos y cumarinas también han sido descritos como metabolitos con gran actividad antiinflamatoria, primordialmente por su capacidad antioxidante, relación descrita en el marco teórico. (Mohammed et al, 2014b, pp. 275-285)

Se ha descrito que las saponinas tienen actividad corticomimética directa, inhiben la degradación de corticoides, inhiben la formación enzimática y liberación de mediadores de la inflamación. Similar a estos son los terpenos, por lo cual se debe considerar en el análisis antiinflamatorio de extractos brutos. (Mohammed et al, 2014c, pp. 275-285)

3.5. Ensayo Citotóxico in vitro

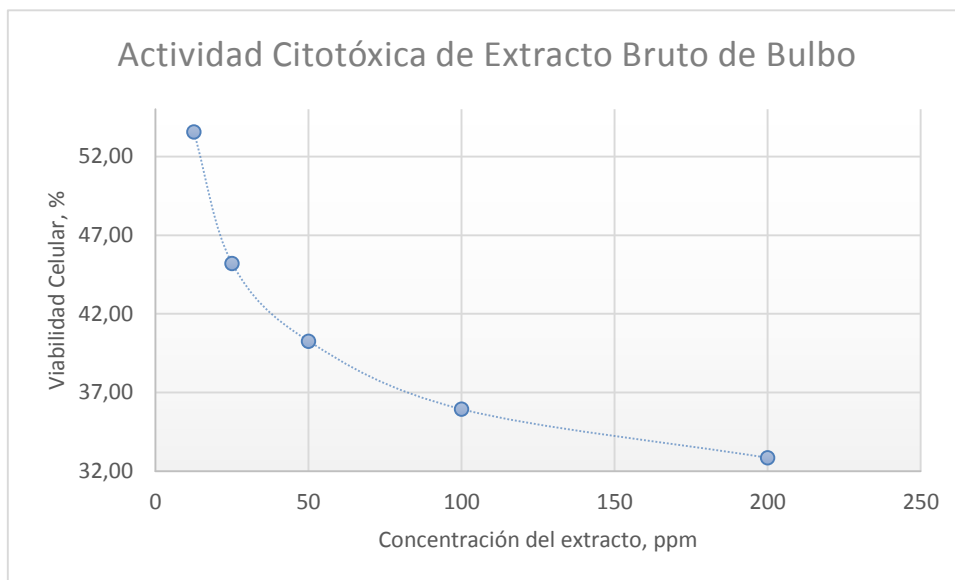


Figura 10-3 Curva del porcentaje de viabilidad celular del extracto bruto de Bulbo.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Tabla 9-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto bruto del bulbo.

Concentraciones	% medio viabilidad celular
200 ppm	32.85 ± 0.54
100 ppm	35.94 ± 0.23
50 ppm	40.27 ± 0.46
25 ppm	45.21 ± 0.23
12.5 ppm	53.55 ± 0.23

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

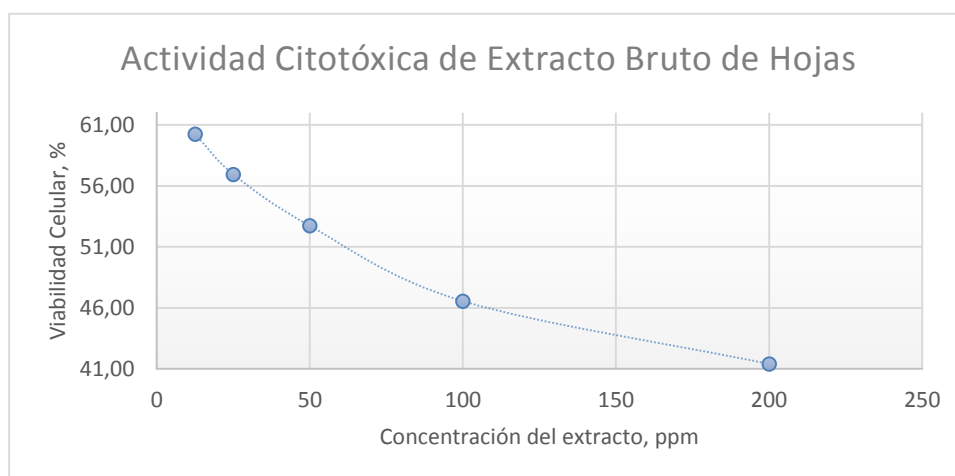


Figura 11-3 Curva del porcentaje de viabilidad celular del extracto bruto de hojas.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Tabla 10-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto bruto de hojas.

Concentraciones	% medio viabilidad celular
200 ppm	41.40 ± 0.31
100 ppm	46.55 ± 0.46
50 ppm	52.73 ± 0.23
25 ppm	56.95 ± 0.23
12.5 ppm	60.25 ± 0.31

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

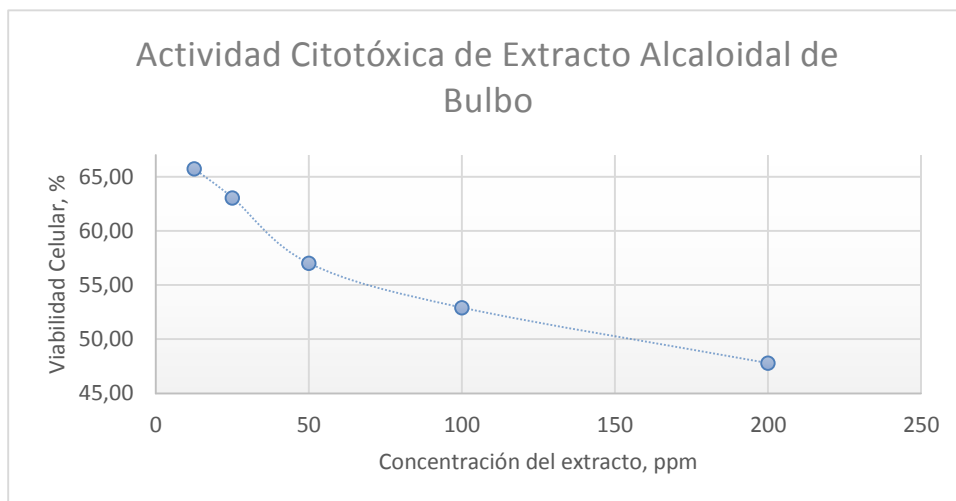


Figura 12-3 Curva del porcentaje de viabilidad celular del extracto alcaloidal de bulbo.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Tabla 11-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto alcaloidal del bulbo.

Concentraciones	% medio viabilidad celular
200 ppm	47.80 ± 0.31
100 ppm	52.92 ± 0.15
50 ppm	57.01 ± 0.23
25 ppm	63.05 ± 0.23
12.5 ppm	65.71 ± 0.31

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

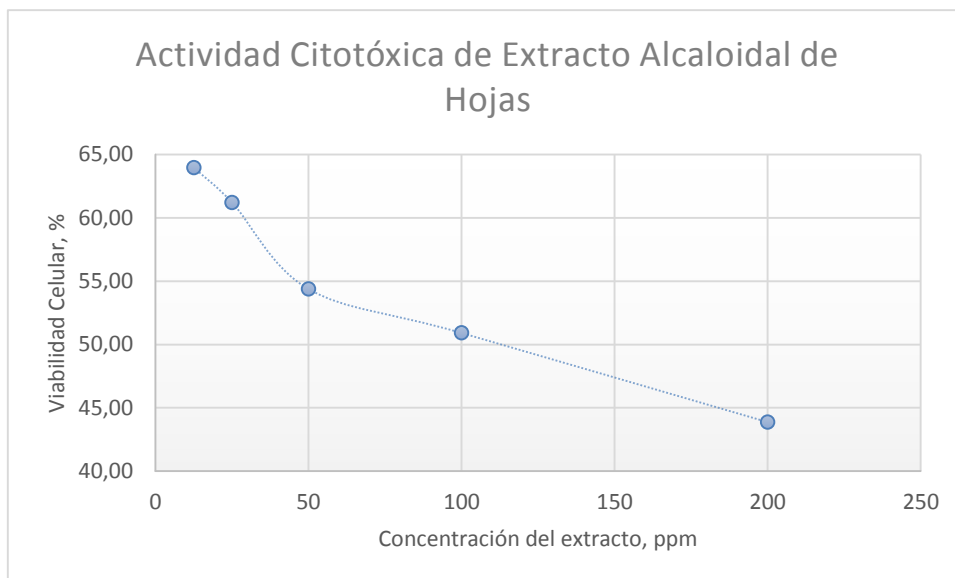


Figura 13-3 Curva del porcentaje de viabilidad celular del extracto alcaloidal de hojas.

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Tabla 12-3 Resultados de la evaluación de la citotoxicidad in vitro expresada en porcentaje de viabilidad celular para diferentes concentraciones del extracto alcaloidal de hojas.

Concentraciones	% medio viabilidad celular
200 ppm	43.88 ± 0.38
100 ppm	50.92 ± 0.38
50 ppm	54.39 ± 0.15
25 ppm	61.22 ± 0.31
12.5 ppm	65.41 ± 0.31

Realizado por: Santiago Portero, 2017.

Los resultados obtenidos, se analizaron estadísticamente utilizando un diseño factorial, para poder determinar si existen diferencias significativas entre la inhibición inflamatoria de acuerdo a la parte de la planta, tipo de extracto y concentración utilizada.

Los resultados obtenidos del análisis univariado, mediante la prueba de efectos intersujetos indican que existen diferencias en cuanto al porcentaje de viabilidad celular con un $p < 0.05$ al aplicar diferentes partes de la planta con diferentes tipos de extracto a diferentes concentraciones, sin embargo, al analizar el tipo de extracto con la concentración se obtuvo que no hay diferencias significativas entre ellos con un $p = 0.380$.

Posteriormente la prueba de Tukey, demostró que todas las concentraciones utilizadas son diferentes, es decir que el porcentaje de viabilidad celular difiere de acuerdo a la concentración que se utilice, teniendo resultados diferentes con la aplicación de cada concentración. La prueba de Tukey no se pudo analizar para los factores: parte de la planta y tipo de extracto, ya que hay menos de tres grupos en cada uno de ellos.

