



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

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD, ANTIOXIDANTE Y
ANTIINFLAMATORIA *In vitro* DE EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS Y FLORES DE
Tropaeolum majus”**

Trabajo de Titulación tipo: Trabajo Experimental.

Para optar al Grado Académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: ÁNGEL RICARDO MÁRQUEZ ALTAMIRANO

TUTORA: BQF. GISELA PILCO BONILLA, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2018

©2018, Ángel Ricardo Márquez Altamirano

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

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

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD, ANTIOXIDANTE Y ANTIINFLAMATORIA *In vitro* DE EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS Y FLORES DE *Tropaeolum majus*”** de responsabilidad del señor egresado Ángel Ricardo Márquez Altamirano, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Gisela Pilco, M.Sc.

**DIRECTORA DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Diego Vinuesa, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Ángel Ricardo Márquez Altamirano, declaro que el contenido, ideas, doctrinas que se presentan en este proyecto de titulación son de mi responsabilidad, los resultados son verídicos y el patrimonio intelectual de este proyecto de titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

ÁNGEL RICARDO MÁRQUEZ ALTAMIRANO

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación va dedicado, en primer lugar a Dios, por concederme la gracia y bendición de tener una familia amorosa.

A mis padres y mi hermana porque gracias a su apoyo incondicional, he logrado llegar hasta aquí, y conseguir esta meta.

A mi sobrina, Sophia con tu llegada llenaste de alegría y luz todo nuestro hogar.

Ricardo.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar debo agradecer a Dios por darme la dicha de poder estudiar y la fortaleza para culminar una meta más en mi vida.

A mis padres y mi hermana por su apoyo incondicional en cada momento de mi vida, por ser mi fuerza y mi pilar para seguir adelante en cada momento difícil y también gracias por todos los momentos felices que he vivido a su lado, este logro es también de ustedes.

Mis agradecimientos más profundos a la BQF. Gisela Pilco por su apoyo y colaboración en este trabajo a pesar de todas las dificultades busco asistírnos siempre y se preocupó activamente en el desarrollo de este trabajo, sin sus conocimientos sería imposible la terminación del mismo.

De igual manera agradecer profundamente al BQF. Diego Vinueza sin su valioso aporte y experiencia no hubiera sido posible la realización de este proyecto, gracias por su apoyo en los laboratorios, y despertar en nosotros la pasión por la investigación científica.

A todos mis amigos que han formado parte de este gran camino desde el inicio Gabriel, Mary, y los que se han sumado al final como ustedes NP, hasta culminar en esta meta, ustedes han hecho este camino más llevadero, convirtiéndose en mi familia lejos de casa.

A la ESPOCH por permitirme crecer intelectualmente y como persona en el interior de sus aulas e instalaciones.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO I	4
1.- MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1.- La Biodiversidad Ecuatoriana	4
1.2.- Tropaeolum majus	5
<i>1.2.1.- Distribución y Hábitat</i>	6
<i>1.2.2.- Taxonomía</i>	6
<i>1.2.3.- Descripción Taxonómica</i>	6
<i>1.2.4.- Usos Tradicionales</i>	7
<i>1.2.5.- Actividades Biológicas comprobadas</i>	7
1.3.- La Inflamación	8
<i>1.3.1.- Fases de la Inflamación</i>	8
<i>1.3.2.- Tipos de Inflamación</i>	9
<i>1.3.2.1.- Por el tiempo de duración</i>	9
<i>1.3.2.2.- Por el carácter del exudado</i>	9
<i>1.3.2.3.- Por su etiología</i>	10
<i>1.3.2.4.- Por sus características morfológicas</i>	10
<i>1.3.2.5.- Por su localización</i>	10
<i>1.3.3.- Mediadores de la Respuesta Inflamatoria</i>	11
<i>1.3.3.1.- Liberación de Mediadores. El Mastocito</i>	11
<i>1.3.4.- Efectos de los Mediadores</i>	12
<i>1.3.4.1.- Mediadores preformados</i>	12
<i>1.3.4.2.- Mediadores sintetizados de novo</i>	12
<i>1.3.5.- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio</i>	13
<i>1.3.5.1.- Fase inicial. Llegada de moléculas</i>	14
<i>1.3.5.2.- Fase tardía. Llegada de células</i>	14
<i>1.3.6.- Regulación de la Respuesta Inflamatoria</i>	15
<i>1.3.7.- Reparación</i>	16

1.4.- Tratamiento para la Inflamación.....	17
<i>1.4.1.- Tratamiento Farmacológico</i>	<i>17</i>
<i>1.4.1.1.- Analgésicos Antiinflamatorios no Esteroideos. (AINES).....</i>	<i>17</i>
<i>1.4.1.2.- Glucocorticoides</i>	<i>19</i>
1.4.2.- Tratamiento no Farmacológico	19
<i>1.4.2.1.- Corteza de Sauce.....</i>	<i>19</i>
<i>1.4.2.2.- Harpagofito.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.2.3.- Mostaza Negra.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.2.4.- Otras plantas de uso común en el Ecuador.....</i>	<i>20</i>
<i>1.4.2.5.- Otras técnicas comunes.....</i>	<i>20</i>
1.5.- Metabolitos Secundarios con Propiedades Antiinflamatorias y Antioxidantes.	20
<i>1.5.1.- Fenoles.....</i>	<i>20</i>
<i>1.5.2.- Flavonoides.....</i>	<i>21</i>
1.6.- Algunos Métodos para evaluar la Actividad Antiinflamatoria.	23
<i>1.6.1.- Sistemas celulares in Vitro y metabolismo del Ácido Araquidónico (AA).</i>	<i>23</i>
<i>1.6.1.1.- Método de Estimulación.....</i>	<i>23</i>
<i>1.6.2.- Método de cuantificación de eicosanoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).....</i>	<i>24</i>
<i>1.6.3.- Edema plantar inducido por carragenina</i>	<i>24</i>
<i>1.6.4.- Modelo de inducción de edema con aceite de crotón en la oreja del ratón.</i>	<i>24</i>
<i>1.6.5.- Reactivo de proliferación celular (WST-1) para la actividad citotóxica y antiinflamatoria</i>	<i>24</i>
1.7.- Antioxidante.....	25
<i>1.7.1 Radical Libre.....</i>	<i>25</i>
<i>1.7.2.- Estrés Oxidativo.....</i>	<i>26</i>
<i>1.7.3.- Capacidad captadora de radicales libres. Método DPPH'</i>	<i>26</i>
CAPITULO II.....	27
2.- MARCO METODOLÓGICO.....	27
2.1.- Lugar de Investigación.....	27
2.2.- Recolección de la materia vegetal	27
2.3.- Identificación de Material Vegetal.....	27
2.4.- Materiales, Equipos y Reactivos	27
<i>2.4.1.- Material Vegetal, Biológico y Farmacológico.....</i>	<i>27</i>
<i>2.4.2.- Material de Laboratorio</i>	<i>28</i>
<i>2.4.3.- Equipos</i>	<i>29</i>
<i>2.4.4.- Reactivos.....</i>	<i>30</i>
2.5.- Técnicas y Métodos	31

2.5.1.- Secado y Molienda del Material Vegetal	31
2.5.1.1.- Secado	31
2.5.1.2.- Molienda	31
2.5.2.- Control de Calidad de la Droga Cruda	31
2.5.2.1.- Determinación del contenido de humedad (Método gravimétrico).....	31
2.5.2.2.- Determinación de cenizas totales.....	32
2.5.2.3.- Determinación de cenizas solubles en agua.....	33
2.5.2.4.- Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.....	33
2.5.3.- Tamizaje Fitoquímico	34
2.5.4.- Obtención del Extracto Hidroalcohólico	36
2.5.4.1.- Determinación de los requisitos organolépticos.....	36
2.5.4.2.- Determinación de densidad relativa	36
2.5.4.3.- Determinación del índice de refracción.....	36
2.5.4.4.- Determinación del pH.....	37
2.5.4.5.- Determinación de sólidos totales	37
2.5.5.- Obtención del extracto liofilizado	37
2.5.6.- Cuantificación de fenoles totales	37
2.5.7.- Cuantificación de flavonoides totales	38
2.5.8.- Ensayo Antioxidante	39
2.5.9.- Ensayo Antiinflamatorio	39
CAPÍTULO III	40
3.- MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	40
3.1.- Parámetros de control de calidad de la droga cruda de hojas y flores de <i>Tropaeolum majus</i>	40
3.2.- Tamizaje Fitoquímico.	41
3.3.- Parámetros de calidad del extracto	46
3.4.- Cuantificación de Fenoles Totales	47
3.5.- Cuantificación de flavonoides totales	48
3.6.- Ensayo de Actividad Antioxidante	49
3.7.- Ensayo de la Actividad Antiinflamatoria	50
CONCLUSIONES	56
RECOMENDACIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Taxonomía de <i>Tropaeolum majus</i>	6
Tabla 2-1. Mediadores de la inflamación	13
Tabla 3-1. Clasificación de los AINE según su estructura química	18
Tabla 4-1. Clasificación de los AINE según vida media plasmática.	18
Tabla 5-1. Fenoles comunes en plantas medicinales y sus propiedades.. ..	21
Tabla 6-1. Flavonoides comunes en plantas medicinales y sus propiedades.. ..	21
Tabla 1-2. Descripción del Tipo de Material usado en la investigación.	28
Tabla 2-2. Descripción del Material de laboratorio usado en la investigación.	28
Tabla 3-2. Descripción de los Equipos de laboratorio usado en la investigación.. ..	29
Tabla 4-2. Descripción de los Reactivos usados en la investigación.	30
Tabla 1-3. Resultados de los parámetros de calidad.. ..	41
Tabla 2-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de <i>Tropaeolum majus</i>	42
Tabla 3-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de flores de <i>Tropaeolum majus</i>	43
Tabla 4-3. Parámetros de calidad del extracto de hojas y flores de <i>Tropaeolum majus</i>	47
Tabla 5-3. Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría.. ..	48
Tabla 6-3. Cuantificación de flavonoides por espectrofotometría... ..	49
Tabla 7-3. Resultados del IC ₅₀	50
Tabla 8-3. Porcentaje de inhibición de la inflamación de muestras de hojas y flores de <i>Tropaeolum majus</i> a diferentes concentraciones... ..	51
Tabla 9-3. Porcentaje de inhibición de la inflamación de muestras de Aspirina a diferentes concentraciones... ..	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Especie <i>Tropaeolum majus</i>	5
Figura 2-1. Fases en que se lleva a cabo el proceso inflamatorio.	16
Figura 3-1. Mecanismo de acción antiinflamatoria producida por el WST-1	25
Figura 4-1. Mecanismo de acción del DPPH´	26
Figura 1-2. Protocolo de tamizaje fitoquímico.	35
Figura 2-2. Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.....	35
Figura 3-2. Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico	36
Figura 4-2. Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.	36
Figura 5-2. Fundamento de la reacción de Folin Ciocalteu.	38
Figura 6-2. Fundamento de la reacción de Tricloruro de Aluminio.....	39

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3. Porcentaje de inhibición de la inflamación obtenida de flores y hojas de <i>Tropaeolum majus</i> a diferentes concentraciones frente a la aspirina.....	52
Gráfico 2-3. Media de porcentaje de inhibición de la inflamación obtenida de flores y hojas de <i>Tropaeolum majus</i>	54
Gráfico 3-3. Media de porcentaje de inhibición de la inflamación obtenida de flores y hojas de <i>Tropaeolum majus</i> , comparada con Aspirina a 200 ppm.....	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Localización, y proceso de secado de hojas y flores de *Tropaeolum majus*. (Gráfico 1A Lugar de Recolección) y (Gráfico 2A Secado de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.)

Anexo B. Hojas y flores secas de *Tropaeolum majus* obtenidas de los extractos (Gráfico 1B Extracto Etéreo), (Gráfico 2B Extracto alcohólico) y (Gráfico 3B Extracto acuoso).

Anexo C. Extractos de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* (Gráfico 1C Extracto Etéreo), (Gráfico 2C Extracto alcohólico) y (Gráfico 3C. Extracto acuoso)

Anexo D. Tamizaje Fitoquímico de las Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* del Extracto Etéreo. (Gráfico 1D Hojas de *Tropaeolum majus* del Extracto Etéreo), (Gráfico 2D Flores de *Tropaeolum majus* del Extracto Etéreo), (Gráfico 3D Hojas de *Tropaeolum majus* del Extracto Alcohólico), (Gráfico 4D Flores de *Tropaeolum majus* del Extracto Alcohólico), (Gráfico 5D Hojas de *Tropaeolum majus* del Extracto Acuoso) y (Gráfico 6D Flores de *Tropaeolum majus* del Extracto Acuoso).

Anexo E. Determinación de la Humedad de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*. (Gráfico 1E Muestras para la Determinación de la Humedad), y (Gráfico 2E Peso de las muestras de Humedad de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*).

Anexo F. Determinación de Cenizas Totales, Solubles e Insolubles, (Gráfico F1 Calcinación de Muestras de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*) y (Gráfico F2 Determinación de Cenizas Totales de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*), (Gráfico F3 Cenizas Solubles e Insolubles de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*).

Anexo G. Extractos Hidroalcohólicos de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*. (Gráfico G1 Extractos Hidroalcohólicos), y (Gráfico G2 Determinación de la Densidad Relativa de los Extractos Hidroalcohólicos)

Anexo H. Liofilización de los Extractos Hidroalcohólicos. (Gráfico H1 Proceso de Liofilizado), y (Gráfico H2 Extracto Hidroalcohólico de Flores de *Tropaeolum majus* Liofilizado.)

Anexo I. Soluciones de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* para determinación de Fenoles y Flavonoides. (Gráfico 1I soluciones madres), (Gráfico 2I Curva de calibración de ácido gálico)

utilizada para la cuantificación de fenoles totales) y (Gráfico 3I Curva de calibración de quercetina utilizada para la cuantificación de flavonoides).

Anexo J. Determinación de Capacidad Antioxidante de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* para Gráfico 1J Soluciones Madres. (Tabla 1J Captación de DPPH % de Hojas de *Tropaeolum majus*, (Tabla 2J Captación de DPPH % de Flores de *Tropaeolum majus*).

Anexo K. Ensayo de la Actividad Antiinflamatoria de *Tropaeolum majus*. (Gráfico 1K Muestras de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina a diferentes concentraciones), (Gráfico 2K Muestras previo a la Incubación), (Gráfico 3K Muestras posterior a la Incubación) y (Gráfico 4K Equipo de Lectura de Absorbancias).

Anexo L. Pruebas de Normalidad para los datos obtenidos de hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Ácido Acetilsalicílico. (Gráfico 1L Prueba de Normalidad de hojas y flores de *Tropaeolum majus*) y (Gráfico 2L Prueba de Normalidad de hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina)

Anexo M. Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos.(Gráfico 1M. Prueba de Homogeneidad de Varianzas de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.) y (Gráfico 2M. Prueba de Homogeneidad de Varianzas de hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina)

Anexo N. Prueba de ANOVA de los datos. (Gráfico 1N. Prueba de ANOVA de hojas y flores de *Tropaeolum majus*) y (Gráfico 2N. Prueba de Homogeneidad de Varianzas de hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina.)

Anexo O. Prueba Post Hoc (TUKEY) para hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina. (Gráfico 1O Descriptivos de la Prueba Tukey.), (Gráfico 2O Comparaciones múltiples entre los grupos.), (Gráfico 3O Subconjuntos Homogéneos) y (Gráfico 4O Gráfico de Medias).