En el primer gráfico de perfil, se obtuvo que los extractos alcaloideos poseen una mayor viabilidad celular frente a los extractos brutos tanto en bulbo como en hojas, siendo los alcaloides del bulbo los que mejor viabilidad celular presentan o a su vez la que posee menor actividad citotóxica.

El segundo gráfico de perfil indica que la concentración de 12.5 ppm presenta el mayor porcentaje de viabilidad celular tanto en bulbo como en hojas, observándose que es superior en las hojas.

El tercer gráfico de perfil indica que la concentración de 12.5 ppm presenta un mayor porcentaje en cuanto a viabilidad celular respecto a los extractos brutos y alcaloidales, observándose una ligera ventaja por parte del extracto alcaloidal.

Asimismo, entre los tres gráficos de perfil tenemos que la actividad citotóxica es más pronunciada en concentraciones más altas, al utilizar extractos brutos, siendo superior los del bulbo. Esto puede explicarse por la variedad de metabolitos secundarios que presenta el bulbo y las hojas de *Crinum x amabile*, previamente analizados en los tamizajes fitoquímicos, tablas 2-3 y 3-3 en los cuales se hallan diversos metabolitos secundarios con gran capacidad citotóxica.

Entre 5 mediciones del LC50 (concentración del compuesto que causa el 50% de reducción de la viabilidad celular) (ANEXO L), donde se observa que el extracto bruto de bulbo posee el valor más bajo con 11.02 ppm (E.B.B.) frente a los demás extractos: 62.78 ppm (E.B.H.), 150.84 ppm (E.A.B.), 82.62 ppm (E.A.H.).

Los alcaloides son el principal grupo de metabolitos secundarios presentes en *Crinum x amabile* (Pham et al. 1998e, pp. 371-376). Se ha observado que estos metabolitos tienen una potencial actividad citotóxica evaluada en líneas celulares tumorales, principalmente augustina, crinamina y licorina (Kittisak et al. 1993b, pp. 1331-1338). Igualmente, estudios previos han demostrado la actividad antitumoral de los alcaloides de la familia *Amaryllidaceae* en general, (Nair et al. 2016b, , pp. 107-156), y otros específicos sobre plantas de la misma especie *Crinum* como *C. latifolium* (Nguyen 2001, pp. 21-23), *C. augustum* y *C. bubispermum* (Hajiz et al. 1991, pp. 437-439), en los cuales se ha demostrado la capacidad antitumoral.

En el caso de las hojas la presencia de triterpenos y esteroides, podrían contribuir a la actividad citotóxica en el caso del extracto bruto, ya que se ha mostrado importantes efectos citotóxicos sobre líneas tumorales: carcinoma gástrico (EPG85-257), pancreático (EPP85-181) y colon (HT-29) (Lage et al. 2010, pp. 441-448). De igual manera las saponinas ya que se han mostrado importantes efectos citotóxicos sobre células tumorales A549, HeLa, HL-60, KB (Hernández Sosa et al. 2013, pp. 93-101).

Otros metabolitos que se identificaron en los extractos son los flavonoides que han sido muy estudiados por su potencial efecto antitumoral, además de actividad antioxidante. Esto es un indicativo de que los flavonoides son potenciales candidatos con actividad antioxidante y citotóxica, lo que podría tener implicaciones en los extractos brutos de *Crinum x amabile*, favoreciendo la citotoxicidad y la actividad antioxidante.

De otro modo, la evaluación de la citotoxicidad demuestra la bioseguridad de los extractos, mostrándose como viabilidad celular frente a neutrófilos aislados. De esta forma podemos destacar que las concentraciones a 12.5 ppm son las que presentan mejor viabilidad celular, siendo similar a estudios citotóxicos en estudios posteriores donde se destaca que la viabilidad celular es inversamente proporcional a la concentración utilizada.

CONCLUSIONES

- Se evidenció que la droga analizada cuantitativamente en el control de calidad, se encuentran dentro del rango de los parámetros de calidad establecidos en Real Farmacopea Española.
- El análisis fitoquímico demostró que en el bulbo están presentes metabolitos como aceites, flavonoides, antocianos, alcaloides y en las hojas aceites, lactonas, alcaloides, mucílagos, triterpenos, fenoles, entre otros; los cuales podrían responder a la superioridad en relación a los valores hallados en la evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de los extractos brutos frente a los alcaloideos.
- Se demostró estadísticamente la superioridad de los extractos brutos frente a los alcaloideos en cuanto a inhibición inflamatoria; mientras que los extractos alcaloideos se destacan por presentar los mayores valores en viabilidad celular.
- Se demostró estadísticamente la superioridad del extracto bruto del bulbo a una concentración de 200 ppm con una inhibición de la inflamación del 56.35% con respecto a los demás extractos, frente al 4.04% de inhibición inflamatoria obtenido del extracto alcaloideo de las hojas a 12.5 ppm representando el resultado menos significativo.
- La evaluación de la actividad citotóxica, obtenida mediante el porcentaje de viabilidad celular, se demostró, mediante análisis estadístico, que el extracto alcaloideo de las hojas a una concentración de 12.5 ppm lidera, con un 65.41% y que el extracto bruto del bulbo a 200 ppm presenta un promedio de 32.85% en viabilidad celular, siendo el más citotóxico estadísticamente.
- En cuanto a la actividad antioxidante, los resultados obtenidos indican que *Crinum x amabile* posee actividad poco significativa de captación de radicales libres, evidenciada al presentar actividad antioxidante a concentraciones muy elevadas en cuanto a concentración inhibitoria media.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda que para investigaciones futuras se realice estudios antiinflamatorios y citotóxicos in vivo, tanto para los extractos brutos y alcaloideos.
- Se recomienda realizar investigaciones que demuestren la potencialidad citotóxica de los extractos de *Crinum x amabile* frente a células tumorales.
- Es necesario realizar análisis para determinar las estructuras de los compuestos que puedan estar presentes en las hojas y bulbos de *Crinum x amabile* y su relación con la actividad antiinflamatoria y citotóxica.
- Es necesario realizar investigaciones de extractos a diferentes polaridades a fin de determinar las porciones que poseen mejores resultados en cuanto a la actividad antiinflamatoria y citotóxica.

BIBLIOGRAFÍA:

Asmawi, M.Z., Arafat, O.M. i Amirin, S. In vivo Antinociceptive Activity of Leaf Extract of *Crinum asiaticum* and Phytochemical Analysis of the Bioactive Fractions.pdf. A: *International Journal of Pharmacology*. 2011, núm. 1811-7775, p. 1 - 5. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/ijp/2011/125-129.pdf>

Atiar Rahman, M. et al. Antinociceptive and antiinflammatory effect of *Crinum asiaticum* bulb extract. A: *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011, Vol. 4, núm. 3, p. 34-37. ISSN 09742441. [Consultado el 23-07-2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286645791_Antinociceptive_and_antiinflammatory_effect_of_Crinum_asiaticum_bulb_extract

Ávila, R. et al. Contenido de azúcares totales , reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. A: *Multiciencias* [en línea]. 2012, Vol. 12, núm. 2, p. 129-135. ISSN 1317-2255. DOI 10.5897/AJB11.3143. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90424216002>

Blass, E. et al. Phytochemical screening and oral acute toxicity study of aqueous leaf extract of *Crinum giganteum*. A: *Journal of Phytology*. 2016, Vol. 8, p. 22-25. DOI 10.19071/jp.2016.v8.3002. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <https://scienceflora.org/journals/index.php/jp/article/viewFile/3002/2998>

Bordés, R. et al. El Proceso Inflamatorio. A: *Br. J. Pharmac.* 2010, Vol. 31, p. 9-12. [Consultado el 26-07-2017]. Disponible en: <https://ruidera.uclm.es/xmlui/handle/10578/266>

Calderón, A.I. et al. Screening of plants of Amaryllidaceae and related families from Panama as sources of acetylcholinesterase inhibitors. A: *Pharmaceutical biology* [en línea]. 2010, Vol. 48, núm. 9, p. 988-93. ISSN 1744-5116. DOI 10.3109/13880200903418514. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880200903418514>

Cañigueral, S., Dellacassa, E. Bandoni, A.L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? A: *Acta Farmaceutica Bonaerense*. 2003, Vol. 22, núm. 3, p. 265-277. ISSN 03262383. [Consultado el 16-02-2017]. Disponible en: http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP_22_3_6_1_S966JS548J.pdf

Cerón Martínez, C.E. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. A: *Botánica Económica de los Andes Centrales* [en línea]. 2006, p. 285-293. [Consultado el 16-02-2017]. Disponible en: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2016.pdf>

Chen, C.-K. et al. Comprehensive Study of Alkaloids from *Crinum asiaticum* var. *sinicum* Assisted by HPLC-DAD-SPE-NMR. A: *Journal of Natural Products* [en línea]. 2011, Vol. 74, núm. 3, p. 411-419. ISSN 0163-3864, 1520-6025. DOI 10.1021/np100819n. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314165>

Cordell, G.A. AMABILOSIDE , A NEW GLYCOSIDE FROM CRZNUM AMABILE ~. A: *Natural Product Letters*. 1993, Vol. 3, núm. 1, p. 4-7. [Consultado el 23-07-2017]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10575639308043830?journalCode=gnp119>

Cubilla, M., Espinosa, A. i Gupta, M.P. Screening of plants of Amaryllidaceae and related - families from Panama as sources of - acetylcholinesterase inhibitors. A: *Pharmaceutical biology*. 2010, Vol. 48, núm. August 2009, p. 988-993. DOI 10.3109/13880200903418514. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20731549>

De La Torre, L., Muriel, P. i Balslev, H. Etnobotánica en los Andes del Ecuador. Rev: *Botánica Económica de los Andes Centrales*. A: . 2006, p. 246-267. [Consultado el 10-07-217]. Disponible en: <https://www.propiedadintelectual.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/micrositio/articulos-tecnicos/etnobotanica-en-los-andes-del-ecuador.pdf>