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores de capuchina (*Tropaeolum majus*). Una vez recolectadas las hojas y las flores se secaron y trituraron por separado. Para obtener los extractos, hojas y flores se maceraron con etanol al 70% v/v, y finalmente se concentraron en evaporador rotatorio en condiciones controladas, para posteriormente liofilizar los residuos, y obtener así los extractos hidroalcohólicos. Se cuantificó los flavonoides espectrofotométricamente a través del método del Tricloruro de Aluminio, obteniendo los siguientes resultados: 16817,714± 94,026 mg Eq Q/g de extracto liofilizado para hojas y 14418,286± 188,051 mg Eq Q/g de extracto liofilizado para flores. La determinación de fenoles se realizó por el método de Folin-Ciocalteu arrojando los resultados de 11877,778± 192,450 mg Eq GAE/g de extracto liofilizado de hojas y 4438,889± 96,225 mg Eq GAE/g de extracto liofilizado de flores. Los extractos presentaron una capacidad captadora de radicales libres a una IC₅₀ de 501,69 µg/ml con un rango que va de 354,55 - 723,87 µg/ml para las hojas y 11119,35 µg/ml con un rango entre 6985,69 - 18701,46 µg/ml para las flores, ambos evaluados por el método de DPPH[·]. El ensayo de actividad antiinflamatoria se llevó a cabo por el método *in vitro* de neutrófilos aislados, por medio de la determinación de una sal de tetrazolio estable (WST-1). Las hojas de *Tropaeolum majus*, presentaron actividad antiinflamatoria a una IC₅₀ de 835,04 µg/ml con un rango que va de 743,97 - 943,01 µg/ml, siendo más activas que las flores que mostraron un resultado de 1763,89 µg/ml con un rango entre 1436,83 - 2242,68 µg/ml. La concentración de 1000 ppm presentó mejor porcentaje de inhibición inflamatoria para hojas con 52,98% ± 1,35, mientras que para flores fue de 36,19% ± 2,41. Sin embargo, estos porcentajes son menores en comparación con el ácido acetilsalicílico usado como referencia que a 200 ppm presentó 68,88% ± 3,90. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Palabras clave: <CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES>, <BIOQUÍMICA>, <CAPUCHINA (*Tropaeolum majus*)>, <SAL DE TETRAZOLIO (WST-1)>, <ASPIRINA>, <DPPH>, <INHIBICIÓN DE INFLAMACIÓN>, <ANTIOXIDANTE>.

SUMMARY

The main objective was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activity in vitro of the hydroalcoholic extracts of leaves and flowers of nasturtium (*Tropaeolum majus*). Once the leaves and flowers were collected, they were dried and crushed separately. For obtaining the extracts, leaves, and flowers were macerated with 70% v/v ethanol, and finally, they were concentrated in a rotary evaporator under controlled conditions, so subsequently lyophilize the waste, and to obtain the hydroalcoholic extracts. The flavonoids were quantified spectrophotometrically through the Aluminum Trichloride method, obtaining the following results: $16817,714 \pm 94,026$ mg Eq Q/g of lyophilized extract for leaves and $14418,286 \pm 188,051$ mg Eq Q/g of lyophilized extract for flowers. The determination of phenols was performed by the Folin-Ciocalteu method showing the results of $11877,778 \pm 192,450$ mg Eq GAE/g of a lyophilized extract of leaves and $4438,889 \pm 96,225$ mg Eq GAE/g of a lyophilized extract of flowers. The extracts presented a free radical scavenging capacity at an IC_{50} of 501,69 $\mu\text{g/ml}$ with a range of 354,55 – 723,87 $\mu\text{g / ml}$ for the leaves and 11119,35 $\mu\text{g/ml}$ with a range between 6985,69 – 18701,46 $\mu\text{g/ml}$ for flowers, both evaluated by the DPPH method. The anti-inflammatory activity test was carried out by the in vitro method of isolated neutrophils, by means of the determination of a stable tetrazolium salt (WST-1). The leaves of *Tropaeolum majus* presented anti-inflammatory activity at an IC_{50} of 835,04 $\mu\text{g/ml}$ with a range from 743,97 – 943,01 $\mu\text{g / ml}$, being more active than the flowers that showed a result of 1763,89 $\mu\text{g/ml}$ with a range between 1436,83 – 2242,68 $\mu\text{g / ml}$. The concentration of 1000 ppm showed a better percentage of inflammatory inhibition for leaves with $52,98\% \pm 1,35$, while for flowers it was $36,19\% \pm 2,41$. However, these percentages are lower compared to the acetylsalicylic acid used as a reference, which at 200 ppm showed $68,88\% \pm 3,90$. The tests were carried out in triplicate.

Keywords: <EXACT AND NATURAL SCIENCES>, <BIOCHEMISTRY>, <CAPUCHINE (*Tropaeolum majus*)>, <TETRAZOLIAN SALT (WST-1)>, <ASPIRIN>, <DPPH>, <INFLAMMATION INHIBITION>, <ANTIOXIDANT>.

INTRODUCCIÓN

El Ecuador es considerado uno de los países más biodiversos del planeta, debido a la gran cantidad de flora y fauna que presenta por kilómetro cuadrado. Y es justamente, la variedad biológica de las especies vegetales, lo que les permite poseer una multiplicidad de metabolitos secundarios. La ubicación territorial también influye en la cantidad y tipo de compuestos que contienen.

El país posee gran variedad climática, esto se debe a la influencia de la cordillera de los Andes, el Océano Pacífico y la selva Amazónica, dando lugar a una serie de climas, subclimas y microclimas a lo largo de todo el territorio (INOCAR, 2012, Inocar.mil.ec).

Aproximadamente 80% de la población ecuatoriana aprovecha las diferentes especies vegetales con fines alimenticios, ornamentales y medicinales. Cada día aumenta la cifra de personas que usan plantas para mejorar su salud, debido a la facilidad de acceso y al valor económico considerablemente menor a la medicina sintética (Butrón X, 2004a: p.136).

Hoy en día la búsqueda de plantas con efectos antiinflamatorios suscita un gran interés para los investigadores, la razón es encontrar drogas vegetales con actividad biológica pero que causen el menor número de efectos adversos, respecto a los principios activos sintéticos. (López, 2003a, p.118).

El conocimiento etnobotánico de las poblaciones indígenas es fundamental para iniciar el estudio de diferentes especies vegetales, que han sido usadas desde hace miles de años para tratar dolencias. La comprobación de los efectos biológicos serviría para determinar principios activos, y así sintetizar compuestos específicos. De esta manera en un futuro, el país podría auto sustentar la demanda de medicamentos requeridos por la población, mejorando el nivel y la calidad de vida de los pacientes.

Estudios de este tipo han permitido el desarrollo de nuevos principios activos a base de plantas, que han sido y pueden seguir siendo usados por la industria farmacéutica; un campo que está en expansión. Latinoamérica una de las regiones más ricas en biodiversidad del planeta, ha aportado con recursos naturales para el descubrimiento de sustancias tales como: la quinina utilizada para tratar el paludismo, el ácido acetilsalicílico fármaco antiinflamatorio más usado desde finales del S. XIX, los corticoides, obtenidos en los años cuarenta de las vísceras de los animales y de la planta de verbasco son potentes antiinflamatorios, además de muchas otras plantas que están siendo investigadas actualmente para tratar enfermedades graves como el cáncer o el SIDA (Butrón X, 2004b: p.136).

Según el INEC (2013), entre las primeras 298 causas de ingresos hospitalarios se encuentran varios tipos de enfermedades inflamatorias como: enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central, artritis reumatoide y otras poliartropatías inflamatorias, enfermedad inflamatoria del cuello uterino, hepatitis, inflamación del párpado. Algunas otras patologías como enfermedades reumáticas, neoplásicas, infecciones, gota, dermatitis, colitis y neuropatías etc., vienen acompañadas por una respuesta inflamatoria definida como una reacción fisiopatológica fundamental y normal en el organismo producida por diversos estímulos o agresiones que pueden ser aisladas como un traumatismo (Rodríguez, 2008a: p. 77).

El proceso inflamatorio patológico (eritema, calor, hinchazón, dolor y pérdida funcional), presenta un grave problema social y económico para la población en general. El dolor afecta a la vida diaria de las personas limitando la ejecución de tareas básicas y sencillas, como por ejemplo levantar objetos, subir escaleras, caminar, correr, sentarse e incluso permanecer quieto, desembocando en pérdidas laborales y afectación de su economía (Rodríguez, 2008b: p. 77).

“Entre los fármacos capaces de reducir los signos y síntomas de la inflamación se encuentran los AINES y los glucocorticoides” (Rodríguez, 2008c: p. 77). El uso indiscriminado de estos medicamentos, ha potenciado la presencia de efectos y reacciones adversas, por lo que la investigación de nuevos principios activos a base de plantas podría permitir un tratamiento más eficiente y una reducción de los efectos adversos.

Esto ha elevado el interés científico principalmente en el área de la farmacología, en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos presentes en las plantas, de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios (Gómez Estrada et al., 2011a: pp. 190-197) efecto que ha justificado investigaciones en especies tales como *Euphorbia peplis*, *Bryophyllum pinnatum*, *Clerodendron serratum*, *Cedrus deodara*, *Urera baccifera* y *Oreocallis grandiflora* (Boeris et al. 2004).

Diversas investigaciones han demostrado que, algunos metabolitos secundarios presentes en las plantas, entre los que podemos mencionar a flavonoides y fenoles, han sido capaces de inhibir una serie de enzimas que se activan en el curso del proceso inflamatorio (González, 2007: p. 3).

Tropaeolum majus conocida vulgarmente como capuchina ha sido utilizada en medicina por su capacidad antioxidante, para el correcto funcionamiento del corazón, para desinfectar las heridas favoreciendo su curación y cicatrización, se ha empleado además como alimento; se han realizado estudios que han comprobado la actividad diurética, sin embargo son escasos los estudios farmacológicos o *in vitro* que hayan evaluado el potencial antiinflamatorio (Espinoza et al., 2013a: p.60).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tropaeolum majus*

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de los principales metabolitos secundarios en los extractos etanólico, etéreo y acuoso de las hojas y flores de *Tropaeolum majus* mediante tamizaje fitoquímico.
2. Establecer la cantidad de flavonoides y fenoles presentes en el extracto hidroalcohólico tanto de hojas y flores de *Tropaeolum majus* usando un método espectrofotométrico.
3. Evaluar la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Tropaeolum majus* mediante el ensayo de DPPH[·].
4. Comprobar el grado de actividad antiinflamatoria de hojas y flores de *Tropaeolum majus* mediante la disminución de la formación de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido) expresada como porcentaje de inhibición inflamatoria.

CAPÍTULO I

1.- MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1.- La Biodiversidad Ecuatoriana

El término biodiversidad fue expresado por primera vez por Edward O. Wilson, en el primer foro de diversidad biológica organizado en 1986 por el National Research Council of America (NRC), para referirse al conjunto de organismos que existen en una región.

Por biodiversidad se entiende la cantidad, variedad y variabilidad de organismos vivos que habitan los ecosistemas terrestres, marinos y otros ecosistemas acuáticos, así como las complejas relaciones ecológicas que se establecen entre ellos; incluyendo la diversidad dentro de una especie (diversidad genética), entre distintas especies (diversidad de especies) y entre ecosistemas (CDB, 1992, p.94), (López et al., 2012, p.93-96).

Ecuador; a pesar de su tamaño; es considerado como “campeón” de la biodiversidad, debido a varias causas, que se remontan desde los inicios mismo del planeta. La razón principal para tan alta cantidad de especies animales y vegetales, en un espacio territorial tan reducido es su posición tropical que permite un clima más o menos estable a lo largo de todo el año (Mena, 2011a, p.26).

De igual forma la de la Cordillera de los Andes, proporciona una gran cantidad de pisos climáticos, similar a una escalera en la que cada peldaño presenta condiciones diferentes que potencian el desarrollo de determinadas especies (Mena, 2011b, p.26).

Todo lo anteriormente mencionado sumado a las corrientes marinas del litoral, que generan un clima seco en el sur del país y en Galápagos y húmedo al norte, permiten que el país tenga alrededor de un décimo de todas las especies vegetales del mundo (Mena, 2011c, p.26).

La Constitución de Montecristi y el Plan Nacional del Buen Vivir señalan que los ecuatorianos deben proteger toda la biodiversidad existente en el país, como se menciona en la primera Estrategia Nacional de Biodiversidad 2001-2010 en donde se menciona que “...la biodiversidad es un recurso estratégico para el desarrollo humano sustentable del Ecuador y constituye una oportunidad aprender a conocerla, respetarla y utilizarla sustentablemente” (MAE, 2001, pp.30-35).

Debido a esto, la biodiversidad del país es considerada como un recurso estratégico para el desarrollo y bienestar de los ecuatorianos, por medio del fomento de la investigación se permitiría la producción de nuevos productos con potencial en distintos campos biotecnológicos, agricultura, medicina, etc. (Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030, 2016, pp.72-75).

1.2.- *Tropaeolum majus*



Figura 1-1. Especie *Tropaeolum majus*

Fuente: (Heirloom and Perennial, 2018, <https://www.foodforests.eu>)

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018

Tropaeolum majus L. (*Tropaeolaceae*) se conoce como capuchina, berro indio, alcaparras, semillas de lombriz, bálsamo de jardín, flor sangrienta, berro mexicano y gran capuchina (Corrêa 1926, p.23), (Font Quer 1993, p.15), (Dematti y Coan 1999, p.2).

Esta especie es ampliamente utilizada como planta medicinal y ornamental; es durable, melífero, se usa como tinte natural, como hierba no convencional para cocinar, y tiene una enorme importancia para la apicultura comercial (Ortiz de Boada y Cogua 1989, p.78).

Debido a la belleza de sus flores y hojas, se usa en proyectos de paisajismo (Bremness, 1993, p.85) y para un uso alimenticio, con sus hojas y flores siendo utilizadas en ensaladas y sándwiches (Sangalli et al., 2004, p.3).

1.2.1.- Distribución y Hábitat.

La familia *Tropaeolaceae* se encuentra desde el sudeste de México hasta la región extratropical templada de Chile, raramente son encontradas en bosques de tierras bajas tropicales. Las especies de *Tropaeolum*, son mayormente de distribución Andina, extendidas principalmente por Colombia, Ecuador y Perú (Universidad de la República, 2011, thecompositaehut.com).

La especie *Tropaeolum majus*, probablemente es nativa de América del Sur, vive en lugares iluminados y en suelos bien drenados, de manera silvestre en las vertientes occidentales andinas, así como en jardines, campos agrícolas y matorrales en los que ha intervenido el hombre. Fue introducida en España durante el siglo XVI desde Ecuador, Perú y Colombia, donde los indios la usaban para curar heridas. Es adaptable a cualquier tipo de suelo y de clima, se reproduce tanto sexual como asexualmente al romperse ramas de la planta, por estas razones es muy invasiva e incluso peligrosa para determinados ecosistemas, florece durante casi todo el año (Asturnatura, 2016a, asturnatura.com).

1.2.2.- Taxonomía

Tabla 1-1. Taxonomía de *Tropaeolum majus*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnolipsida
Orden	Geraniales
Familia	Tropaeolaceae
Género	<i>Tropaeolum</i>
Especie	<i>majus</i>
Nombres vulgares	capuchina, berro indio, alcaparras, semillas de lombriz, bálsamo de jardín, flor sangrienta, berro mexicano y gran capuchina

Fuente: (PERÚ ECOLÓGICO, 2000).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

1.2.3.- Descripción Taxonómica

Terófito anual o perenne, de tallo delgado, postrado o trepador por medio de los pecíolos foliares que actúan como zarcillos. Hojas alternas, con limbo de nerviación orbicular o ligeramente anguloso, de 4-15 cm, peltadas. Flores grandes, 3-6 cm de diámetro, zigomorfas, con largos pedúnculos, solitarios en las axilas de las hojas. Corola pentámera de pétalos libres,

grandes, amarillos o anaranjados hasta casi rojos. Androceo con 8 estambres y gineceo con ovario súpero trilobular con un primordio seminal en cada lóculo, que forma un esquizocarpo en la fructificación. Florece durante la primavera y el verano (Asturnatura, 2016b, asturnatura.com).

1.2.4.- Usos Tradicionales

Tradicionalmente los nativos de la zona andina colocaban una hoja de “capuchina” en las heridas con la intención de cicatrizarlas y desinfectarlas. Cuando la planta fue introducida al viejo mundo, empezó a ser cultivada en varios jardines con fines principalmente ornamentales, no fue sino hasta que el holandés Bewerning en 1684 aconsejó usarla como verdura y condimento (Plantas Morenal, 2016, <http://plantasmorenal.blogspot.com>).

En el Ecuador el uso de esta planta tanto medicinal como alimentario, no está muy bien documentado, sin embargo, según Balslev et al., (2008, pp.67-69), muchas de las hierbas y condimentos que forman parte habitual de la alimentación en todas las regiones del Ecuador son especies introducidas, cultivadas y a veces comercializadas, entre las que se cuenta *Tropaeolum majus*, que se añade comúnmente en la preparación de distintos tipos de sopas y platos preparados con carne, pescado y verduras.