Gallardo, C. et al. Extracción y caracterización reológica del mucílago de *Malvaviscus penduliflorus* (San Joaquín) Extraction and rheological characterization of *Malvaviscus penduliflorus* (sleeping hibiscus) mucilage. A: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2013, Vol. 18, núm. 4, p. 567-574. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400008

Gilman, E.F. *Crinum x amabile* Giant Spider Lily 1. A: *University of Florida*. 2014, p. 1-2. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <http://edis.ifas.ufl.edu/fp156>

Gómez Estrada, H.A., González Ruiz, K.N. Medina, J.D. Actividad antiinflamatoria de productos naturales. A: *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*. 2011, Vol. 10, núm. 3, p. 182-217. ISSN 07177917. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85618379003.pdf>

Guimarães, J.S. et al. Mecanismos de degeneración secundaria en el sistema nervioso central durante los trastornos neuronales agudos y el daño en la sustancia blanca. A: *Revista de Neurología*. 2009, Vol. 48, núm. 6, p. 304-310. ISSN 02100010. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <https://www.neurologia.com/articulo/2008512>

Hajiz, M.A.A. El et al. Crinum augustum and Crinum bulbispermum. A: *Planta Medica*. 1991, Vol. 57, p. 437-439. [Consultado el 12-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1798796>

Henriette, J. Dutilh, A. *Amaryllidaceae*. 2005. 2005. ISBN 8575230557. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/107631?locale-attribute=es>

Hernández Sosa, E. et al. Actividad citotóxica de extractos acuosos de hojas de *Trichilia hirta* sobre células tumorales humanas. A: *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*. 2013, Vol. 32, núm. 1, p. 93-101. ISSN 08640300. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002013000100009

Kapu, S.D. et al. Anti-inflammatory, analgesic and anti-lymphocytic activities of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. A: *Journal of Ethnopharmacology*. 2001, Vol. 78, núm. 1, p. 7-13. ISSN 03788741. DOI 10.1016/S0378-8741(01)00308-7. [Consultado el 23-07-2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874101003087>

Kedare, S.B. Singh, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. A: *J Food Sci Technol*. 2011, Vol. 48, núm. August, p. 412-422. DOI 10.1007/s13197-011-0251-1. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3551182/>

Kittisak, L. et al. Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from the Bulbs of *Crinum amabile*. A: *Journal of natural products*. 1993, Vol. 56, núm. August, p. 1331-1338. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <https://scienceflora.org/journals/index.php/jp/article/viewFile/3002/2998>

Klinger, J.C. et al. La psiconeuroinmunología en el proceso salud enfermedad. A: *Colombia Médica* [en línea]. 2005, Vol. 36, p. 120-129. ISSN 1657-9534. DOI 10.1590/S0036-36342009000800008. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28336210>

Kricun, P. Contenido de catequinas en cultivares argentinos de té (*Camellia sinensis*),

elaborados como té verde Sencha. A: *Revista de Investigaciones Agrpecuarias*. 2011, Vol. 37, núm. 3, p. 249-255. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3959736>

Lage, H. et al. Antitumor activity of terpenoids against classical and atypical multidrug resistant cancer cells. A: *Phytomedicine* [en línea]. Elsevier, 2010, Vol. 17, núm. 6, p. 441-448. ISSN 09447113. DOI 10.1016/j.phymed.2009.07.009. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711309001895>

Lin, L.Z. et al. Lycorine alkaloids from *Hymenocallis littoralis*. A: *Phytochemistry*. 1995, Vol. 40, núm. 4, p. 1295-1298. ISSN 00319422. DOI 10.1016/0031-9422(95)00372-E. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7492374>

López, A.R. i Serna, A. *AMARYLLIDACEAE*. 2002. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumeness/FLOVER/128-Lopez.pdf>

Mahady, G.B. Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. A: *Current Pharmaceutical Design*. 2005, Vol. 11, p. 2405-2427. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16026296>

Mena, L. et al. Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). A: *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2015, Vol. 20, núm. 1, p. 106-116. ISSN 10284796. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000100010

Mohammed, M.S. et al. Secondary metabolites as anti-inflammatory agents. A: . 2014, Vol. 3, núm. 4, p. 275-285. [Consultado el 21-07-2017]. Disponible en: http://www.phytopharmajournal.com/Vol3_Issue4_09.pdf

Montoya, I. Terapia Antiinflamatoria , Inmunosupresora. A: . 2006, p. 29. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/posgrado/especializaciones/espsaludanimal/informacion/material/180510/farmacologia%202.pdf>

Nair, J.J., Staden, J. Van i Bastida, J. *Cytotoxic Alkaloid Constituents of the Amaryllidaceae*. 2016. ISBN 9780444636010. DOI 10.1016/B978-0-444-63601-0.00003-X. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/308006995_Cytotoxic_Alkaloid_Constituents_of_the_Amaryllidaceae

Nguyen, T.T.N. Cytotoxic activities of alkaloid segments from *Crinum latifolium* L., Amaryllidaceae. A: *Pharmaceutical Journal*. 2001, Vol. 298, núm. 2, p. 21-23. [Consultado el 12-07-2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/50869074_Antiproliferative_Alkaloids_from_Crinum_zeylanicum

Nina, C. Extracción e identificación de alcaloides y otros compuestos químicos de la planta *huperziasaururus*. A: *Ciencias de la Salud, Handbooks*. 2014, p. 33-42. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: http://www.usfx.bo/nueva/Dicyt/Handbooks/Ciencias%20de%20la%20Salud_2/Ciencias%20de%20la%20Salud_Handbook_Vol%20II/PAPERS_29/articulo_3.pdf

Okpo, S.O., Fatokun, F. Adeyemi, O.O. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. A: *Journal of Ethnopharmacology*. 2001, Vol. 78, núm. 2-3, p. 207-211. ISSN 03788741. DOI 10.1016/S0378-8741(01)00318-X. [Consultado el 23-07-2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410100318X>

Ortíz, M.A. et al. Propiedades funcionales de las antocianinas. A: *Biotecnia* [en línea]. 2011, Vol. 13, p. 16-22. ISSN 1665-1456. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283361581_Propiedades_funcionales_de_las_antocianinas

Pham, L.H. et al. Alkaloids from *Crinum amabile*. A: *Phytochemistry*. 1998, Vol. 48, núm. 2, p. 371-376. ISSN 00319422. DOI 10.1016/S0031-9422(97)01081-9. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942297010819>

Programa, I.X. i Cient, C. INFLAMACIÓN. A: *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*. 2008, Vol. 102, p. 91-159. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00681.pdf>

Rahman, A. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Crinum asiaticum* leaf alcoholic extract in animal models. A: . 2013, Vol. 12, núm. 2, p. 212-218. DOI 10.5897/AJB12.1431. - [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/259791526_Analgesic_and_anti-

inflammatory_effects_of_Crinum_asiaticum_leaf_alcoholic_extract_in_animal_models

Ramadan, M.A. et al. Minor phenolics from *Crinum bulbispermum* bulbs. A: *Phytochemistry*. 2000, Vol. 54, núm. 8, p. 891-896. ISSN 00319422. DOI 10.1016/S0031-9422(00)00184-9. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014284>

Refaat, J. et al. CRINUM; AN ENDLESS SOURCE OF BIOACTIVE PRINCIPLES: A REVIEW. PART V. BIOLOGICAL PROFILE. A: *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2013, Vol. 4, núm. 4, p. 1239-1252. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <http://ijpsr.com/bft-article/crinum-an-endless-source-of-bioactive-principles-a-review-part-v-biological-profile/?view=fulltext>

Ríos, L., Cañavate, R. Fitoterapia de la inflamación. Rev. *PHYTOTERAPY AND INFLAMATION* A: . 1995, p. 80-85. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4989385>

Rodríguez, P. i Moran, M. DE CALIDAD DE LA TINTURA. A: *Revista Cubana de Química*. 2008, Vol. 20, núm. 1, p. 19 - 23. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/4435/443543713003.pdf>

Ruiz, E. Suarez, M. Lactonas sesquiterpénicas . Diversidad estructural y sus actividades biológicas. A: *Revista CENIC*. 2015, Vol. 46, núm. 1, p. 9 - 24. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181238817002>

Saltan , G. et al. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. A: *Fitoterapia*. 2012, Vol. 83, núm. 1, p. 81-87. ISSN 0367326X. DOI 10.1016/j.fitote.2011.09.008. [Consultado el 23-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968064>

Souto, A.L. et al. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids: An Update from 2000 to 2010. A: *molecules*. 2011, Vol. 16, p. 8515-8534. DOI 10.3390/molecules16108515. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21989312>

Sun, Q. et al. Chemical constituents of *Crinum asiaticum* L. var. *sinicum* Baker and their cytotoxic activities. A: *Chemistry and Biodiversity*. 2009, Vol. 6, núm. 10, p. 1751-1757. ISSN 16121872. DOI 10.1002/cbdv.200800273. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19842135>

Sun, Q. et al. A new phenolic compound from *Crinum asiaticum* L. A: *Chinese Chemical Letters*. 2008, Vol. 19, núm. 4, p. 447-449. ISSN 10018417. DOI 10.1016/j.ccllet.2008.01.022. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841708000235>

Tan, A.S. i Berridge, M. V. Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: A simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. A: *Journal of Immunological Methods*. 2000, Vol. 238, núm. 1-2, p. 59-68. ISSN 00221759. DOI 10.1016/S0022-1759(00)00156-3. [Consultado el 27-02-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10758236>

Thi Ngoc Tram, N. et al. *Crinum* L. (Amaryllidaceae). A: *Fitoterapia*. 2002, Vol. 73, núm. 3, p. 183-208. ISSN 0367326X. DOI 10.1016/S0367-326X(02)00068-0. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880200903418514>

Uche-Okerefor; Nkemdinma, D, N. Phytochemical analysis and antibacterial testing of *Crinum macowanii* bulbs. A: *J. Pharma Care Health*. 2016, Vol. 3, núm. 2, p. 4172. [Consultado el 11-07-2017]. Disponible en: <https://www.omicsonline.org/proceedings/phytochemical-analysis-and-antibacterial-testing-of-crinum-macowanii-bulbs-45630.html>