Comúnmente, la población utiliza esta planta para los estados gripales, inflamación de garganta; e infección urinaria, en forma de infusión en la cual 1 cucharada del vegetal se coloca en 1 litro de agua recién hervida, se bebe 1 taza 3 veces en el día. De modo externo se usa para heridas, lesiones de la piel y moretones, además para la caída del cabello. La hoja fresca machacada se usa como cataplasma en hematomas y moretones (Ministerio de Salud de Chile, 2009, pp.69-70).

1.2.5.- Actividades Biológicas comprobadas

Varios estudios experimentales han sido llevados a cabo con *Tropaeolum majus*. DeMedeiros et al. (2000, p.9) informan de la actividad antitrombina de cloruro de metileno y extractos de metanol preparados a partir de las hojas de *Tropaeolum majus*.

Binet (1994, p.5) observa que el isotiocianato de bencilo, detectado en la planta, tiene un efecto antibiótico sobre las infecciones del tracto urinario, lo que se confirma con el estudio de Goos et al. (2006, p.8) en el cual emplean un producto preparado, comercializado y que contiene *Tropaeolum majus* para tratar la infección del tracto urinario.

Pintão et al. (1995, p.234) han demostrado que el glucosinolato de bencilo presente en *Tropaeolum majus* presenta además efecto anticancerígeno *in vitro* contra una variedad de líneas de células tumorales humanas y murinas. Picciarelli et al. (1984, p.75) y Picciarelli y Alpi (1987, p.85)

informan que las cucurbitacinas triterpénicas propias de la especie vegetal son responsables de las actividades antineoplásicas.

El extracto de *Tropaeolum majus* exhibe importantes propiedades diuréticas *in vivo* (Gasparotto Junior et al., 2009a, p.24), en cuanto a las actividades cardiovasculares potenciales, experimentos *in vitro* han demostrado actividad inhibidora de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE) (Han et al., 1991, p.34).

Aunque los estudios farmacológicos evidencian el potencial efecto terapéutico de *Tropaeolum majus*, solo dos estudios de toxicidad aguda fueron conducido con esta planta. En uno de estos estudios, los ratones recibieron dosis hasta de 5000 mg / kg de extractos etanólicos o acuosos de *Tropaeolum majus* y no presentaron signos de toxicidad aguda (Zanetti et al., 2003, p.43).

Resultados similares se encontraron en un estudio, donde no se hallaron signos de toxicidad aguda en ratas machos y hembras, después de la administración de Extracto Hidroalcohólico por vía oral (5000 mg / kg) o por vía intraperitoneal (1000 y 3000 mg / kg) (Gasparotto Junior et al., 2009b, p.26).

1.3.- La Inflamación

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas (Bordes et al., 2014a, p.1).

Entre los aspectos básicos de este proceso, se encuentran la focalización de la zona afectada para limitar el radio de acción del proceso. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, urgente y por lo tanto en su mayor parte inespecífica, aunque puede ser el punto de partida para una acción específica posterior. En último lugar se desencadenará la llegada de células inmunes desde los tejidos cercanos y las alteraciones vasculares permiten la llegada de moléculas inmunes a la sangre (Bordes et al., 2014b, p.1).

En la inflamación de forma clásica se considera las 4 fases de Celso: Calor, Rubor, Tumor y Dolor. Las primeras dos son producidas por alteraciones vasculares, el tumor es provocado por el edema y el dolor por diversos mediadores celulares (Bordes et al., 2014c, p.1).

1.3.1.- Fases de la Inflamación

Esquemáticamente se puede dividir la inflamación en las siguientes etapas:

1- Liberación de mediadores. Moléculas sintetizadas o liberadas por el mastocito, por la presencia de determinados estímulos, la mayor parte de dichas moléculas son de estructura elemental (Bordes et al., 2014d, p.1).

2- Efecto de los mediadores. Cuando estas moléculas se liberan son las encargadas de producir alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que permiten la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio (Bordes et al., 2014e, p.1).

3- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco (Bordes et al., 2014f, p.1).

4- Regulación del proceso inflamatorio. El proceso consta de una serie de mecanismos inhibidores que finalizan o equilibran la inflamación, este rasgo es común en la mayoría de las respuestas inmunes (Bordes et al., 2014g, p.1).

5- Reparación. Consta de la fase formada por fenómenos que van a reparar total o parcialmente el tejido afectado por el agente agresor o por el propio proceso inflamatorio (Bordes et al., 2014h, p.1).

1.3.2.- Tipos de Inflamación

La inflamación puede clasificarse en base a varios criterios: tiempo de duración, carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización: (Villalba, 2014a: p.2261-2265).

1.3.2.1.- Por el tiempo de duración

- a) Agudas: Se trata de una respuesta inflamatoria inmediata al agente que lo produce y que tiene como objetivo liberar mediadores de defensa del organismo en el área afectada cuyo comienzo es rápido y cursa una duración corta (Villalba, 2014b: p.2261-2265).
- b) Crónicas: Se trata de un mecanismo extendido, que provoca destrucción tisular, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación (Villalba, 2014c: p.2261-2265).

1.3.2.2.- Por el carácter del exudado

- a) El primero se trata de líquido extravascular con bajo contenido proteico, como consecuencia de un ligero cambio en la permeabilidad vascular (Villalba, 2014d: p.2261-2265).

- b) Exudado, Trasudado: Se trata de un líquido inflamatorio extravascular con alto contenido proteico, provocando aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Villalba, 2014e: p.2261-2265).

1.3.2.3.- Por su etiología

- a) Infecciosas: Causada por bacterias, virus, parásitos o por toxinas microbianas (Villalba, 2014f: p.2261-2265).
- b) Traumáticas producto de golpes intensos con respuesta inmediata o tardía, como ocurre con los esguinces (Villalba, 2014g: p.2261-2265).
- c) Térmicas resultantes de, quemaduras por calor o congelamiento (Villalba, 2014h: p.2261-2265).
- d) Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad, a alérgenos comunes o procesos colagenopáticos (Villalba, 2014i: p.2261-2265).

1.3.2.4.- Por sus características morfológicas

- a) Serosa: por acúmulo de líquido tisular de bajo contenido proteico (Villalba, 2014j: p.2261-2265).
- b) Fibrinosa: Con presencia de exudado con grandes cantidades de fibrinógeno (Villalba, 2014k: p.2261-2265).
- c) Supurativa o purulenta: se caracteriza por la producción de exudados purulentos que consta de leucocitos y células necróticas (Villalba, 2014l: p.2261-2265).
- d) Abscesos: presenta tejido inflamatorio purulento acompañado de necrosis licuefactiva (Villalba, 2014m: p.2261-2265).
- e) Úlceras: Producidas por esfacelamiento de tejido necrótico (Villalba, 2014n: p.2261-2265).

1.3.2.5.- Por su localización

- a) Focales: De localización en zonas y órganos específicos, en cuyo caso se utiliza el sufijo – itis, por ejemplo, faringitis, otitis, laringitis, conjuntivitis, peritonitis (Villalba, 2014o: p.2261-2265).
- b) Diseminados: Resultado de la propagación de procesos inflamatorios persistentes ya sea por fistulización o metástasis (Villalba, 2014p: p.2261-2265).

1.3.3.- Mediadores de la Respuesta Inflamatoria

1.3.3.1.- Liberación de Mediadores. El Mastocito

Todos los tejidos atacados por un agente agresor, liberan mediadores de la inflamación, que tienen su génesis en el mastocito, una célula inmune inespecífica que también procede de la médula ósea, y que posee gránulos que contienen mediadores de la inflamación preformados, aunque los mecanismos de su diferenciación no son bien conocidos. Cuando se activa, son liberados, junto con otros de carácter lipídico que son sintetizados de novo. El mastocito es detectado en casi todos los tejidos, especialmente alrededor de los vasos pequeños sobre los que actúan dichos mediadores (Gallin, 1989a, pp.721-733), (Ishizaka, 1984a, p.245-256), (Roit, 1992a, p.45).

La causa más común de la liberación de los mediadores es la lesión directa a la célula, aunque no es la única. La acumulación en el lugar de la infección de suficientes factores activados del complemento, el C3a y el C5a, actuando sobre receptores de membrana, inducen la activación del mastocito y la consiguiente liberación de los mediadores (Ishizaka, 1984b, p.245-256).

Existe otro mecanismo de activación a través de la captación de la IgE en la membrana del mastocito, el cual tiene receptores para la porción Fc de dicha inmunoglobulina (FcεR). El mastocito se activa cuando conecta con dos IgE contiguas sobre su membrana (Koo et al., 1989a, p.191).

Los mecanismos bioquímicos que determinan dicho proceso no son bien conocidos, aunque se cree que todo el mecanismo se inicia en la membrana con activación de adenilato-ciclase y de fosfolipasa A2. La adenilato-ciclase aumenta inicialmente la concentración intracitoplasmática de cAMP, mientras que la fosfolipasa ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico (Martínez, 1992a, p.567), (David et al., 1984a, p.335).

Esta serie de activaciones bioquímicas aumenta la permeabilidad de membrana al Ca⁺⁺, produciendo un incremento de su concentración en el citoplasma. (Martínez, 1992b, p.567). El incremento de la concentración tanto de Ca⁺⁺ y de cAMP desemboca en la creación de microtúbulos en el mastocito, además del movimiento de gránulos citoplasmáticos hacia la membrana celular, produciéndose la fusión con ésta y libera mediadores al espacio extracelular. Estos mediadores, que se encuentran preformados en los gránulos, son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo (ECF-A, eosinophil chemotactic factor), factor quimiotáctico del neutrófilo (NCF, neutrophil chemotactic factor) y heparina (Ishizaka, 1984c, pp.245-256).

El ácido araquidónico formado puede seguir dos vías metabólicas, la de la enzima ciclooxigenasa que determina la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos y la de la

lipooxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos (LT). (Martínez, 1992c, p.568). Todas estas sustancias de carácter lipídico, sintetizadas de novo por el mastocito, son un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación (Bordes et al., 2014i, p.1).

El basófilo es una célula principalmente sanguínea que se dirige a los tejidos inflamados y constituye un apoyo para la liberación de los mediadores, pues se activa por los mismos mecanismos que los mastocitos y libera mediadores muy similares a éste (Roit, 1992b, p.45).

1.3.4.- Efectos de los Mediadores

1.3.4.1.- Mediadores preformados

1. Histamina. Es un mediador que se halla distribuido por todo el cuerpo, aunque se lo ubica principalmente en el mastocito y basófilo. Se obtiene por la descarboxilación del aminoácido histidina. Al actuar sobre los receptores de histamina 1 (H_1) de los vasos produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad. Cuando actúa sobre los receptores de histamina 2 (H_2) tiene una función regulatoria o inhibitoria de la inflamación (Gallin, 1989b, pp.721-733), (Gallin et al., 1988a, pp.845-895).

2. Enzimas proteolíticas. De la variedad de estas enzimas que libera el mastocito, quizás la kininogenasa sea la más interesante, ya que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre, produciendo su ruptura en péptidos más pequeños denominados kininas. Las kininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor (Gallin et al., 1988b, pp.845-895).

3. Factores quimiotácticos. El ECF-A lo conforman dos tetrapéptidos que son los encargados de atraer eosinófilos al foco inflamatorio, provocando además la activación de dichas células. El NCF es una proteína con capacidad de atraer y activar al neutrófilo (Synderman y Pike, 1984a p.287).

4. Heparina. Es la encargada de inhabilitar la coagulación, permitiendo que desde la sangre lleguen moléculas y células. También es un factor de regulación de la inflamación (Bordes et al., 2014j, p.2).

1.3.4.2.- Mediadores sintetizados de novo

1. PGE_2 . Es la prostaglandina más importante y la encargada de producir vasodilatación y dolor. En conjunto con el factor C5a y LTB4 aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos. El efecto de la aspirina, uno de los fármacos más usados en los procesos inflamatorios, es que bloquea la vía de la ciclo-oxigenasa e impide la formación de esta prostaglandina (David et al., 1984b, p.335), (Larsen y Henrison, 1983a, p.385).

2. LTB₄.- Es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos.
3. Factor activador de plaquetas (PAF: Platelets Activating Factor). Tiene varias funciones una de ellas liberar las plaquetas, activarlas y por consiguiente favorecer la llegada de los distintos mediadores a la zona afectada, constituyéndose en el inicio de la coagulación. Produce además, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Es, por otra parte, un potente factor quimiotáctico y activador de neutrófilos (Ishizaka, 1984d, pp.245-256), (Larsen y Henrison, 1983b, p.385).
4. Bradicininas Se forman en las plaquetas y causan contracción de los músculos lisos, aumento de la permeabilidad capilar, dilatación arterial, etc. (Bórdes, 2014k: pp.9-12).
5. Citocinas.- Su acción principal es regular el mecanismo de la inflamación (Bórdes, 2014l: pp.9-12).

Tabla 2-1. Mediadores de la inflamación

Sustancia	Origen	Efecto
Histamina	Mastocitos, células cebadas y basófilos	Flujo sanguíneo incrementado, edema y picazón
Anafilotoxina C3a	Fijación del complemento	Liberación de histamina
Anafilotoxina C5a	Fijación del complemento	Liberación de histamina
Prostaglandinas PGE y PGF	Plaquetas	Edema y dolor
Leucotrienos LTC ₄ y LTD ₄	Monocitos	Edema

Fuente: (García de Lorenzo y Mateos et al., 2013e: p359).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

1.3.5.- Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio

La inflamación puede explicarse de manera cronológica por dos fases, en la que los mediadores participan activamente. En una fase temprana, se provocan alteraciones vasculares que facilitan la llegada de distintas moléculas desde la sangre a la zona de inflamación y la consiguiente formación de edema característico. En la fase tardía, las alteraciones vasculares provocan la llegada de células inmunes desde la sangre o desde los tejidos circundantes (Gallin et al., 1988c, pp.845-895), (Male et al., 1991a, pp220-245), (Roit et al., 1992c, p.45).

1.3.5.1.- Fase inicial. Llegada de moléculas

1. Inmunoglobulinas. Los anticuerpos se unen al agente agresor. La IgM e IgG activan la vía clásica del complemento. Además la IgG se une a los receptores por la porción Fc (FcR), contribuyendo a la fagocitosis (Male et al., 1991b, pp.220-245).
2. Factores del complemento. La vía alterna del complemento es activada por productos liberados por el propio agente agresor. Cuando la vía del complemento se activa por una u otra forma, llega a su vía común provoca la lisis de la célula extraña o agente inductor de la inflamación. Los factores C3a y C5a, activan al mastocito y al basófilo actuando en los receptores de su membrana, liberando los mediadores y aumentando el fenómeno inflamatorio. El C5a es un potente factor quimiotáctico, mientras que el C3b, uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis (Gallin, 1989c, pp.721-733), (Gallin et al., 1988d, pp.845-895).
3. Kininógenos. Sobre estas moléculas actúan las kininogenasas liberadas por el mastocito y basófilo dando lugar a las kininas (Ishizaka, 1984e, pp.235-246).
4. Proteínas de la fase aguda. Una de ellas, es la proteína C Reactiva (PCR) que tiene la capacidad de fijar determinados gérmenes como el neumococo, y de activar el complemento por la vía clásica (Roit et al., 1992d, p.45).
5. Factores de la coagulación.

1.2.5.2.- Fase tardía. Llegada de células

1. Basófilo. Libera a los mediadores en conjunto con el mastocito.
2. Neutrófilo. Es una de las primeras células en llegar a la zona afectada. Se encarga de eliminar el agente agresor a través de la fagocitosis, o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos, provocando la muerte extracelular (Male et al., 1991c, pp.220-245).
3. Monocito/Macrófago. Con origen en la sangre el monocito y en los tejidos próximos el macrófago, llegan de forma tardía al foco de la inflamación. En los tejidos, el monocito se diferencia en macrófago. Dicha célula tiene funciones similares a las del neutrófilo, actuando además como célula presentadora de antígenos a las células específicas T y B, empezando así la respuesta específica (Koo et al., 1989b, p.191), (Synderman y Pike, 1984b, p.287).