Varea, A. et al. *Biodiversidad, bioprospección y bioseguridad* [en línea]. ISBN 9978043063. Disponible a: <http://hdl.handle.net/1928/10512>. [Consultado el 16-02-2017]. Disponible en: http://digitalrepository.unm.edu/abya_yala/529/

Venderrel, C. i Serra, J. *Evaluación de la Citotoxicidad de un implante dental*. 2008. 2008. [Consultado el 10-02-2017]. Disponible en: <http://www.biounite.com/wp-content/uploads/2017/01/Citotoxicidad-Biounite.pdf>

Walk, M. Amaryllidaceae and. A: . 1995, Vol. 1994, núm. 5. [Consultado el 23-02-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245403>

Wendie, E. INFLAMACIÓN I. A: *Rev Actualización Clínica*. 2014, Vol. 43, p. 2261-2265. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci_arttext

World Health Organization. Determination of ash. A: *Quality control methods for herbal materials*. 1998, p. 29. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/h1791e/h1791e.pdf>

Zambrano, L. et al. Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos , Quevedo , Ecuador Introducción La etnobotánica tiene como objetivo la búsqueda. A: *Rev. Univ. salud*. 2015, Vol. 17, núm. 1, p. 97-111. [Consultado el 10-07-2017]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072015000100009

Çitoğlu, G., Tanker, M. Gümüsel, B. Short communication: Antiinflammatory effects of lycorine and haemanthidine. A: *Phytotherapy Research*. 1998, Vol. 12, núm. 3, p. 205-206. ISSN 0951418X. DOI 10.1002/(SICI)1099-1573(199805)12:3<205::AID-PTR203>3.0.CO;2-7. [Consultado el 23-07-2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236003>

ANEXOS:

ANEXO A: Recolección de material vegetal (Gráfico 1A)



Gráfico 1A: Recolección del material vegetal

ANEXO B: Tamizaje fitoquímico bulbo (Gráfico 1B) y hojas (Gráfico 2B)

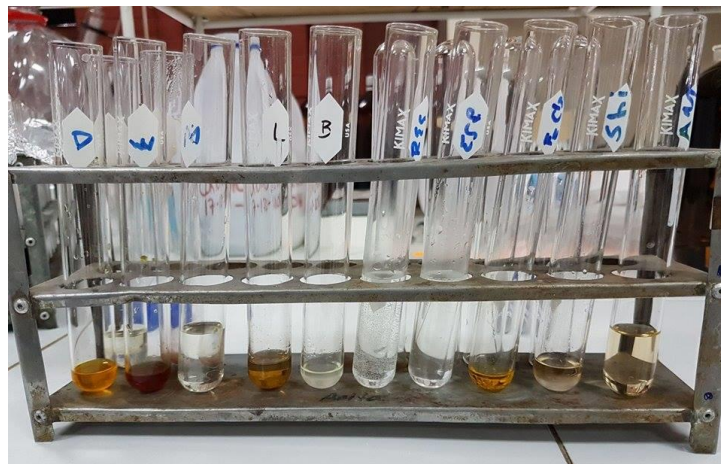


Gráfico 1B: Tamizaje fitoquímico bulbo



Gráfico 2B: Tamizaje fitoquímico hojas

ANEXO C: Maceración (Gráfico 1C) y sonicación (Gráfico 2C)



Gráfico 1C: Maceración



Gráfico 2C: Sonicación

ANEXO D: Extracción de alcaloides. Extracción con éter etílico (Gráfico 1D); extracción con acetato de etilo (Gráfico 2D); acidificación con ácido sulfúrico 2% (Gráfico 3D); concentración de soluciones en rotavapor (Gráfico 4D); soluciones concentradas después de rotavapor (Gráfico 5D); extracto concentrado y almacenado (Gráfico 6D)



Gráfico 1D: Extracción con éter etílico



Gráfico 2D: Extracción con acetato de

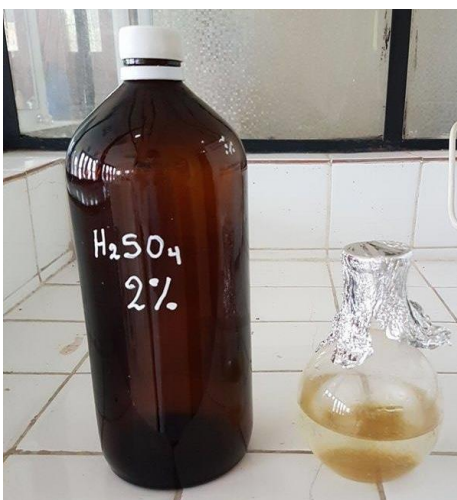


Gráfico 3D: acidificación con H_2SO_4



Gráfico 4D: concentración de soluciones en rotavapor

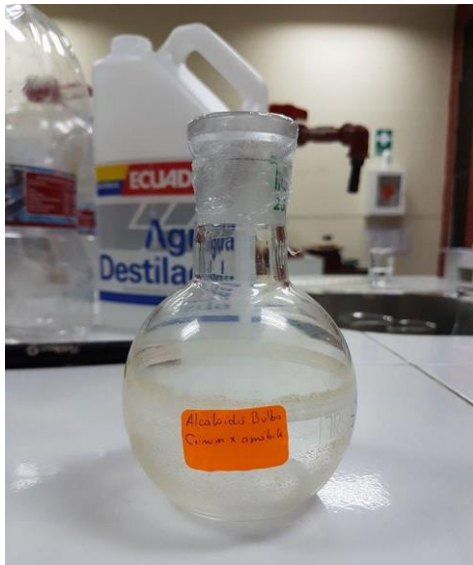


Gráfico 5D: soluciones concentradas después de rotavapor

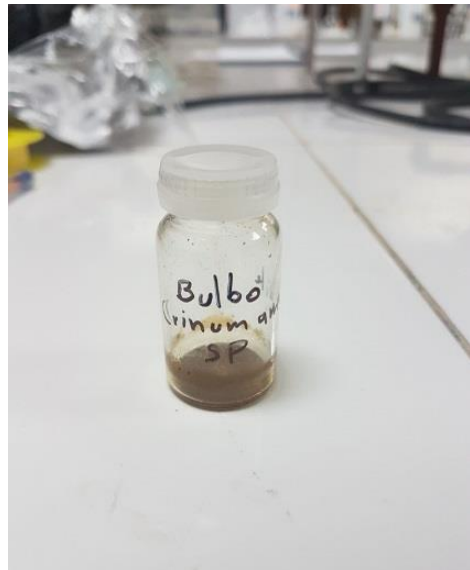


Gráfico 6D: extracto concentrado y almacenado

ANEXO E: Actividad antioxidante in vitro. Disolución de extractos (Gráfico 1E); disoluciones de extractos (Gráfico 2E); Ensayo colorimétrico (Gráfico 3E).



Gráfico 1E: Disolución de extractos



Gráfico 2E: disoluciones de extractos

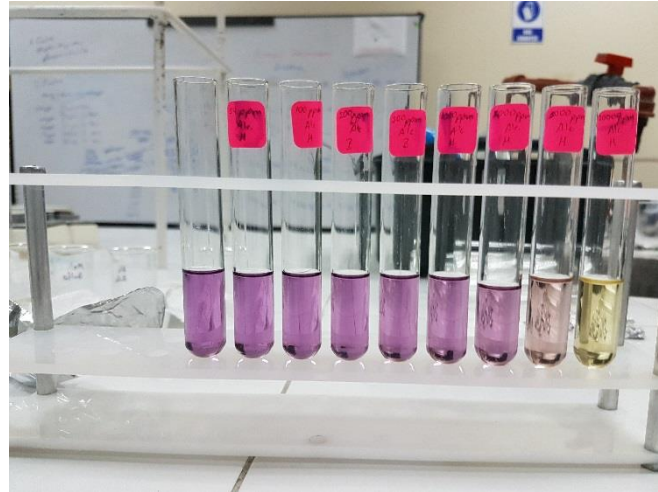


Gráfico 3E: Ensayo colorimétrico

ANEXO F: Aislamiento de Neutrófilos. Extracción sanguínea (Gráfico 1F); Disolución con MHS (Gráfico 2F); disolución con ficoll (Gráfico 3F); separación del paquete globular (Gráfico 4F); neutrófilos aislados con MHS (Gráfico 5F).



Gráfico 1F: Aislamiento de Neutrófilos. Extracción sanguínea



Gráfico 2F: Disolución con MHS



Gráfico 3F: Disolución con ficoll



Gráfico 4F: separación del paquete globular



Gráfico 5F: neutrófilos aislados con MHS

ANEXO G: Actividad antiinflamatoria y citotóxica in vitro. Zymosan en suero (Gráfico 1G); colocación de reactivos en microposillos (Gráfico 2G); microposillos en placa previo a incubación (Gráfico 3G); microposillos en placa posterior a incubación (Gráfico 4G); disolución en tubos de ensayo con MHS (Gráfico 5G); medición en espectro UV (Gráfico 6G).

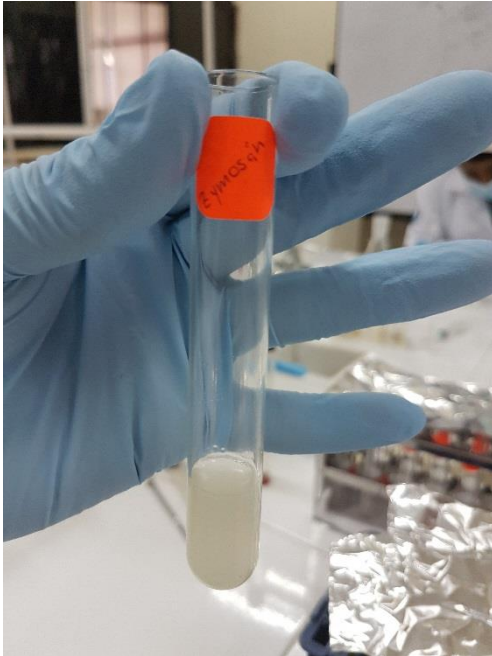


Gráfico 1G: Zymosan en suero

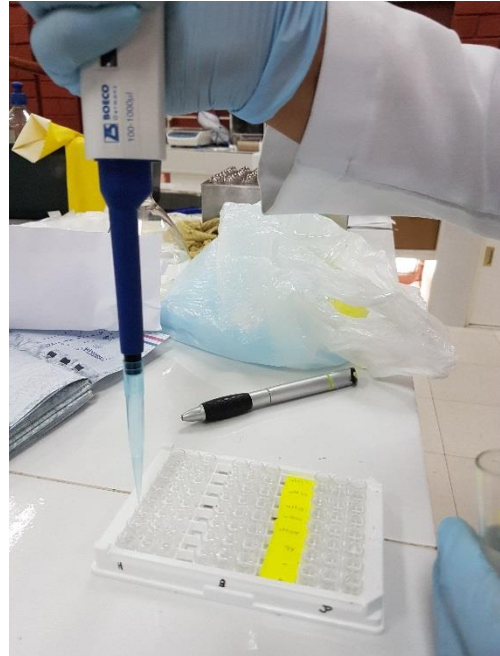


Gráfico 2G: Colocación de reactivos en microposillos



Gráfico 3G: Microposillos en placa previo a incubación

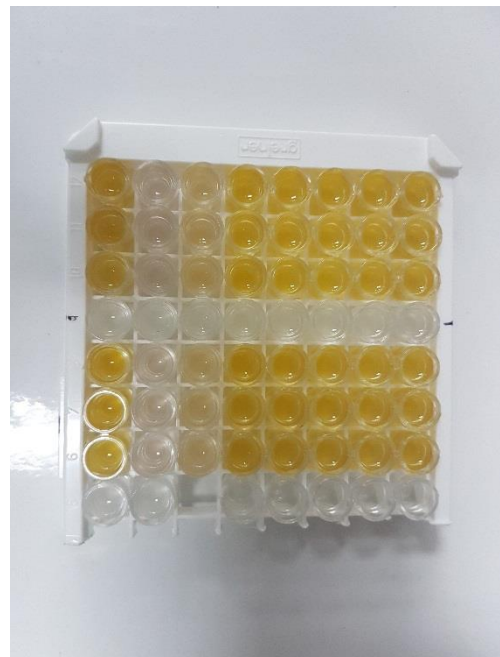


Gráfico 4G: Microposillos en placa posterior a incubación

ANEXO H: Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria. Factores intersujetos (Gráfico 1H); pruebas de efectos intersujetos (Gráfico 2H); comparaciones múltiples (Gráfico 3H); prueba de tukey (Gráfico 4H); medidas marginales 1 (Gráfico 5H); medidas marginales 2(Gráfico 6H); medidas marginales 3(Gráfico 7H).

		Etiqueta de valor	N
Parte_de_la_planta	1	Bulbo	30
	2	Hojas	30
Tipo_de_extracto	1	Bruto	30
	2	Alcaloidal	30
Concentración	12,5		12
	25,0		12
	50,0		12
	100,0		12
	200,0		12

Gráfico 1H: Factores intersujetos

Variable dependiente: Inhibición_inflamatoria

	Tipo III de suma de cuadrados	g	Media cuadrática	F	Si g.
Modelo corregido	14328,856 ^a	19	754,150	1537,294	,000
Intersección	83177,033	1	83177,033	169551,813	,000
Parte_de_la_planta	10411,939	1	10411,939	21224,166	,000
Tipo_de_extracto	1057,476	1	1057,476	2155,607	,000
Concentración	1499,153	4	374,788	763,985	,000
Parte_de_la_planta * Tipo_de_extracto	1056,805	1	1056,805	2154,238	,000
Parte_de_la_planta * Concentración	23,021	4	5,755	11,732	,000
Tipo_de_extracto * Concentración	164,748	4	41,187	83,958	,000
Parte_de_la_planta * Tipo_de_extracto * Concentración	115,714	4	28,929	58,969	,000

Error	19,623	4	,491		
Total	97525,5	6			
	12	0			
Total corregido	14348,4	5			
	79	9			

a. R al cuadrado = ,999 (R al cuadrado ajustada = ,998)

Gráfico 2H: Pruebas de efectos intersujetos

Variable dependiente: Inhibición_inflamatoria

HSD Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
12,5	25,0	-3,9750*	,28594	,000	-4,7917	-3,1583
	50,0	-7,5108*	,28594	,000	-8,3275	-6,6942
	100,0	-10,2758*	,28594	,000	-11,0925	-9,4592
	200,0	-14,4900*	,28594	,000	-15,3067	-13,6733
25,0	12,5	3,9750*	,28594	,000	3,1583	4,7917
	50,0	-3,5358*	,28594	,000	-4,3525	-2,7192
	100,0	-6,3008*	,28594	,000	-7,1175	-5,4842
	200,0	-10,5150*	,28594	,000	-11,3317	-9,6983
50,0	12,5	7,5108*	,28594	,000	6,6942	8,3275
	25,0	3,5358*	,28594	,000	2,7192	4,3525
	100,0	-2,7650*	,28594	,000	-3,5817	-1,9483
	200,0	-6,9792*	,28594	,000	-7,7958	-6,1625
100,0	12,5	10,2758*	,28594	,000	9,4592	11,0925
	25,0	6,3008*	,28594	,000	5,4842	7,1175
	50,0	2,7650*	,28594	,000	1,9483	3,5817
	200,0	-4,2142*	,28594	,000	-5,0308	-3,3975
200,0	12,5	14,4900*	,28594	,000	13,6733	15,3067
	25,0	10,5150*	,28594	,000	9,6983	11,3317
	50,0	6,9792*	,28594	,000	6,1625	7,7958
	100,0	4,2142*	,28594	,000	3,3975	5,0308

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,491.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Gráfico 3H: comparaciones múltiples

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
12,5	12	29,9825				
25,0	12		33,9575			
50,0	12			37,4933		
100,0	12				40,2583	
200,0	12					44,4725
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,491.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

b. Alfa = 0,05.