La interleucina 1 (IL-1), es un péptido inespecífico sintetizado por el macrófago y que se constituye en una verdadera hormona del Sistema Inmune, ya que actúa con diversos efectos en varias partes del cuerpo una vez que ha pasado a la sangre. Produce fiebre, por la inducción de

la síntesis de PGE en las células endoteliales de los vasos sanguíneos que cubren al hipotálamo; actúa además sobre el centro termorregulador. Es la responsable de la producción y liberación de los neutrófilos en la médula ósea. En el hígado incrementa la síntesis de proteínas de la fase aguda (Gallin, 1989d, pp.721-733), (Male et al., 1991d, pp220-245).

Otra función importante de la IL-1 es la activación de la proliferación y diferenciación de las células responsables de la respuesta específica como lo son las células T y B. Activan la proliferación de fibroblastos y colágeno, esenciales en la fase de reparación de la inflamación (Bórdes, 2014m: pp.9-12).

4. Linfocitos T y B. Las células B tienen su origen en los tejidos linfoides, sintetizan IgE, que se une a mastocitos y basófilos potenciando la inflamación. Por otra parte los linfocitos T producen linfoquinas que prolongan la inflamación cuando se requiere una respuesta más prolongada (Roit et al., 1992e, p.45).

5. Eosinófilo. A pesar de ser una célula citotóxica, en las infecciones parasitarias se cree que tiene una función regulatoria de la inflamación (Bórdes, 2014n: pp.9-12).

1.3.6.- Regulación de la Respuesta Inflamatoria

La regulación del proceso inflamatorio, como cualquier proceso inmune, está delicadamente regulado para; de esta manera, evitar una respuesta exagerada que puede desembocar en un mecanismo perjudicial. Algunos mediadores al variar sus concentraciones pueden provocar la inhibición, modulando de esta forma el proceso inflamatorio. Los siguientes factores intervienen en esta regulación (Gallin, 1989e, pp.721-733), (Male et al., 1991e, pp220-245), (Roit et al., 1992f, p.45).

1. Histamina. Al actuar sobre los receptores H₂, inhibe la liberación de mediadores producidos por el mastocito y el basófilo, además de inhibir la actividad del neutrófilo, la quimiotaxis y activa las células T supresoras (Bórdes, 2014o: pp.9-12).

2. PGE. En células como el mastocito y el basófilo, inhibe la liberación de los mediadores de inflamación, proliferación e impide la llegada de los linfocitos (Bórdes, 2014p: pp.9-12).

3. Agonistas autonómicos. Las células liberadoras de mediadores como lo son el mastocito y el basófilo, poseen receptores α , β -adrenérgicos y colinérgicos, lo que puede dar a suponer que su regulación es autonómica. El receptor β -adrenérgico provoca inhibición de los mediadores, mientras que el α adrenérgico y colinérgico induce la estimulación de los mismos (Bórdes, 2014q: pp.9-12).

4. Heparina. Inhibe la coagulación y la activación de los factores del complemento (Bórdes, 2014r: pp.9-12).

5. Eosinófilo. Esta célula, atraída por el ECF-A, produce una serie de enzimas que degradan ciertos mediadores de la inflamación. La histaminasa actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos y la fosfolipasa sobre el PAF (Larsen y Henrison, 1983c, p.385), (Male et al., 1991f, pp.220-245).

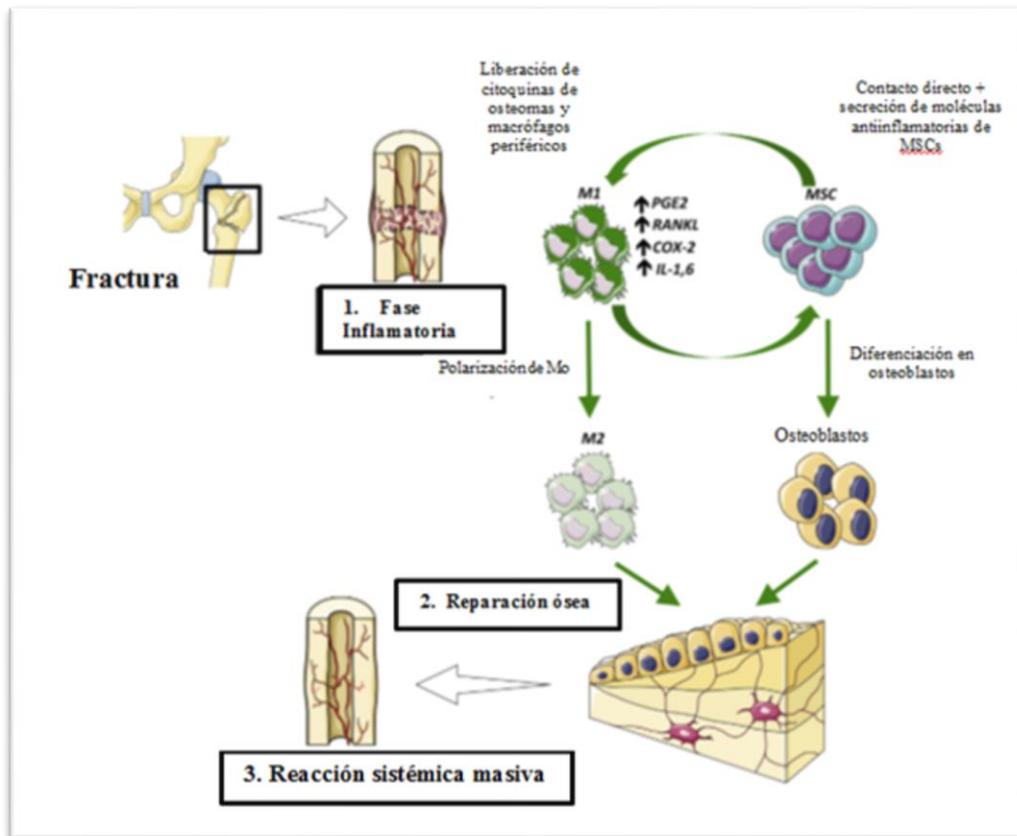


Figura 2-1. Fases en que se lleva a cabo el proceso inflamatorio.

Fuente: (Gibon et al., 2017: p.32).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

1.3.7.- Reparación

Cuando el agente agresor ha sido eliminado por la propia respuesta inflamatoria, se inicia con los procesos de reparación de los tejidos afectados. Estos procesos están constituidos por la llegada de fibroblastos a la zona afectada para sintetizar y proliferar colágeno, células epiteliales y vasos sanguíneos dentro de la herida (Gallin, 1989f, pp.721-733).

Parece ser que la IL-1 es la responsable de la activación de los fibroblastos, aunque esto no ha sido comprobado (Gallin et al., 1988e, pp.845-895).

Si la homeostasis no se reestablece aparece una reacción sistémica masiva en la que las citocinas activan numerosas cascadas humorales de mediadores inflamatorios que perpetúan la

activación del sistema retículo endotelial, provocando pérdida de la integridad microcirculatoria y lesión de diversos órganos (Bórdes, 2014s: pp.9-12).

1.4.- Tratamiento para la Inflamación

1.4.1.- Tratamiento Farmacológico

El tratamiento farmacológico de los procesos inflamatorios abarca diversos grupos de fármacos, entre los que se encuentran los Antiinflamatorios no Esteroideos (AINES), los glucocorticoides, antirreumáticos, y antigotosos, los de uso común (Rodríguez, 2008d, p. 79).

1.4.1.1.- Analgésicos Antiinflamatorios no Esteroideos. (AINES)

Los AINES son un conjunto de fármacos que poseen diversas estructuras químicas pero que comparten como característica común la capacidad de inhibir la ciclooxigenasa (COX), y por lo tanto detienen la producción de prostaglandinas y tromboxanos (Rodríguez, 2008e, p. 79).

Este grupo contiene diversos fármacos de uso común, quizás el más representativo sea el ácido acetilsalicílico, sin embargo, también se puede mencionar a otros como el diclofenaco, fenilbutazona, ibuprofeno, ketorolaco, naproxeno, etc. Todos los anteriores, además de poseer propiedades antiinflamatorias, son antipiréticos y analgésicos. A este grupo también pertenece un fármaco extensamente conocido, el acetaminofén, que se diferencia de los anteriores porque sus propiedades antiinflamatorias son mínimas (Rodríguez, 2008f, p. 79).

Inhiben la prostaglandina-sintetasa, afectando a la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano, que actúan como mediadores de la inflamación. Se conocen 2 isoformas de la enzima COX: COX-1 y COX-2 (Rosas et al., 2008a, p.469).

a) COX-1. Se trata de una enzima constitutiva, encontrada en gran parte de los tejidos. Su función es la de regular proceso como la protección gástrica, agregación plaquetaria, función renal y la homeostasis vascular. Por lo que su inhibición provoca efectos secundarios a todos esos niveles (Rosas et al., 2008b, p.469).

b) COX-2. Esta enzima aparece de forma inducida en estados de inflamación, y no se detecta habitualmente en los tejidos. Es inhibida por todos los AINES y también por los corticoides. Debido a esta razón los AINES selectivos de la COX-2 producen un efecto antiinflamatorio sin las reacciones adversas que provoca inhabilitar la COX-1 (Rosas et al., 2008c, p.469).

Tabla 3-1: Clasificación de los AINE según su estructura química

Grupo Terapéutico	Fármaco
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico, salsalato, diflunisal, fosfosal, acetilato de lisina.
Pirazolonas	Fenilbutazona
Indolacéticos	Indometacina, tolmetín, sulindaco, acemetacina
Arilacéticos	Diclofenaco, aceclofenaco, nabumetona
Arilpropiónicos	Ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, flurbiprofeno
Oxicams y análogos	Piroxicam, tenoxicam, meloxicam
Fenamatos	Ácido mefenámico, meclofenamato
Inhibidores selectivos de la COX-2	Celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib.

Fuente: (Rosas et al., 2008d, p.470).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Tabla 4-1: Clasificación de los AINE según vida media plasmática

Analgésicos	Vida media corta (< 6 horas)	Vida media larga (> 6 horas)
Salicilatos	Ácido acetilsalicílico, salsalato, acetilato de lisina	Diflunisal, fosfosal
Pirazolonas	--	Fenilbutazona
Indolacéticos	Indometacina, tolmetín	Sulindaco
Arilacéticos	Diclofenaco	Aceclofenaco, nabumetona
Arilpropiónicos	Ibuprofeno, ketoprofeno, Flurbiprofeno	Naproxeno
Oxicams y análogos	--	Piroxicam, tenoxicam, meloxicam

Inhibidores selectivos de la COX-2	--	Celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib
------------------------------------	----	------------------------------------

Fuente: (Rosas et al., 2008e, p.470).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

1.4.1.2.- Glucocorticoides

Son un grupo de medicamentos que poseen fuertes propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras. Previenen y suprimen las manifestaciones tanto tempranas como tardías de los procesos inflamatorios. Los dos grupos que más destacan en esta sección son los glucocorticoides de acción intermedia (prednisona, prednisolona, triamcinolona), cuyo efecto persiste por 18 a 36 h, y los de larga duración (betametasona, dexametasona), cuyos efectos pueden persistir de uno a tres días (Rodríguez, 2008g, p.80).

El mecanismo de acción de estos fármacos, se basa en la unión a receptores citosólicos (GR α y GR β); una vez unidos forman el complejo fármaco-receptor, atraviesa la membrana nuclear y se une a sitios específicos en el ADN, así reprimen la transcripción de los genes de la COX, impidiendo la liberación de ácido araquidónico y la formación de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, el traslado de neutrófilos, la permeabilidad capilar, el edema, y la acumulación de mastocitos en los sitios de inflamación, reducen la función de los fibroblastos y de los osteoclastos (Rodríguez, 2008h, pp.80-81).

1.4.2.- Tratamiento no Farmacológico

El tratamiento no farmacológico para la inflamación, consta principalmente de la incorporación de diversas plantas, cuyos efectos han sido conocidos y transmitidos a través de generaciones en distintas culturas a lo largo del planeta, buscando la eliminación de los efectos primarios y secundarios sobre el organismo, como el dolor, el calor y el edema, procesos que se generan de manera natural (López, 2003b, p.118).

1.4.2.1.- Corteza de Sauce

Es una de las plantas principalmente usadas, y cuyo potencial antiinflamatorio se conoce hace siglos. Su característica principal es la de generar ácido salicílico en el organismo y se la obtiene de varias especies del género *Salix*, cuyos metabolitos se transforman en profármacos al interior del cuerpo hasta generar ácido salicílico con acción analgésica, antipirética y antiinflamatoria (López, 2003c, p.118).

1.4.2.2.- Harpagofito

La raíz de esta planta es ampliamente usada en varias partes de Europa y América por sus actividades antiinflamatorias, analgésicas, espasmolíticas, hipolipemiantes, y diurético uricosúrico, siendo los metabolitos secundarios responsables de inhibir prostaglandinas sintetasas, disminuyendo así el dolor considerablemente (López, 2003d, p.118).

1.4.2.3.- Mostaza Negra

Las semillas de esta especie vegetal tienen un efecto rubefaciente importante, que puede disminuir la inflamación considerablemente cuando se aplica por vía tópica, ya que por vía interna es tóxica (López, 2003e, p.118).

1.4.2.4.- Otras plantas de uso común en el Ecuador

El Ecuador con su riqueza tanto botánica como etnofarmacológica posee diversas especies que son usadas por la población para calmar los efectos del proceso inflamatorio, podemos mencionar algunas de las más importantes: achira, tepazan, llantén, ruda, achira, anís estrellado, boldo, borraja, escancel, guayaba, hierbabuena, iso, linaza, manzanilla, matico, pelo de choclo, pino, toronjil (Mazón et al., 1997, plegable s/np).

1.4.2.5.- Otras técnicas comunes

- El uso de hielo en la zona afectada, sobre todo en procesos inflamatorios externos puede resultar de gran ayuda para disminuir el dolor, y el calor generado (Pérez, 2018a, drugs.com).
- Las técnicas de relajación pueden ayudarle a distenderse, aliviar el estrés y disminuir el dolor, provocado por la inflamación (Pérez, 2018b, drugs.com).
- La terapia de la acupuntura usa agujas muy delgadas para equilibrar los canales de energía en el cuerpo. Se cree que esto ayuda a aliviar el dolor y otros síntomas (Pérez, 2018c, drugs.com).

1.5.- Metabolitos Secundarios con Propiedades Antiinflamatorias y Antioxidantes.

1.5.1.- Fenoles

En el reino vegetal, existen varios metabolitos secundarios con distintos núcleos fenólicos, sin embargo, entre ellos se iniciará con los fenoles sencillos, encontrados principalmente en forma de glicósidos. La mayoría de estos compuestos poseen importantes propiedades antiinflamatorias, al poseer la capacidad de inhibir varios mediadores de la inflamación por diversos métodos (Fern et al. 1977a, pp.9-20).

Tabla 5-1: Fenoles comunes en plantas medicinales y sus propiedades.

Fenoles	Propiedades
Pirogalol	Antioxidante, inhibidor de COX – 2
Eugenol	Antioxidante, inhibidor de COX – 2
Ácido cafeico	Antioxidante, inhibe la producción de NO, inhibe la 5 LO, captura peroxinitrito
Ácido cumárico	Antioxidante, inhibe la producción de NO
Ácido ferúlico	Antioxidante, inhibe la producción de NO
Ácido clorogénico	Antioxidante, captura peroxinitrito
Ácido siríngico	Antioxidante
Ácido vainillínico	Antioxidante
Ácido gentísico	Antioxidante, inhibidor de COX - 2
Ácido protocatequínico	Antioxidante,, inhibe NOSi

Fuente: (Fern et al. 1977b, pp.9-20).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

1.5.2.- Flavonoides

Estos metabolitos secundarios se pueden hallar en cualquier especie vegetal mayor y en casi cualquier parte de la planta. La mayoría de flavonoides de origen natural posee alguno de estos doce núcleos: flavona, flavonol, flavanona, flavanonol, isoflavona, catequina, antocianidina, leucoantocianidina, aurona, chalcona, dehidrochalconas y neoflavonas. Todos los anteriores pueden encontrarse en forma de glicósidos (Fern et al. 1977c, pp. 9-20).