Gráfico 4H: Prueba de tukey

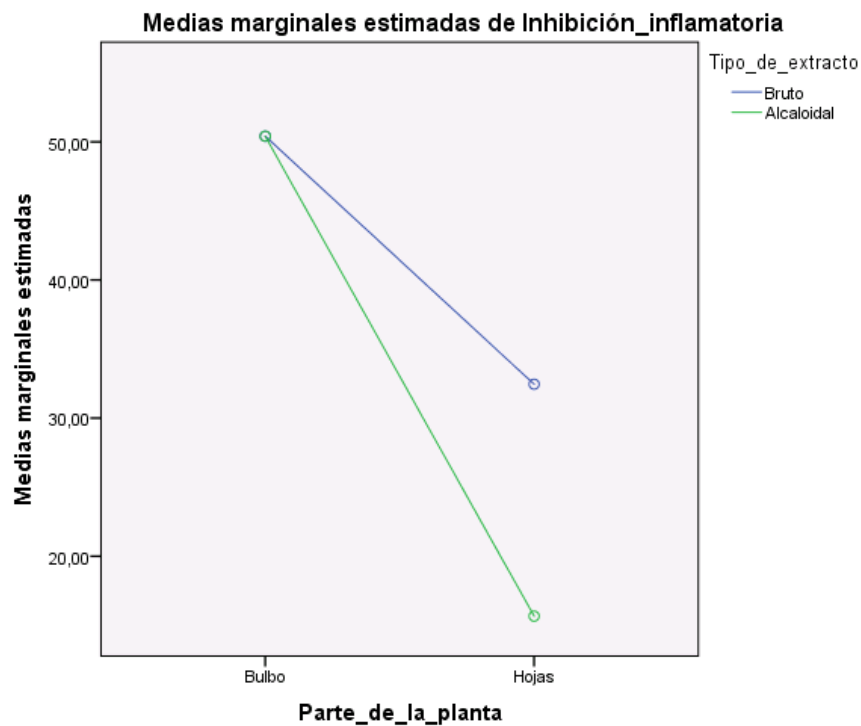


Gráfico 5H: Medidas marginales 1

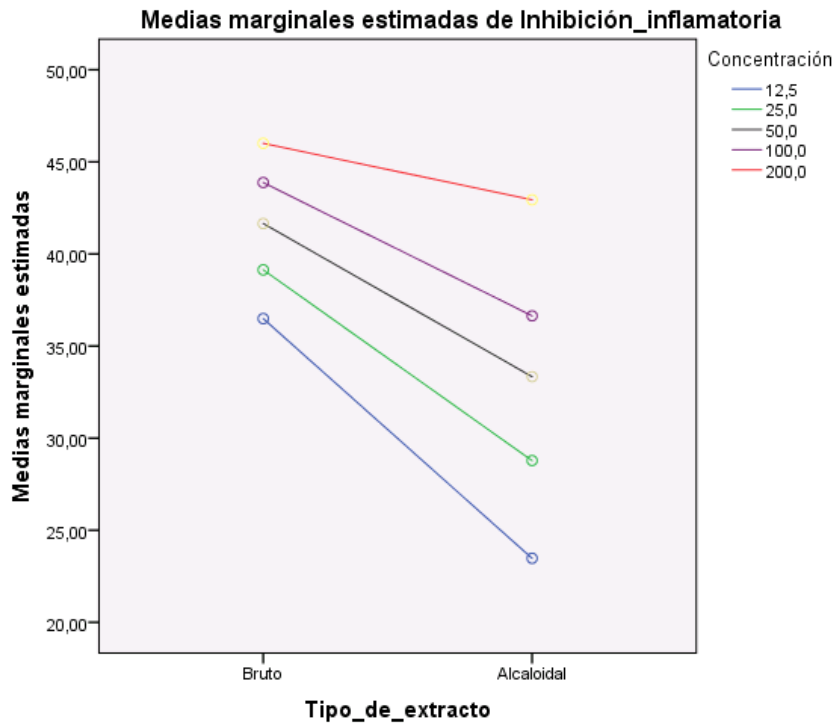


Gráfico 6H: Medidas marginales 2

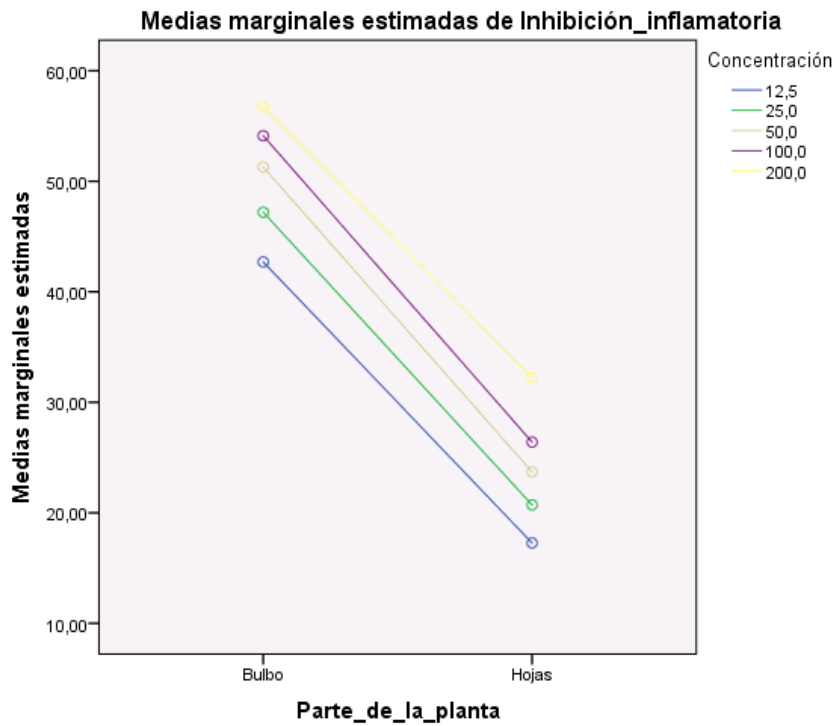


Gráfico 7H: Medidas marginales 3

ANEXO I: Análisis estadístico de la actividad citotóxica. Factores intersujetos (Gráfico 1I); pruebas de efectos intersujetos (Gráfico 2I); comparaciones múltiples (Gráfico 3I); prueba de tukey (Gráfico 4I); medidas marginales 1 (Gráfico 5I); medidas marginales 2(Gráfico 6I); medidas marginales 3(Gráfico 7I).

		Etiqueta de valor	N
Parte_de_la_planta	1	Bulbo	30
	2	Hojas	30
Tipo_de_extracto	1	Bruto	30
	2	Alcaloidal	30
Concentración	12,5		12
	25,0		12
	50,0		12
	100,0		12
	200,0		12

Gráfico 1I: Factores intersujetos

Variable dependiente: Viabilidad_Celular

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	4979,071 ^a	19	262,056	142,582	,000
Intersección	157172,757	1	157172,757	85515,872	,000
Parte_de_la_planta	273,109	1	273,109	148,596	,000
Tipo_de_extracto	1302,284	1	1302,284	708,557	,000
Concentración	2842,086	4	710,522	386,587	,000
Parte_de_la_planta * Tipo_de_extracto	493,239	1	493,239	268,365	,000
Parte_de_la_planta * Concentración	32,788	4	8,197	4,460	,004
Tipo_de_extracto * Concentración	7,934	4	1,984	1,079	,380
Parte_de_la_planta * Tipo_de_extracto * Concentración	27,630	4	6,908	3,758	,011
Error	73,517	40	1,838		
Total	162225,345	60			
Total corregido	5052,588	59			

a. R al cuadrado = ,985 (R al cuadrado ajustada = ,979)

Gráfico 2I: Pruebas de efectos intersujetos

Variable dependiente: Viabilidad_Celular

HSD Tukey

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
Concentración	Concentración				

					Límite inferior	Límite superior
12,5	25,0	5,4517*	,55346	,000	3,8709	7,0324
	50,0	10,1217*	,55346	,000	8,5409	11,7024
	100,0	14,6367*	,55346	,000	13,0559	16,2174
	200,0	19,7283*	,55346	,000	18,1476	21,3091
25,0	12,5	-5,4517*	,55346	,000	-7,0324	-3,8709
	50,0	4,6700*	,55346	,000	3,0893	6,2507
	100,0	9,1850*	,55346	,000	7,6043	10,7657
	200,0	14,2767*	,55346	,000	12,6959	15,8574
50,0	12,5	-10,1217*	,55346	,000	-11,7024	-8,5409
	25,0	-4,6700*	,55346	,000	-6,2507	-3,0893
	100,0	4,5150*	,55346	,000	2,9343	6,0957
	200,0	9,6067*	,55346	,000	8,0259	11,1874
100,0	12,5	-14,6367*	,55346	,000	-16,2174	-13,0559
	25,0	-9,1850*	,55346	,000	-10,7657	-7,6043
	50,0	-4,5150*	,55346	,000	-6,0957	-2,9343
	200,0	5,0917*	,55346	,000	3,5109	6,6724
200,0	12,5	-19,7283*	,55346	,000	-21,3091	-18,1476
	25,0	-14,2767*	,55346	,000	-15,8574	-12,6959
	50,0	-9,6067*	,55346	,000	-11,1874	-8,0259
	100,0	-5,0917*	,55346	,000	-6,6724	-3,5109

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 1,838.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Gráfico 3I: Comparaciones múltiples

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
200,0	12	41,4408				
100,0	12		46,5325			
50,0	12			51,0475		
25,0	12				55,7175	
12,5	12					61,1692
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 1,838.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

b. Alfa = 0,05.

Gráfico 4I: Prueba de Tukey

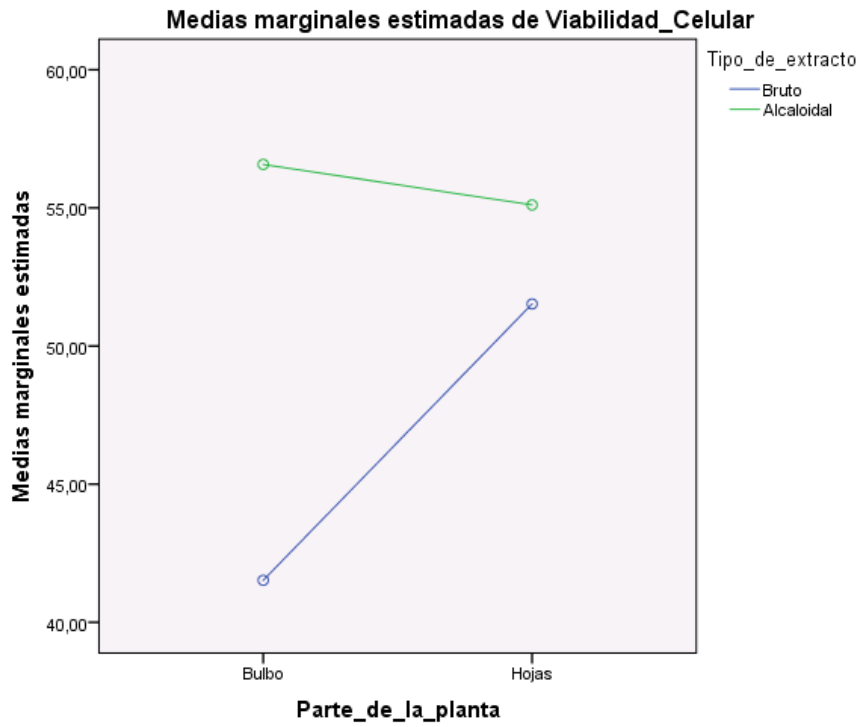


Gráfico 5I: Medidas marginales 1

Gráfico 6I

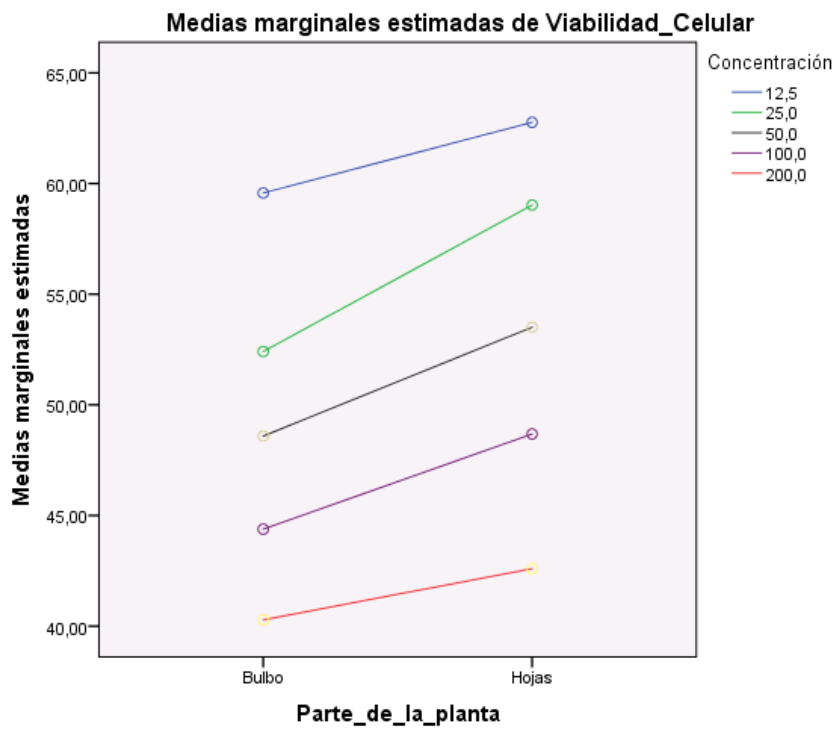


Gráfico 6I: Medidas marginales 2

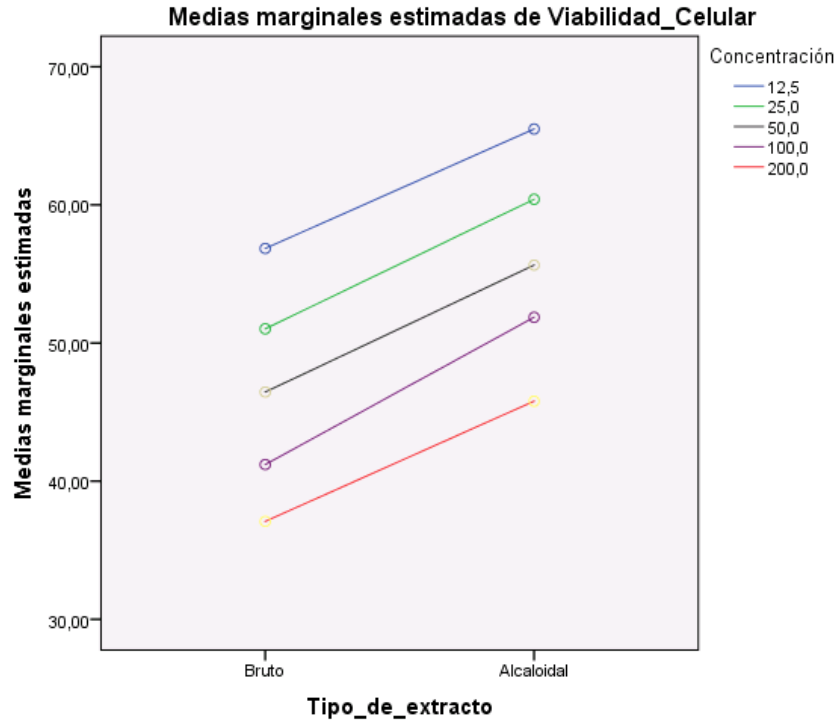


Gráfico 71: Medidas marginales 3

ANEXO J: Determinación del IC 50 de actividad antioxidante. Ácido gálico (Gráfico 1J); E.B.B. (Gráfico 2J); E.B.H. (Gráfico 3J); E.A.B. (Gráfico 4J); E.A.H. (Gráfico 5J).

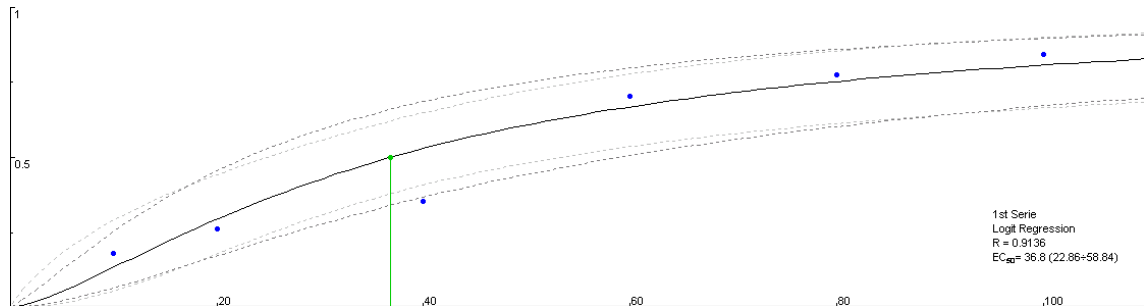


Gráfico1J: IC 50 Actividad antioxidante Ácido gálico

IC 50 Actividad Antioxidante	
Tipo de Extracto	IC 50
Ácido gálico	36.8
E.B.B	5,04 E7
E.B.H	112080,7
E.A.B	6818,24
E.A.H	8344,1

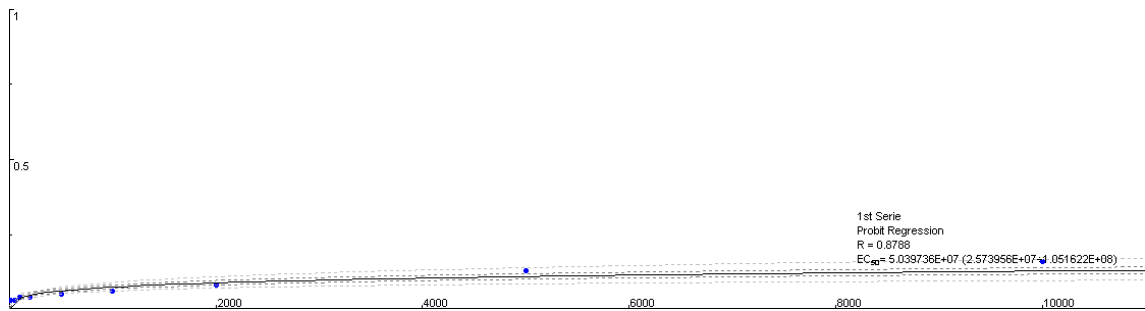


Gráfico 2J: IC 50 Actividad antioxidante Extracto bruto de bulbo.

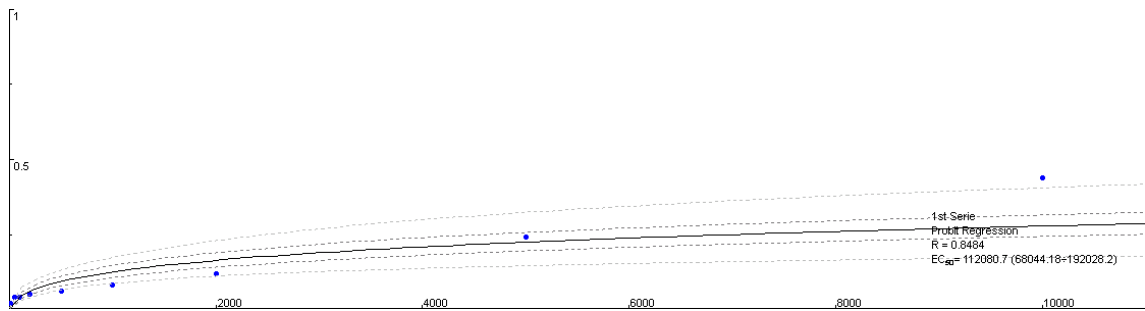


Gráfico 3J: IC 50 Actividad antioxidante Extracto bruto de hojas

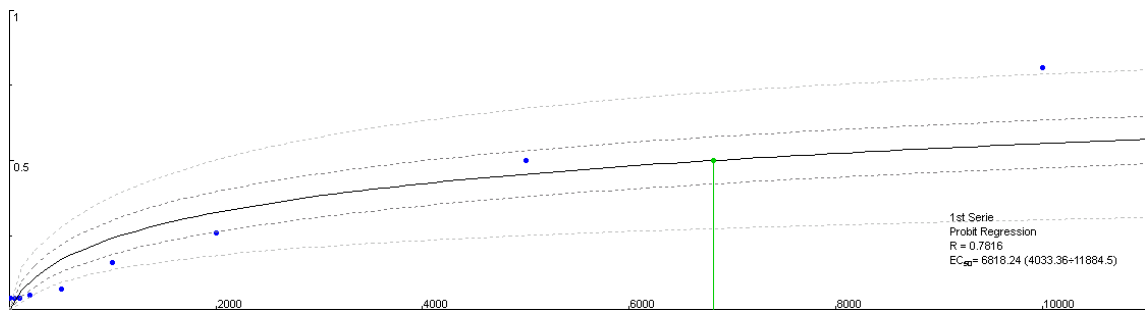


Gráfico 4J: IC 50 Actividad antioxidante Extracto alcaloidal de bulbo

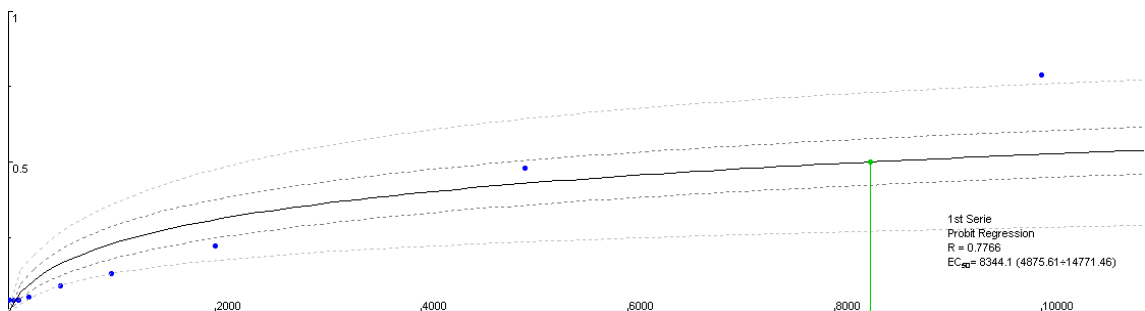


Gráfico 5J: IC 50 Actividad antioxidante Extracto alcaloidal hojas

ANEXO K: Determinación del IC 50 de actividad antiinflamatoria. E.B.B. (Gráfico 1K); E.B.H. (Gráfico 2K); E.A.B. (Gráfico 3K); E.A.H. (Gráfico 4K).