Tabla 6-1: Flavonoides comunes en plantas medicinales y sus propiedades.

Flavonoides	Propiedades
Genisteina	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, inhibe la expresión de NOSi, inhibidor de tirosina y serina treoina quinasas.
Apigenina	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, inhibe la expresión de NOSi
Kanferol	Antioxidante, inhibe la COX - 1 inhibe la expresión de COX – 2, inhibe la expresión de NOSi

Biochanina	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, inhibe la expresión de NOSi, inhibidor de tirosín y serína treoina quinasas
Formononetina	Antioxidante, inhibidor de serín treonín quinasas
Luteolina	Antioxidante, inhibidor de tirosín quinasas, inhibe la expresión de NOSi, inhibido de FI3Q
Quercetina	Antioxidante, Inhibe el metabolismo del ácido araquidónico, es inhibidor de FI3Q y FI5Q, inhibe la expresión de NOSi, regula la expresión e MAIC - 1
Hipolaetina	Antioxidante, inhibidor de COX -1 y 5LO
Delfinidina	Antioxidante, inhibe la producción de NO
Miricetina	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, y de NOSi
Rutina	Antioxidante, Inhibe el metabolismo del ácido araquidónico, es inhibidor de FI3Q y FI5Q, inhibe la expresión de NOSi, regula la expresión e MAIC - 1
Miricetina 1 ramnosido	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, y de NOSi
Astilbina	Antioxidante
Hispidulina	Antioxidante
Escutellareina	Antioxidante

Fuente: (Fern et al. 1977d, pp.9-20).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

La quercetina es el flavonoide con actividad antiinflamatoria más representativa, además posee actividad antioxidante, es decir, reduce la formación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO), las ERO son desencadenantes de muchos otros mediadores para la inflamación. Quercetina inhibe la producción del ácido araquidónico, provocando de esta manera su acción analgésica, reduce la concentración de NO, y elimina la segregación de segundos mensajeros de varios mediadores (Fern et al. 1977e, pp.9-20).

1.6.- Algunos Métodos para evaluar la Actividad Antiinflamatoria.

1.6.1.- Sistemas celulares in Vitro y metabolismo del Ácido Araquidónico (AA).

Los receptores ubicados en las membranas de las células fagocíticas, (leucocitos y macrófagos), son activados por la producción y liberación extracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Esta cadena de reacciones bioquímicas se inicia por un aumento en la recaptación de oxígeno, seguida por la reducción de un electrón del oxígeno a superóxido (O_2^-) usando nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato (NADPH) o la ubiquinona oxidoreductasa (NADH) como el donador del electrón, en una reacción catalizada por la oxidasa dependiente de NADPH. Los macrófagos son los encargados del inicio y regulación del proceso inflamatorio, debido a que son responsables de la generación de diversos mediadores biológicos, como prostaglandinas, los cuales tienen numerosos efectos cardiovasculares e inflamatorios (Gómez Estrada et al., 2011a: p.187).

En un proceso inflamatorio, la isoforma inducible de óxido nítrico sintasa (NOS) (iNOS) generan una enorme cantidad de NO, junto a una gran obtención de ROS, lo que podría cambiar la química del NO hacia $ONOO^-$ y anhídrido nitroso (N_2O_3), que son potentes oxidantes, nitrantes y nitrosantes (Gómez Estrada et al., 2011b: p.187).

El análisis del metabolismo de AA puede realizarse a través de dos métodos: los sistemas complejos como la sangre entera y los sistemas simples con uno o dos células en tampones fisiológicos. El primero sería el más cercano a la realidad, pero a su vez el más complejo por la variabilidad en la cantidad y proporción de células presentes en la sangre y el uso de anticoagulantes (Fern et al. 1977f, pp.9-20).

Por contrario el uso de células aisladas tiene la ventaja de poder brindar la estandarización del método, al poder detectar con mayor facilidad el número de células en una determinada cantidad o concentración (Fern et al. 1977g, pp.9-20).

1.6.1.1.- Método de Estimulación

Existen varios compuestos químicos menos fisiológicos pero más potentes para estimular la vía del AA, entre los más importantes tenemos: el mismo AA exógeno, el ionóforo de calcio A23187, la ionomicina y el TPA. Estímulos más fisiológicos los proporcionan la formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), el zimósán, la fitohemoaglutinina y los lipopolisacáridos bacterianos (Fern et al. 1977h, pp.9-20).

El compuesto químico más usado es el ionóforo de calcio A23187, que estimula la vía 5-LOX en neutrófilos peritoneales de rata preferencialmente sobre la COX (Fern et al. 1977i, pp.9-20).

1.6.2.- Método de cuantificación de eicosanoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Este método permite la cuantificación de tres enzimas importantes para el proceso inflamatorio: la PLA2, la LOX y la COX. El proceso se basa en la detección de un marcador; el ácido 5-HETE, LTB4 y sus isómeros o productos de oxidación; que comprueba el hallazgo de inhibidores de la vía 5-LOX. Todos ellos son grupos cromóforos que absorben a 235 ó 274-280 nm siendo detectables y cuantificables con facilidad (Fern et al. 1977j, pp.9-20).

1.6.3.- Edema plantar inducido por carragenina

Consiste en la inducción de un edema en la región subplantar de la pata de la rata por la inyección de carragenina, provocando una respuesta inflamatoria en dos fases una temprana y otra tardía, en ésta última es el tiempo ideal para el ensayo de AINES, que tienden a reducir el edema, actuando sobre los derivados del AA (Fern et al. 1977k, pp.9-20).

1.6.4.- Modelo de inducción de edema con aceite de crotón en la oreja del ratón.

Se usa el aceite de crotón; proveniente de la especie *Croton tiglium L* posee importantes efectos proinflamatorios y productor de tumores por poseer TPA (éster de forbol). Esta sustancia produce todos los efectos propios de la inflamación, en los que se puede evaluar las sustancias potencialmente inflamatorias *in vivo* (Fern et al. 1977l, pp.9-20).

1.6.5.- Reactivo de proliferación celular (WST-1) para la actividad citotóxica y antiinflamatoria

Es una herramienta utilizada para determinar el grado de inhibición o inducción de la proliferación celular en cualquier modelo *in vitro*. El ensayo se fundamenta en la escisión enzimática de la sal de tetrazolio (WST-1) a formazan por deshidrogenasas mitocondriales presentes en células viables (neutrófilos). Una expansión en el número de células viables provoca un aumento de la actividad global de la deshidrogenasa mitocondrial en la muestra que conduce a un incremento en la cantidad de colorante de formazan formado (correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas en el ensayo) el cual se cuantifica mediante un espectrofotómetro de barrido múltiple (lector de ELISA) (Roche, 2007a: p.2), (Tan y Berridge, 2000a, p.62).

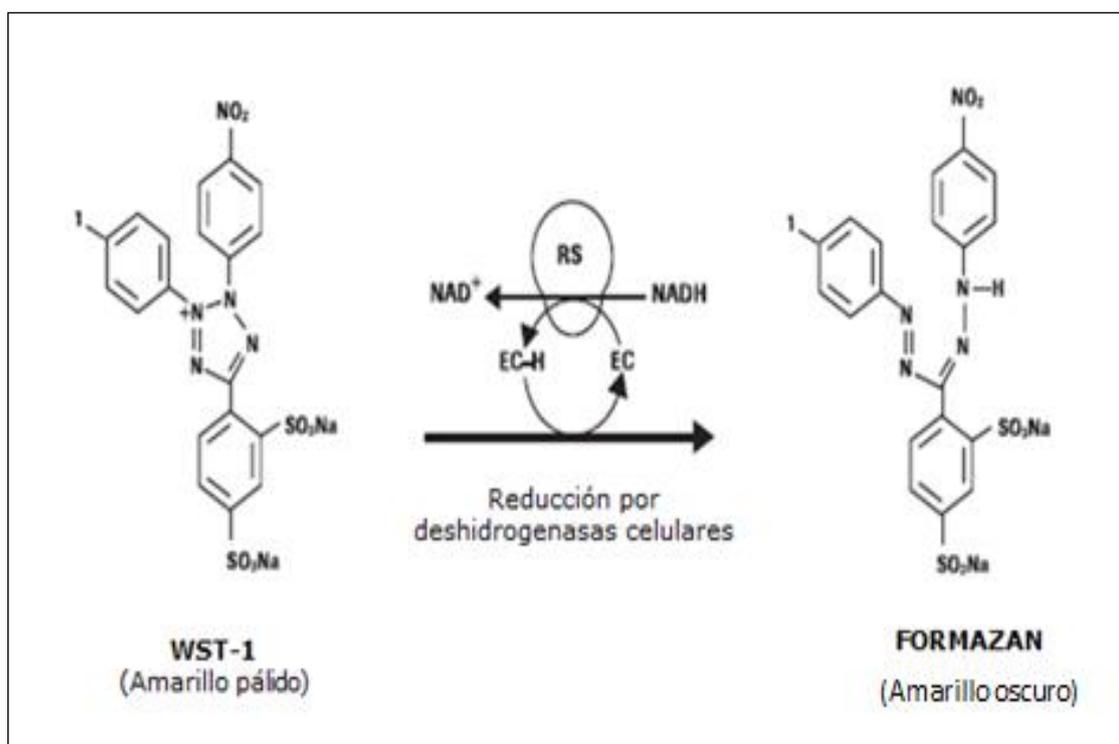


Figura 3-1. Mecanismo de acción antiinflamatoria producida por el WST-1.

Fuente: (Roche, 2007b: p.2).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018

1.7.- Antioxidante

Consideramos como antioxidante a cualquier molécula lo suficientemente estable, capaz de retrasar o prevenir la oxidación de un sustrato oxidable actuando como donador de electrones (agente reductor) a un radical libre, formando un radical menos tóxico, disminuyendo e inhibiendo la capacidad de daño celular (Alhakmani et al., 2013a, p. 626).

Los antioxidantes son los agentes capaces de neutralizar efectivamente el efecto de los radicales libres al interferir con el proceso de oxidación, quelar metales catalíticos y también actuando como eliminadores de oxígeno (Arul Ananth et al. 2013a, p.1).

1.7.1 Radical Libre

Los radicales libres son especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS /RNS) que se producen continuamente en el cuerpo humano como un subproducto de la respiración aeróbica celular. La producción excesiva de ROS / RNS conduce a una exposición de sustancias oxidantes, falla en los mecanismos de defensa o daño a biomoléculas como ADN, lípidos o proteínas (Arul Ananth et al. 2013b, p.1).

1.7.2.- Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo, es resultado del desequilibrio de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la actividad de enzimas antioxidantes, dicho desequilibrio puede inducir daño en los tejidos, actuando sobre lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos, y por lo tanto, juega un papel crítico en enfermedades relacionadas con los humanos, incluyendo cáncer, asma, enfermedades respiratorias, y arteriosclerosis. Cuando una célula sufre estrés oxidativo, los antioxidantes se presentan en la célula para apagar las especies reactivas de oxígeno (ROS). Las enzimas metabólicas interactúan con compuestos extraños y tóxicos en el cuerpo, por lo tanto, son importantes para regular el equilibrio entre la sobreproducción y la destrucción de ROS dentro de la célula (Farhat et al. 2018, p287).

1.7.3.- Capacidad captadora de radicales libres. Método DPPH'

El ensayo DPPH es el más usado para evaluar la actividad antioxidante de compuestos o extractos específicos, estos últimos pueden reaccionar con un radical estable, 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH[°]) en una solución de metanol (Brand-Williams et al. 1995a, pp.25-30).

La reducción de DPPH[°] es controlada por la disminución de su absorbancia en una longitud de onda característica durante la reacción. En su forma radical, DPPH[°] absorbe a 515 nm, pero después de la reducción por un antioxidante (AH) o una especie radical (R[°]), la absorción desaparece (Brand-Williams et al., 1995b, pp.25-30).

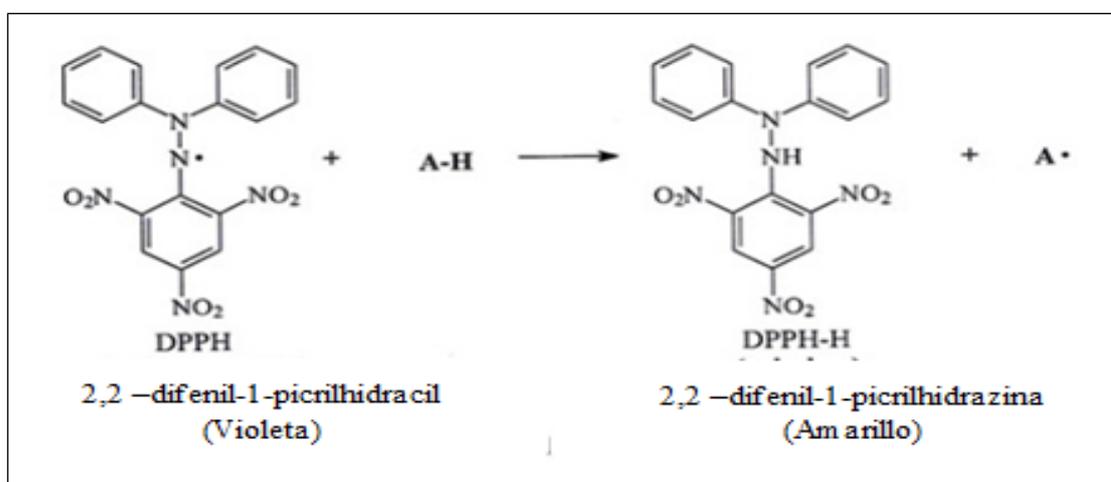


Figura: 4-1. Mecanismo de acción del DPPH'

Fuente: (Mishra et al., 2012: p.1038).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

CAPITULO II

2.- MARCO METODOLÓGICO

2.1.- Lugar de Investigación

La investigación se realizó en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, Laboratorio de Productos Naturales y Laboratorio de Análisis Instrumental.

2.2.- Recolección de la materia vegetal

La materia vegetal fue recolectada en el mes de Octubre de 2017 en el cantón Ambato, provincia de Tungurahua, a 2571 m.s.n.m. La ubicación corresponde a las siguientes coordenadas geográficas:

- Latitud: 1°25'12.32" S
- Longitud: 78°64'23.25" O

2.3.- Identificación de Material Vegetal

La muestra vegetal recolectada fue identificada en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato campus Queracocha, por el Ing. Pedro Pablo Pomboza Tamaquiza PhD coordinador de investigación de dicha facultad.

2.4.- Materiales, Equipos y Reactivos

2.4.1.- Material Vegetal, Biológico y Farmacológico

Tabla 1-2: Descripción del Tipo de Material usado en la investigación.

Material Vegetal	Se utilizaron las hojas y flores de <i>Tropaeolum majus</i> . La planta fue secada en estufa a 35°C. Para posteriormente ser triturada en un molino marca Arthur H. Thomas C.O ubicado en el laboratorio de Productos Naturales de la ESPOCH, para ser empleada en la obtención de extractos.
Material Biológico	Para la realización del ensayo in vitro de la actividad antiinflamatoria se requirió el uso de sangre humana.

Material Farmacológico	Se usó 100 mg de ácido acetil salicílico sin cafeína como control positivo en el ensayo de la actividad antiinflamatoria
-------------------------------	--

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

2.4.2.- Material de Laboratorio

Tabla 2-2: Descripción del Material de laboratorio usado en la investigación.

Control de Calidad de Materia Prima			
Reverbero	Piseta	Cápsulas de porcelana	Crisoles de porcelana
Picnómetro de 10 ml	Espátula		
Pinzas para cápsula	Vidrio Reloj		
Tamizaje Fitoquímico			
Frascos ámbar de 1000 ml	Embudo Simple	Pipetas graduadas de 1mL, 5mL y 10mL	Gradilla
Tubos de ensayo	Papel Filtro	Trípodes	Algodón
Vasos de Precipitación de 600, 250 y 100 ml			
Obtención del Extracto Hidroalcohólico			
Balones esmerilados de 50 ml	Embudo Simple	Papel Filtro	Vaso de Precipitación de 600 ml
Probeta de 500 ml			
Ensayo Antiinflamatorio y Citotóxico			
Alcohol antiséptico	Algodón	Jeringas 1mL, 3mL, 5mL, 10mL y 20mL	Torniquete
Tubos de ensayo	Micropocillos	Micropipeta automática graduable 10µL - 100µL	Micropipeta automática graduable 100µL - 1000 µL
Puntas azules	Vasos de precipitación de 25mL	Pipeta Multicanal	Puntas amarillas
Ensayo actividad antioxidante			
Balones aforados 10mL y 250mL	Tubos de ensayo	Pipetas 5mL y 10mL	Paleta
Piseta			

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

2.4.3.- Equipos

Tabla 3-2: Descripción de los Equipos de laboratorio usado en la investigación.

Análisis	Equipo
Molienda, Secado, Control de Materia Prima y Tamizaje Fitoquímico	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Estufa Memmert SNB400
	Sonicador Marca Branson 2510
	Mufra IVYMEN N-8LITROS 1100°C
	Desecador
	Balanza analítica Radwag AS 220.R2
	pH metro Sper Scientific.
	Refractómetro
Obtención del Extracto Hidroalcohólico	Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath
Obtención del Extracto Liofilizado	Liofilizador Thermo Electron Corporation.
	Refrigerador General Electric Profile PSMS3KEF
Equipos para el ensayo citotóxico, antiinflamatorio y antioxidante	Cámara de Neubauer Marienfeld.
	Microscopio Zeiss Primo Star.
	Centrífuga Dynac.
	Lector de Microplacas Thermo Scientific Multiskan Go.
	Sonicador Marca Branson 2510
Vórtex mixer MRC S1 – 100	

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

2.4.4.- Reactivos

Tabla 4-2: Descripción de los Reactivos usados en la investigación

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
	Agua destilada
	Ácido clorhídrico
	Alcohol
	Alcohol amílico
Éter	
Etanol	
Control de calidad	Ácido clorhídrico 10%
	Ácido nítrico
	Peróxido de hidrogeno
	Nitrato de amonio 10%
	Agua destilada
	Ficoll Paque
	Zimosán

Ensayo antiinflamatorio	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: Ricardo Márquez, 2018.

2.5.- Técnicas y Métodos

2.5.1.- Secado y Molienda del Material Vegetal

2.5.1.1.- Secado

Las hojas y flores de *Tropaeolum majus* previamente recolectadas, fueron separadas, lavadas y secadas a una temperatura de 35°C en una estufa de aire caliente.

2.5.1.2.- Molienda

Se llevó a cabo en un molino de marca Arthur H. Thomas C.O, para obtener trazas de aproximadamente 3 mm de espesor, tanto de hojas como de flores por separado, para la realización adecuada de todos los ensayos.

2.5.2.- Control de Calidad de la Droga Cruda

Todos los ensayos detallados a continuación fueron realizados por triplicado, en base a métodos físico-químicos con la finalidad de confirmar la calidad de la droga vegetal cruda.

2.5.2.1.- Determinación del contenido de humedad (Método gravimétrico)

Es un indicador de la estabilidad de la droga vegetal, pues permite detectar la cantidad de agua que posee, y que puede ser un factor desencadenante para la contaminación microbiana.

Procedimiento

Se pesó 2 g de muestra molida (hojas y flores) y se transfirió a una cápsula de porcelana previamente tarada a 105 °C (desechada hasta masa constante). Posteriormente se desecó durante 3 h, se enfrió la capsula con la muestra en el desecador y se pesó. Se colocó nuevamente el crisol en la estufa durante 1h (Se repitió el procedimiento hasta mantener una masa constante) (Miranda, 2006a: p.28).

Cálculo

$$SS (\%) = \left[\frac{(m_2 - m_1)}{(m_2 - m)} \right] \times 100$$

En donde:

SS= sustancia seca en porcentaje en masa.

m = masa de la cápsula vacía en g

m₁= masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada en g

m₂= masa de la cápsula con la muestra en g

2.5.2.2.- *Determinación de cenizas totales*

Muestra todo el contenido inorgánico (minerales) que contiene la droga vegetal, y puede detectar al incinerarla.

Procedimiento

Se pesó 2g de muestra molida (hojas y flores), en un crisol previamente tarado, se calentó en un reverbero hasta carbonización, posteriormente se incinero en una mufla a 700 °C, durante 2 horas, se enfrió el crisol en un desecador y se pesó (Se repitió este procedimiento hasta obtener un masa constante) (Miranda, 2006b: p.27).

Cálculo:

$$\% C = \left[\frac{(m_1 - m)}{(m_2 - m)} \right] \times 100$$

En donde:

%C = contenido de cenizas en porcentaje de masa

m = masa del crisol vacío en g

m₁ = masa del crisol con la muestra después de la incineración en g

m_2 = masa del crisol con la muestra antes de la incineración en g

2.5.2.3.- *Determinación de cenizas solubles en agua*

Parte de las cenizas totales, que se caracterizan por ser solubles en agua.

Procedimiento

A las cenizas obtenidas en cenizas totales, se añadió 15 mL de agua destilada y se hirvió suavemente durante 5 min. A la muestra hervida se filtró y se carbonizó en un reverbero para posterior incineración en la mufla a una temperatura de 700°C durante 2h. (Se repitió el procedimiento hasta obtener una masa constante) (Miranda, 2006c: p.27).

Cálculo:

$$\% Ca = \left[\frac{(m_2 - m_a)}{(m_1 - m)} \right] \times 100$$

En donde:

%Ca = Porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada

m = masa del crisol vacío en g

m_a = masa del crisol con la ceniza insoluble en agua en g

m_1 = masa del crisol con la muestra en g

m_2 = masa del crisol con la ceniza total en g

2.5.2.4.- *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico*

Es el residuo obtenido al disolver las cenizas sobrantes en ácido clorhídrico al 10%.

Procedimiento

A las cenizas obtenidas de cenizas totales se añadió 2 mL de ácido clorhídrico al 10%, se tapó el crisol con un vidrio reloj y se procedió a hervir durante 10 min en un reverbero. Se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y se unió al contenido del crisol. Se filtra el contenido del crisol, se lavó el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico (se añadió 2 gotas de nitrato de plata 0,1 mol/L) no presente cloruros. El filtrado con el residuo se desecó a 105°C y se transfirió al crisol inicial en el cual se procede a incinerar en una mufla a 700 ° C durante 2 h. Finalmente se transfirió a un desecador hasta que se enfrié (Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante) (Miranda, 2006d: p.28).

Cálculo:

$$B = \left[\frac{(m_2 - m_1)}{(m)} \right] \times 100$$

En donde:

B = Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

m = muestra utilizada en g

m₁ = masa del crisol con la muestra en g

m₂ = masa del crisol con la ceniza insoluble en ácido clorhídrico en g

2.5.3.- Tamizaje Fitoquímico

Consiste en una serie de pruebas para determinar los principales grupos químicos presentes en las plantas a través de una determinación cualitativa. Se basa en la maceración con solventes de polaridad creciente para garantizar la máxima extracción de los metabolitos. Sin embargo, a pesar de su utilidad, el *screening* fitoquímico debe ser considerado solo como una orientación, que debe ser comprobado mediante otros ensayos más profundos.

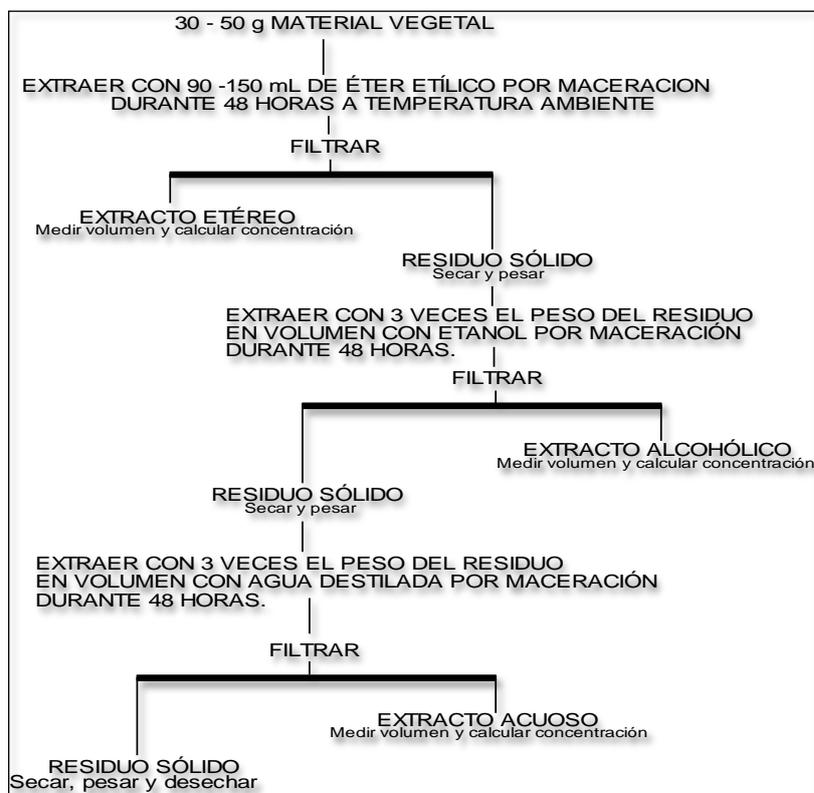


Figura 1-2. Protocolo de tamizaje fitoquímico.

Fuente: (Miranda, 2006e: p.32).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Realizado el protocolo anterior para obtener los tres distintos tipos de extractos, se procedió a la realización de ensayos y pruebas para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en la planta en base a cambios de color y formación de precipitados. Las reacciones llevadas a cabo en cada uno de los extractos se observa a continuación.

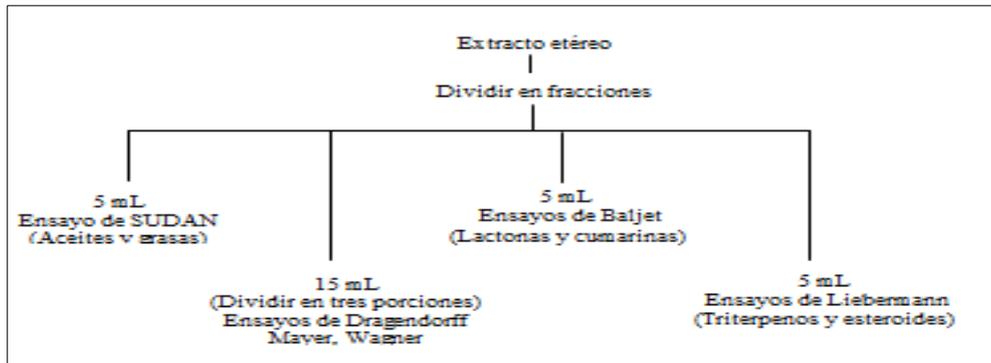


Figura 2-2 Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.

Fuente: (Miranda, 2006f: pp.34-37).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

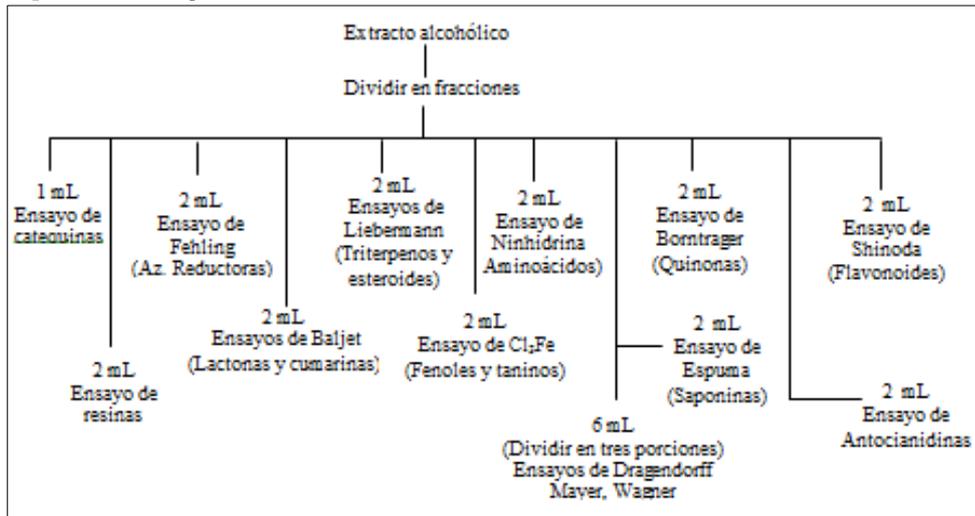


Figura 3-2 Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda, 2006g: pp.34-37).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

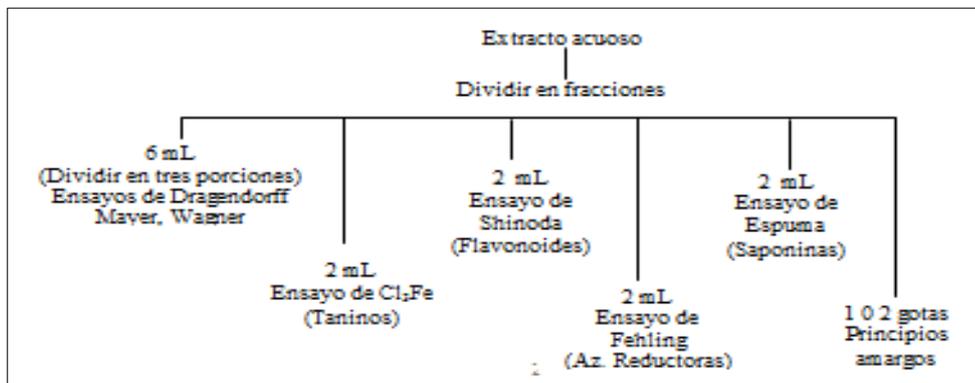


Figura 4-2 Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.

Fuente: (Miranda, 2006h: pp.34-37).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

2.5.4.- Obtención del Extracto Hidroalcohólico

Para la obtención del extracto hidroalcohólico se procedió a pesar 100 g de planta, se introdujo en un frasco ámbar, se añadió 1000 mL de etanol al 70% (1:10), se dejó macerar durante 72 h, posteriormente se sónico durante 1h y se filtró.

El filtrado fue utilizado para la determinación de los parámetros de calidad detallados a continuación:

2.5.4.1.- Determinación de los requisitos organolépticos

Se determinó el aspecto, color, olor y sabor del extracto.

Determinación de olor: Se tomó una tira de papel y se introdujo en los extractos, se procedió a percibir el aroma para determinar si pertenece a las características propias del extracto obtenido (Miranda, 2006i: p.27).

Determinación de color: En un tubo de ensayo completamente seco y limpio se trasvasó las muestras de ensayo (extracto de hojas y flores), hasta las $\frac{3}{4}$ y se observó el color, la transparencia y si era el caso separación de capas (Miranda, 2006j: p.27).

2.5.4.2.- Determinación de densidad relativa

Se pesó un picnómetro vacío y seco, posteriormente se llenó el picnómetro con el extracto y se introdujo en una estufa a 25°C durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se enfrió y se pesó cuidadosamente el picnómetro con la muestra (Miranda, 2006k: p.37).

Se repitió el mismo procedimiento usando agua destilada.

Cálculo:

$$D_{25} = \left[\frac{(m_1 - m)}{(m_2 - m)} \right] \times 100$$

En donde:

D_{25} = Densidad relativa

m = masa del picnómetro vacío en g

m_1 = masa del picnómetro con la muestra en g

m_2 = masa del picnómetro con el agua en g

2.5.4.3.- Determinación del índice de refracción

Se colocó una gota de la muestra de análisis sobre el prisma de medición, se enfocó la luz moviendo el compensador cromático hasta lograr obtener la intersección entre los campos claro y oscuro (Miranda, 2006l: p.37).

2.5.4.4.- Determinación del pH

Se ajustó el pHmetro con las soluciones buffer reguladoras y se procedió a medir el pH. Se introdujo el pHmetro sobre la muestra a analizar.

2.5.4.5.- Determinación de sólidos totales

En una cápsula de porcelana previamente tarada, se añadió 5 mL del extracto alcohólico, se evaporó el contenido de la capsula en baño de agua hasta que el residuo se encuentre aparentemente seco. Se pasa a una estufa hasta que alcance un peso constante (Miranda, 2006m: p.38).