IC 50 Actividad Antiinflamatoria	
Tipo de Extracto	IC 50
E.B.B	46,28
E.B.H	86297,1
E.A.B	48,59
E.A.H	1319,6

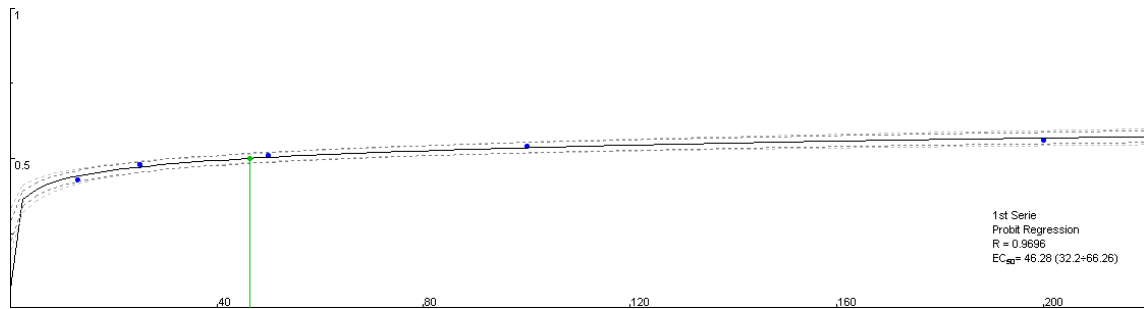


Gráfico 1K: IC 50 Actividad antiinflamatoria Extracto bruto de bulbo

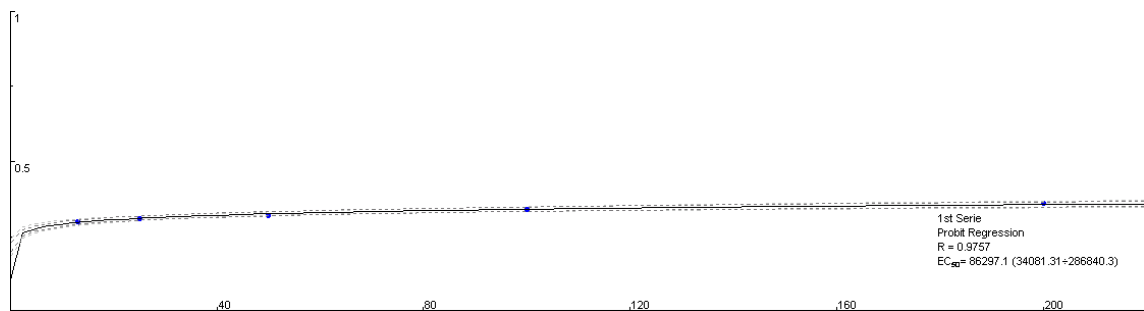


Gráfico 2K: IC 50 Actividad antiinflamatoria Extracto bruto de hojas

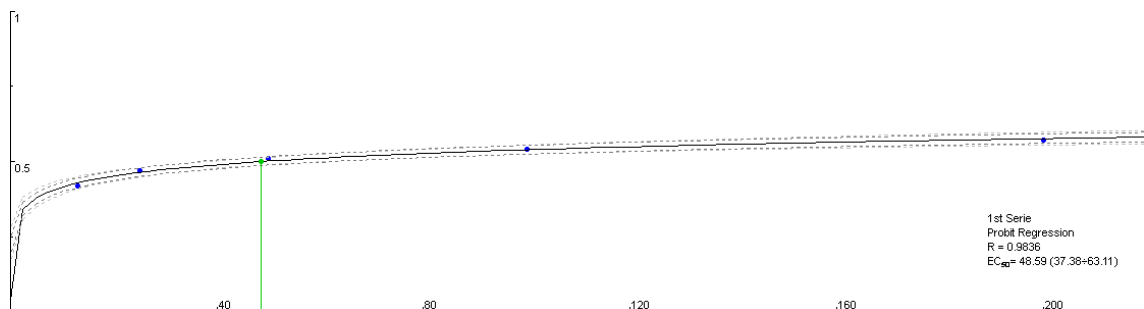


Gráfico 3K: IC 50 Actividad antiinflamatoria Extracto alcaloidal de bulbo

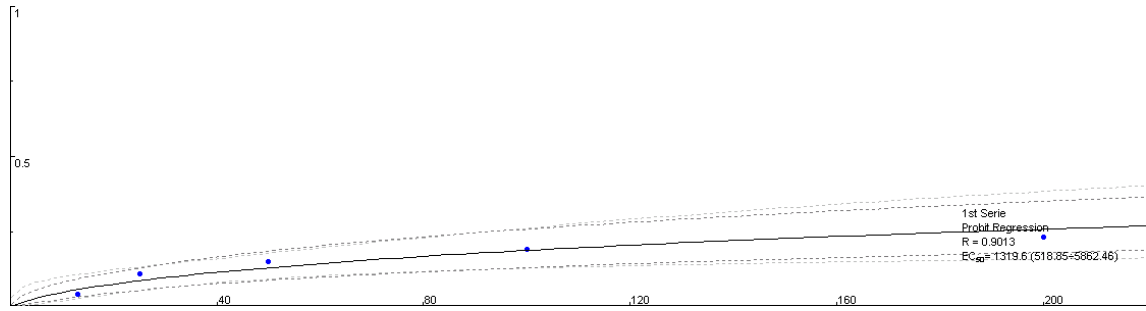


Gráfico 4K: IC 50 Actividad antiinflamatoria Extracto alcaloidal de hojas

ANEXO L: Determinación del LC 50 de actividad citotóxica. E.B.B. (Gráfico 1L); E.B.H. (Gráfico 2L); E.A.B. (Gráfico 3L); E.A.H. (Gráfico 4L).

LC 50 Actividad Citotóxica	
Tipo de Extracto	LC 50
E.B.B	11,02
E.B.H	62,78
E.A.B	150,84
E.A.H	82,62

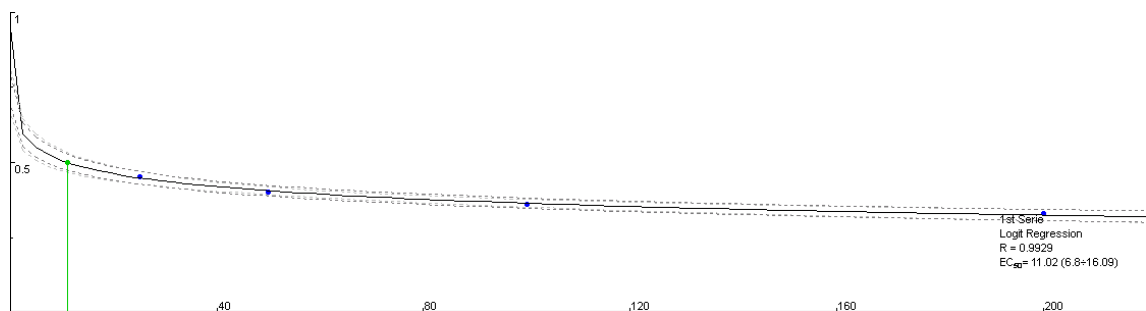


Gráfico 1L: LC 50 Actividad citotóxica Extracto bruto de bulbo

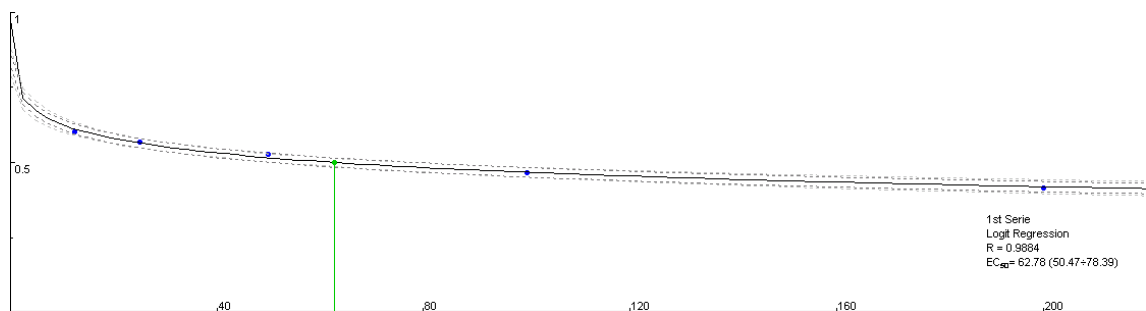


Gráfico 2L: LC 50 Actividad citotóxica Extracto bruto de hojas

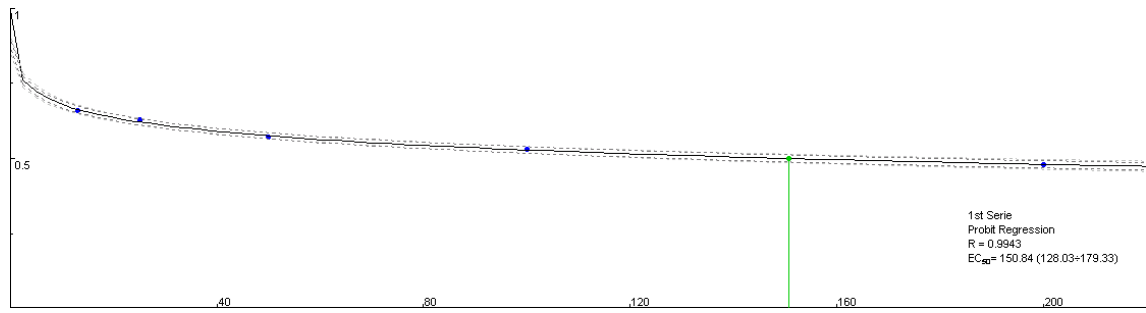


Gráfico 3L: LC 50 Actividad citotóxica Extracto alcaloidal de bulbo

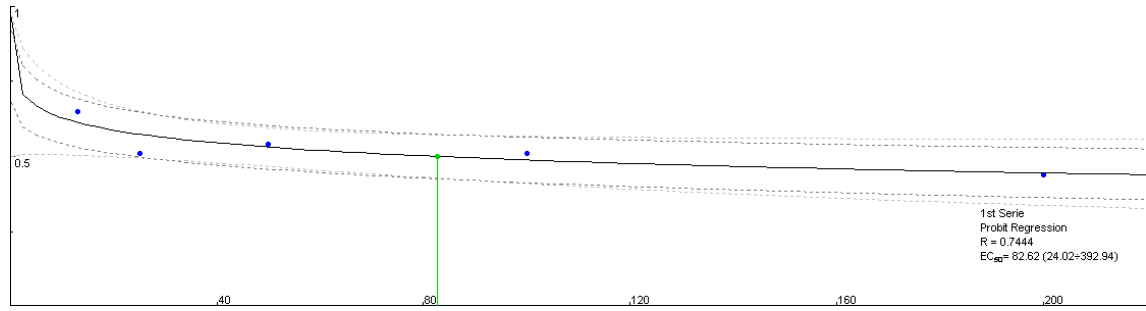


Gráfico 4L: LC 50 Actividad citotóxica Extracto alcaloidal de hojas