Cálculo:

$$S_t = \frac{(P_r - P)}{V}$$

En donde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo en g

P = masa de la cápsula vacía en g

V = volumen de la porción de ensayo en mL.

2.5.5.- Obtención del extracto liofilizado

Del extracto hidroalcohólico obtenido anteriormente, se procedió a concentrar en el rotavapor a una temperatura de 50 °C, el concentrado se filtró, se congeló con nitrógeno líquido en el vaso de liofilización (el congelado se lo hizo de tal manera que el extracto quede por las paredes del vaso para obtener un buen liofilizado) y se colocó en el liofilizador.

Nota: Se debía mantener la muestra congelada hasta que el extracto este completamente seco.

2.5.6.- Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales es una técnica basada en el método de Folin-Ciocalteu, se fundamenta en una reacción redox, donde los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu de color amarillo que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es medida a 765 nm (Alhakmani et al., 2013b: p.625).

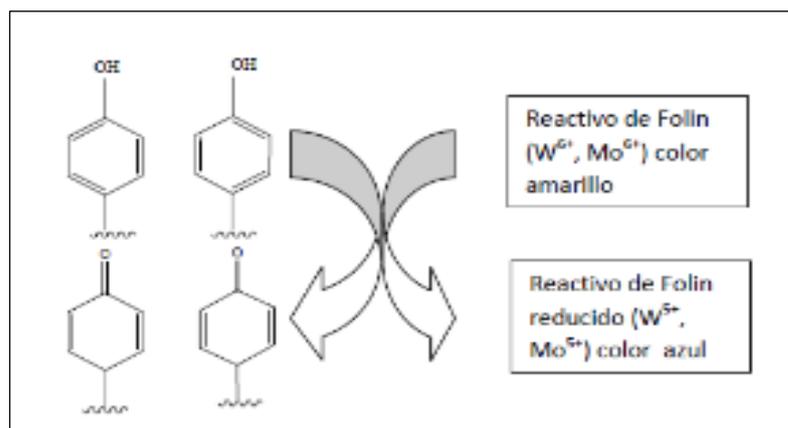


Figura 5-2. Fundamento de la reacción de Folin Ciocalteu

Fuente: (Alhakmani et al., 2013c: p.625).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por cada 100 g de extracto liofilizado.

2.5.7.- Cuantificación de flavonoides totales

El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en etanol, que se producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales (Amaya & Portillo 2013a, p.53).

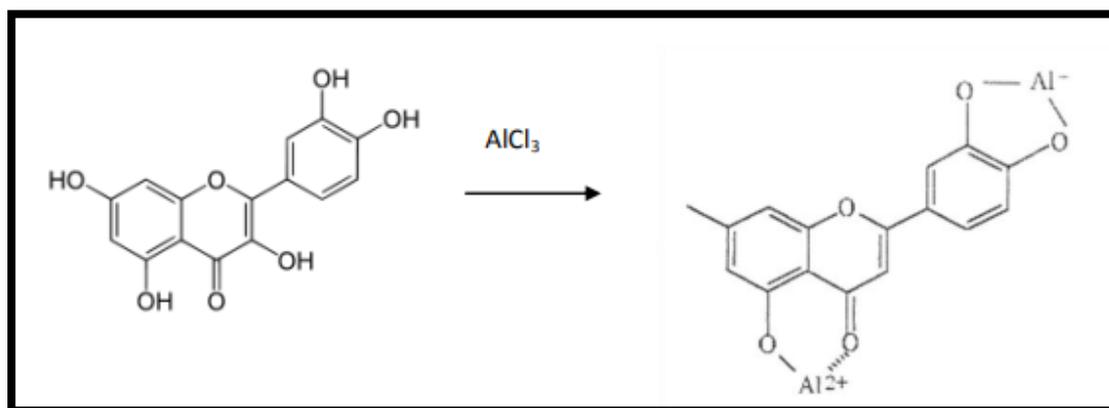


Figura 6-2. Fundamento de la reacción de Tricloruro de Aluminio

Fuente: (Amaya & Portillo 2013b, p.53).

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Se preparó como solución estándar de quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm en metanol, para la realización de la curva de calibración. Posteriormente se preparó las

soluciones problema (extracto liofilizado de Hojas y Flores) a una concentración de 100 ppm en etanol al 70%, y se midió la absorbancia a 510 nm.

2.5.8.- Ensayo Antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de compuestos o extractos específicos, estos últimos pueden reaccionar con un radical estable, 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH °) en una solución de metanol. La reducción de DPPH ° se controla por la disminución de su absorbancia a una longitud de onda característica durante la reacción. En su forma radical, DPPH ° absorbe a 515 nm, pero tras la reducción por un antioxidante (AH) o una especie radical (Re), la absorción desaparece (Cuvelier & Berset 1995a, p.28).

Se prepararon soluciones de muestra a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm para hojas y flores, (el diluyente fue metanol); 6,9 mg de DPPH[·] se diluyó en un volumen de 250 mL con metanol. (La absorbancia de esta solución debía oscilar entre 0,6 a 0,8 por lo que se esperó hasta que se estabilice y alcance la absorbancia adecuada para la realización de ensayo) (Cuvelier & Berset, 1995b: p.28).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del control positivo (DPPH}^{\cdot}) - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo (DPPH}^{\cdot})} \times 100$$

2.5.9.- Ensayo Antiinflamatorio

El ensayo antiinflamatorio se lo realizo siguiendo la metodología expuesta por (Choudhary & Jalil 2005; p.23-48), la cual se fundamenta en la reducción de la sal de tetrazolio (WST-1), altamente soluble en agua en presencia de neutrófilos aislados (1×10^7 neutrófilos /mL), cuyo resultado fue expresadas como porcentaje de inhibición inflamatoria.

$$\% \text{ Inhibición} = \left(100 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo (DMSO)}} \right) \times 100$$

CAPÍTULO III

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

3.1.- Parámetros de control de calidad de la droga cruda de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.

Tabla 1-3. Resultados de los parámetros de calidad.

Parámetro	Hojas de <i>Tropaeolum majus</i> (%)	Flores de <i>Tropaeolum majus</i> (%)	Límites aceptados por la Real Farmacopea Española
Humedad	9,59 ± 0,31	9,59 ± 0,35	14%
Cenizas Totales	1,58 ± 0,88	1,55 ± 0,15	5%
Cenizas Solubles en Agua	0,88 ± 0,27	0,85 ± 0,22	2%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0,30 ± 0,05	0,35 ± 0,10	1%

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

En la tabla 1-3 se observa los resultados obtenidos en las pruebas del control de calidad realizado a las hojas y flores de *Tropaeolum majus*. La humedad representa el contenido de agua en la planta, un valor mayor al 14%, puede derivar en un crecimiento de bacterias, hongos e incluso hidrólisis de algunos componentes de interés. Las cenizas totales indican 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). Los resultados obtenidos de las hojas y de las flores se encuentran dentro de los parámetros presentados por la Real Farmacopea Española (2002a). Esto demuestra que la recolección, limpieza, secado y almacenamiento de la especie vegetal fue adecuada y de esta forma se garantizan los ensayos posteriores.

Los resultados obtenidos del control de calidad de *T. majus* son menores en comparación con los obtenidos en la investigación de Cabezas (Cabezas, 2014a, p.53), esto puede deberse a tres

razones principales, el lugar de recolección, el clima donde crecen las especies y la altitud. Cabezas recolectó la muestra en la provincia de Chimborazo, cantón Guano, mientras que la muestra vegetal usada en la presente investigación fue recolectada en la provincia de Tungurahua cantón Ambato, ambas zonas geográficas cuentan con diferencias apreciables en las condiciones del suelo. Ambato es mayormente arenoso con gran capacidad de retención de agua e influenciada en gran medida por la ceniza volcánica, son suelos permeables y altamente desarrollados (Plan Provincial de Riego Tungurahua 2014-2029, 2014, p.30). Mientras que, los suelos en el Cantón Guano son suelos inceptisoles (apenas inician su desarrollo), con menor retención de agua e influenciados por la erosión (Memoria Técnica del Cantón Guano, 2012, p.2). Respecto a la recolección, la temperatura media en el cantón Ambato es de 15°C (Climate Data Org, 2018, <https://es.climate-data.org>); mientras que en el cantón Guano es de 14°C, (Climate Data Org, 2018, <https://es.climate-data.org>), otro factor importante es la altitud que difiere en 220 msnm (Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos, 2017, <http://www.ecuadorencifras.gob.ec>), con cambios en la presión atmosférica que puede influenciar en la cantidad y el tipo de metabolitos secundarios que posee.

3.2.- Tamizaje Fitoquímico.

El tamizaje fitoquímico de las hojas y flores de *Tropaeolum majus*, fue realizado con solventes de polaridad creciente (éter, etanol y agua), en base a las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006n, pp. 3864), los resultados se expresan en las siguientes tablas:

Tabla 2-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de hojas de *Tropaeolum majus*.

Ensayo a realizar	Compuesto a identificar	Extracto etéreo	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Dragendorff	Alcaloides	(+) Opalescencia	(+) Opalescencia	(-)
Mayer	Alcaloides	(-)	(-)	(++) Turbidez
Wagner	Alcaloides	(+) Opalescencia	(+) Opalescencia	(+) Opalescencia
Sudan	Compuestos grasos	(-)	N/A	N/A
Baljet	Lactonas (Cumarinas)	(++) Coloración roja	(-)	(++) Coloración roja
Liebermand – Buchard	Triterpenos y/o esteroides	(+++) Verde oscuro-negro final	(+++) Verde oscuro-negro final	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	(-)	N/A
Resinas	Resinas	N/A	(-)	N/A
Fehling	Azúcares reductoras	N/A	(+) Precipitado rojo	(+) Precipitado rojo
Espumas	Saponinas	N/A	(-)	(-)
Ninhidrina	Aminoácidos libres o aminos	N/A	(-)	N/A
Tricloruro férrico	Fenoles y taninos	N/A	(+++) Verde intenso	(+++) Verde intenso
Borntrager	Quinonas	N/A	(-)	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	(+)	(++)
Antocianidinas	Flavonoides	N/A	(+)	N/A
Mucilaginosos	Polisacáridos	N/A	N/A	(-)

Principios amargos	Principios amargos y astringentes	N/A	N/A	(-)
--------------------	-----------------------------------	-----	-----	-----

(N/A) No aplica, (-) Ausencia, (+) Escaso, (++) Mediadamente abundante, (+++) Abundante

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Tabla 3-3. Resultados del tamizaje fitoquímico de flores de *Tropaeolum majus*.

Ensayo a realizar	Compuesto a identificar	Extracto etéreo	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Dragendorff	Alcaloides	(+) Opalescencia	(++) Turbidez	(-)
Mayer	Alcaloides	(-)	(-)	(-)
Wagner	Alcaloides	(-)	(++) Turbidez	(+) Opalescencia
Sudan	Compuestos grasos	(+++)	N/A	N/A
Baljet	Lactonas (Cumarinas)	(+++) Precipitado color rojo	(-)	(+)
Liebermand – Buchard	Triterpenos y/o esteroides	(+) Azul muy rápido	(-)	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	(+)	N/A
Resinas	Resinas	N/A	(-)	N/A
Fehling	Azúcares reductoras	N/A	(+) Precipitado rojo	(+) Precipitado rojo
Espumas	Saponinas	N/A	(-)	(-)
Ninhidrina	Aminoácidos libres o aminas	N/A	(-)	N/A
Tricloruro férrico	Fenoles y taninos	N/A	(+++) Verde intenso	(+++) Verde intenso
Borntrager	Quinonas	N/A	(-)	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	(+)	(+++)
Antocianidinas	Flavonoides	N/A	(+)	N/A
Mucilagos	Polisacáridos	N/A	N/A	(-)
Principios amargos	Principios amargos y astringentes	N/A	N/A	(-)

(N/A) No aplica, (-) Ausencia, (+) Escaso (++) Mediadamente abundante (+++) Abundante

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Las tablas 2-3 y 3-3 muestran los resultados obtenidos para las diferentes pruebas del tamizaje fitoquímico tanto de hojas como de flores de *Tropaeolum majus*. Actualmente no existen investigaciones que reporten datos sobre el análisis de las flores de esta especie vegetal, por lo que se confrontarán los datos obtenidos de las hojas, con la investigación de Cabezas (2004b, p.54).

El ensayo de Sudán que determina la presencia de compuestos grasos dio resultados negativos para las hojas de *T. majus*, esto concuerda con lo expresado por Cabezas (2004c, p.54), sin embargo, para las flores el ensayo resultó positivo.

Se observa la presencia de alcaloides en las hojas, identificándolos principalmente en el extracto acuoso mediante el ensayo de Mayer, lo que concuerda con la investigación de Cabezas (2004d, p.54); que expresa ensayos positivos para los extractos etanólico y acuoso, de igual forma se obtuvieron resultados similares en el extracto alcohólico de los tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* (Inostroza et al., 2015a, p.86). En el extracto etanólico de las flores de *T. majus* también se evidencia la presencia de alcaloides; y una presencia escasa en los otros dos extractos, esto puede ser comparado con una investigación efectuada por Sanabria Galindo et al. (1997a, p.18), en el cual en el extracto etanólico de la parte aérea de la planta se reportó abundantes alcaloides.

El ensayo de Baljet evidenció la existencia de estructuras con grupo funcional lactona en el extracto etéreo y acuoso de hojas y flores, los resultados coinciden con Cabezas (2004e, p.54) para el extracto acuoso de hojas de *Tropaeolum majus*. Mientras que el extracto etanólico no posee metabolitos con este grupo funcional, concordando con lo expuesto por Sanabria Galindo et al. (1997b, p.18).

La prueba de Libermann Burchard evidencia la existencia de triterpenos y esteroides. En los extractos etéreo y acuoso de las hojas se detectó la presencia de este tipo de compuestos; coincidiendo con lo que reporta Cabezas (2004f, p.54) y Sanabria Galindo et al. (1997c, p.18). Mientras que en las flores se detectó ligera presencia en el extracto etéreo; que no puede ser comparada por ausencia de investigaciones o reportes para esta parte de la planta. El contenido de triterpenos tiene relación con algunas propiedades importantes de tipo anticancerígeno, inmunomodulador, antiinflamatorio, hipoglucemiante, hipolipemiante y hepatoprotector (International Mycotherapy Institute, 2014, <http://www.imispain.com>).

El ensayo de catequinas identifica la presencia de los flavan-3-oles, que son un subgrupo de flavonoides (Kricun 2011a, pp. 249-255). No se reportó la presencia significativa de este tipo de compuestos en las hojas o en las flores de *T. majus*, concordando con lo expuestos por Cabezas (2004g, p.54).

El resultado positivo para la prueba de Shinoda indica la presencia de flavonoides en los extractos etanólico y acuoso tanto de las hojas como de las flores de la especie vegetal. Estos resultados concuerdan con los reportados por Cabezas (2004i, p.54), que indica la presencia de flavonoides en los extractos alcohólicos y acuosos; Bazylko et al. (2013c, p.88) reporta la caracterización de algunos flavonoides presentes en hojas de *Tropaeolum majus* entre los que se mencionan: hexoside de quercetina, derivado de quercetina, hexoside de kaempferol,

isoquercitrina, derivado de Kaempferol, astragalina, derivado de metoxiquercetina. Sanabria Galindo et al. (1997d, p.18) indica la presencia regular de flavonoides en partes aéreas de *Tropaeolum majus*. En otras especies como *Tropaeolum tuberosum* se expresa una presencia abundante de flavonoides en el tubérculo (Inostroza et al. 2015c, p.86).

Garzón et al. (2015a, p. 1803), elucidaron algunas estructuras de flavonoides presentes en las flores de capuchina entre las que podemos nombrar están: delfinidina-3-hexósido, cianidina-3 soforoside, soforoside de 3- pelargonidina, miricetina dihexosido, miricetina acetil dihexosido, miricetina hexosido, quercetina dihexosido, quercetina acetil dihexosido, kaempferol dihexosido, kaempferol acetil dihexosido, kaempferol hexosido, kaempferol acetil hexosido.

Se ha demostrado que la quercetina es un excelente antioxidante con capacidades antiinflamatorias, antiproliferativas y de expresión génica *in vitro*. Posee efectos antiinflamatorios y antioxidantes *in vivo*, especialmente en personas con hipertensión y sarcoidosis. Se atribuye una actividad antioxidante alta a su O-dihidroxiestructura en el anillo B y un grupo -OH en la posición 3, que da como resultado la capacidad de la quercetina para transferir un átomo de hidrógeno a los radicales (Garzón et al. 2015b, p. 1809).

Aunque el kaempferol tiene solo un grupo OH, posee de igual manera actividad antioxidante, sin embargo, su potencia es menor en comparación con la quercetina, según los estudios epidemiológicos, *in vitro* e *in vivo* se muestra una asociación positiva entre el consumo de kaempferol y sus glucósidos y las actividades farmacológicas antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerosas, cardioprotectoras, neuroprotectoras, antidiabéticas, antialérgicas y antiasmáticas (Garzón et al. 2015c, p. 1809).

Se ha informado que la miricetina es el flavonoide bioactivo durante los ensayos *in vivo*. La administración de extractos acuosos y etanólicos de glucósidos de miricetina de *Myrtus communis* L. muestra efectos hipoglucemiantes, antiinflamatorios y antinociceptivos significativos (Garzón et al. 2015d, p. 1809).

El ensayo de Fehling confirmó la presencia de azúcares reductores en hojas y flores. En *Tropaeolum majus* se ha reportado la presencia de compuestos de azufre como la glucotropaeolina (Bazylko et al. 2013a, p.88), este es un glucosinolato presente principalmente en las verduras crucíferas, que tras la actividad enzimática, se transforma en isotiocianato de bencilo (BITC). Los isotiocianatos se están estudiando por su toxicidad frente al cáncer, debido a que las células cancerígenas son más sensible a las toxinas que las células sanas (Higdon, 2005, <http://lpi.oregonstate.edu>).

El bencilglucosinolato se acumula en altas concentraciones en plantas maduras de *Tropaeolum majus*. La capacidad de biosíntesis de bencilglucosinolato y su contenido total depende de la parte de la planta, encontrándose en mayor cantidad en las hojas (Lykkesfeldt & Muller 1993, p. 609). Se encontró que un producto de hidrólisis del glucósido de bencilo, es el isotiocianato de bencilo (BITC), el cual modula la localización intracelular del factor de transcripción *Forkhead box O 1* (FOXO1). Los factores de transcripción de FoxO pueden antagonizar los efectos de la insulina y desencadenar una variedad de procesos celulares implicados en la supresión del tumor, la longevidad, el desarrollo y el metabolismo (Guzmán-Pérez et al. 2016, p.34). El BITC, que se encuentra en Brassicales, ha mostrado en células animales potencial quimiopreventivo y propiedades contra el cáncer. Sin embargo, el destino de BITC en el cuerpo humano no se ha estudiado exhaustivamente. El análisis de metabolitos de BITC en plasma y orina debería revelar información sobre su reabsorción, metabolismo y excreción (Platz et al. 2016, p.625).

El ensayo de cloruro férrico sirvió para determinar la presencia abundante de fenoles y taninos tanto en hojas como en flores. En estudios previos para *T. majus* se ha reportado la presencia de ácidos fenólicos (ácido clorogénico), ácido 3-p-cumaroilquinico, ácido 3-cafeoilquinico, ácido 4-cafeoilquinico, ácido 5-cafeoilquinico, ácido 4-p-cumaroilquinico, ácido 5-p-cumaroilquinico (Bazylko et al. 2013b, p.88); además de cucurbitacinas triterpénicas (Picciarelli y Alpi, 1987, p.85). Sin embargo, la caracterización de los grupos químicos de este género no es común en investigaciones científicas, pues la mayoría ha centrado su estudio en otros metabolitos.

El reactivo de Borntrager permite identificar la presencia de quinonas, en el caso de *Tropaeolum majus* en hojas y en flores este metabolito secundario está ausente. Sin embargo, investigaciones previas realizadas en el extracto etanólico de las hojas (Cabezas 2004h, p.54); se reportó la presencia de quinonas, concordando con Inostroza et al. (2015b, p.86) para la especie *Tropaeolum tuberosum* (mashua), que indica la presencia de pequeñas cantidades de quinonas en el extracto etanólico de los tubérculos de dicha planta. Al no coincidir los resultados de la presente investigación con los expuestos previamente en la bibliografía, se recomienda realizar más exploraciones en este aspecto con otros tipos de ensayos como: la o-fenilendíamina, reducción con bióxido de azufre, ensayo de Beilstein, acetilación, metilación, etc., aunque las causas del diferimiento pueden deberse al lugar de recolección que como ya se mencionó previamente; poseen distintas características climatológicas y de superficie, además que *T. tuberosum* se recolectó en el Perú en el distrito de Pazos a una altitud de 3840 msnm, una diferencia de 1340 m con el cantón Ambato lugar de recolección de *T. majus*.

Para la prueba de Antocianidina, el resultado fue positivo tanto en hojas como en flores coincidiendo con lo presentado por Cabezas (2004j, p.54), mientras que Inostroza et al. (2015d, p.86) identificó la presencia del metabolito en los tubérculos de *Tropaeolum tuberosum*.

Para los ensayos de espuma, ninhidrina, mucílagos y principios amargos los resultados fueron negativos tanto para hojas y flores de la especie vegetal lo que concuerda con la tesis presentada por Cabezas (2004k, p.54), no se encontraron más referencias bibliográficas sobre estos ensayos para especies del género *Tropaeolum*.

3.3.- Parámetros de calidad del extracto

Tabla 4-3. Parámetros de calidad del extracto de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.

Parámetro		Hojas	Flores
Requisitos organolépticos	Aspecto	Opalescente	Transparente
	Color	Café oscuro	Anaranjado
	Olor	Alcohólico, ligeramente picante	Alcohólico
	Sabor	Amargo, ligeramente astringente	Amargo, ligeramente astringente
Densidad relativa		0,93 ± 0,002	0,90 ± 0,005
Índice de refracción		1,365	1,364
pH		6,12	5,64
Sólidos totales		1,52 ± 0,06	0,92 ± 0,05

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018

En la tabla 4-3, se observa las características organolépticas del extracto hidroalcohólico. Los resultados fueron atribuidos a las particularidades propias de las hojas y flores de la especie, además del solvente usado.

Los resultados obtenidos del extracto de hojas de la planta se asemejan mucho a los valores presentados por Cabezas (2004l, p.54), sin embargo para las flores no se encontró referencias para compararlas.

La densidad relativa del extracto hidroalcohólico de hojas y flores fue de 0,93 y 0,90 respectivamente; valor mayor al del solvente usado (etanol al 70%) que es de 0,68, este valor indica la presencia de metabolitos disueltos en el solvente, que podrían ser capaces de interrelacionarse de forma química.

El índice de refracción tuvo una variación insignificante entre las partes analizadas, siendo de 1,365 para hojas y 1,364 para flores, valores mayores que el índice de refracción del agua que es de 1, lo que confirma la existencia de sustancias o sólidos (azúcares) solubles en el extracto, cabe señalar que la Farmacopea Argentina (2013, p.164) indica que, el índice de refracción de drogas vegetales debe estar en un rango de 1,3 y 1,7.

La cantidad de sólidos totales fue de $1,52 \pm 0,06$ para hojas y $0,92 \pm 0,05$ para flores, esto permite estimar el contenido de materia disuelta y suspendida presente en cada extracto hidroalcohólico.

El pH fue de 6,12 y 5,64 para los extractos hidroalcohólicos de hojas y flores respectivamente, lo que indica que ambos extractos son ligeramente ácidos, esto podría deberse a las características ácidas débiles de los metabolitos extraídos (flavonoides, fenoles, taninos, entre otros) por el solvente (Dehesa, 2011 p: 142-143).

3.4.- Cuantificación de Fenoles Totales

La cuantificación de fenoles, fue realizada por el método de Folin–Ciocalteu, basada en una medición espectrofotométrica, para esto fue necesaria la realización de una curva de calibración de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm obteniéndose la siguiente ecuación de la recta $A = 0,001 C + 0,0017$ ($R^2 = 0,999$).

La concentración de fenoles totales expresada en mg Eq GAE/100 g de extracto liofilizado, fue obtenida por la sustitución del valor de la absorbancia medida espectrofotométricamente de una solución madre a 100 ppm (extracto liofilizado de hojas y flores), en la curva de calibración obtenida previamente.

Tabla 5-3. Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría.

Muestra analizada	Fenoles Totales	
	mg Eq GAE/g de Extracto liofilizado	Porcentaje (%)
Hojas de <i>Tropaeolum majus</i>	11877,778± 192,450	11,878± 0,192
Flores de <i>Tropaeolum majus</i>	4438,889± 96,225	4,439± 0,096

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Los valores de la tabla 5-3 exponen los resultados de la cuantificación de fenoles totales obtenidos mediante el método de Folin–Ciocalteu para hojas y flores de *Tropaeolum majus*. Investigaciones previas señalan que se realizó la cuantificación de fenoles, a pétalos de *Tropaeolum majus* de tres colores diferentes, en el cual se recalca el valor obtenido en las flores de color amarillo con $0,44202 \pm 0,00509$ mg Eq GAE/mg de muestra (Lino et al. 2015a, p.323). Garzón & Wrolstad (2009a, p.44) indican que, en las flores naranjas de capuchina recolectadas en Colombia, la cantidad de fenoles totales fue de 406 mg GAE/100 g Flores. Ambos valores se asemejan al obtenido en el presente trabajo. Sin embargo, se debe considerar, que se presentan en unidades de medida distintas y no se conoce con detalle el tratamiento ni la selección de la especie vegetal.

Bazylko et al. (2014d, p.22) reportaron en el extracto hidroalcohólico liofilizado de una mezcla de hojas y flores (relación 7:3) una cantidad de fenoles totales de $0,0356 \pm 0,0036$ mg Eq GAE/mg de muestra, este valor difiere significativamente con el valor obtenido en la presente investigación. Debido a que no se encontraron otros estudios de cuantificación de fenoles exclusivamente de hojas, no se pudo realizar un análisis más profundo.

3.5.- Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó espectrofotométricamente mediante el método de tricloruro de aluminio, para lo cual se elaboró una curva de calibración con estándar de quercetina a diferentes concentraciones 20, 40, 60, 80 y 100 ppm y se empleó la siguiente ecuación de la recta $A = 0,0014C + 0,0144$ ($R^2 = 0,9990$).

Para obtener la concentración de flavonoides totales en el extracto liofilizado se sustituyó el valor de la absorbancia obtenida espectrofotométricamente a 300ppm (extracto liofilizado de hojas) y 600 ppm (extracto liofilizado de flores), los cuales fueron expresados en mg Eq Q/100g de extracto liofilizado y en porcentaje.

Tabla 6-3. Cuantificación de flavonoides por espectrofotometría.

Muestra a analizar	Flavonoides Totales	
	mg Eq Q/g Extracto liofilizado	Porcentaje (%)
Hojas de <i>Tropaeolum majus</i>	16817,714± 94,026	16,821 ±0,094
Flores de <i>Tropaeolum majus</i>	14418,286± 188,051	14,418 ± 0,188

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

En la tabla 6-3 se presentan los valores obtenidos en la cuantificación de flavonoides presentes tanto en hojas como en flores de *Tropaeolum majus*, el porcentaje obtenido es similar para las dos partes de la planta. Bazylko et al. (2014e, p.22), reporta que, el contenido de flavonoides en un extracto hidroalcohólico de hojas y flores en relación 7:3 de capuchina fue de $26,0 \pm 0,6$ mg/g. En la investigación de Bazylko et al., se realizó la cuantificación de una mezcla de hojas y flores, y no se evaluó el contenido de cada parte de la planta, por lo que no se puede realizar una comparación objetiva.

Cabezas (2004m, p.58), indicó que la absorbancia de las hojas medidas espectrofotométricamente a una λ de 510 nm fue de 0,3253, mientras que para *T. majus* fue de 0,0375. Sin embargo, Cabezas no detalla las concentraciones a las que se realizó la curva de calibración, otro factor influyente en la diferencia de valores, podría deberse a la época de recolección; Cabezas realizó

su recolección en junio, siendo la estación seca en la Sierra; y para el presente estudio, la recolección se realizó en octubre que es el inicio de la estación lluviosa. Por lo que se podría señalar que existe mayor cantidad de flavonoides en presencia de mayor radiación U.V, ya que los compuestos fenólicos ante mayor incidencia solar intentan proteger a la planta. Los responsables de la radioprotección son los flavan-3-oles, pertenecientes a la familia de los flavonoides, metabolitos presentes en una gran cantidad de plantas (Castillo Sánchez & Benavente-García 2009, p. 26).

En cuanto a las flores Lino et al. (2015b, p.323), señalaron que el contenido de flavonoides en los pétalos de flores amarillas es de 0,0867 mg Eq Q/100 g de muestra. Aunque el método empleado es el mismo, detalles como las concentraciones de la curva de calibración no fueron reveladas, por lo que podría ser posiblemente una de las razones por las cuales la diferencia entre ambos resultados es tan notoria, además que el lugar de recolección del material empleado por Lino et al. es Perú.

3.6.- Ensayo de Actividad Antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de hojas y flores de *Tropaeolum majus*, se utilizó el método de DPPH'. Método que se basa en la reducción de DPPH' a DPPH₂ por la aceptación de un átomo de hidrógeno (H); que es donado por la molécula antioxidante, con el consiguiente cambio de color de púrpura a amarillo junto con la disminución de la absorbancia a 515 nm (Mishra et al., 2012c: p. 1041). Se calculó las concentraciones IC₅₀ utilizando el programa BLeSq.

Tabla 7-3. Resultados del IC₅₀.

Tipo de muestra	Resultado de IC ₅₀	Rango
HOJAS	501,69 µg/ml	354,55 - 723,87 µg/ml
FLORES	11119,35 µg/ml	6985,69 - 18701,46 µg/ml

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Cuvelier & Berset (1995c) y Anthony & Saleh (2013), señalan que mientras menor sea el IC₅₀ de una muestra, mayor será su capacidad antioxidante. Por lo tanto, según la tabla 7-3 las hojas de *Tropaeolum majus* poseen mayor actividad que las flores, además que se observa un mayor rango en estas últimas, por lo que se puede decir que las flores poseen poca capacidad antioxidante.

La actividad antioxidante de un compuesto se basa principalmente en su capacidad de eliminar la formación de radicales libres, a través de la donación de átomos de hidrógeno o de electrones (Shem-Tov et al., 2012, p.303).

El alto potencial antioxidante de los compuestos de tipo fenólico, se debe a la presencia de sustituyentes donadores de electrones en la estructura cíclica, así como la cantidad y la disposición de los grupos hidroxilo (Bajalan et al., 2016, p.258). Las hojas de *T. majus* presentan una mayor cantidad de fenoles y flavonoides respecto al resto de partes de la planta, lo que explica que posea, mayor actividad antioxidante que las flores.

Bazylko et al. (2013, p.92), al realizar la evaluación del potencial antioxidante de los extractos acuoso e hidroalcohólico, llegaron a la conclusión de que la actividad de eliminación de DPPH de los extractos probados fue insignificante (entre 25% y 37% a una concentración de 500 g/ml). Sin embargo, los extractos mostraron una fuerte actividad antioxidante en experimentos *ex vivo* en neutrófilos humanos.

En una investigación similar de Bazylko et al. (2014, p.22), la actividad de barrido de DPPH de los extractos probados fue baja, a una concentración de 100 g / ml fue de 24.1 ± 0.7 para el extracto acuoso y 37.5 ± 2.4 para el extracto hidroalcohólico. Mientras que en un ensayo realizado por Garzón & Wrolstad (2009b, p.48) en flores naranjas de *Tropaeolum majus* la actividad de barrido de radicales DPPH fue $91.87 \mu\text{m trolox eq / g Flores}$.

Como se puede apreciar de las investigaciones previas, es baja la capacidad antioxidante tanto de hojas como de flores de capuchina en los ensayos *in vitro*, de varios tipos de extracto. Sin embargo, los resultados difieren significativamente en ensayos *ex vivo*, en el cual el potencial se considera superior.

3.7.- Ensayo de la Actividad Antiinflamatoria

Tabla 8-3. Porcentaje de inhibición de la inflamación de muestras de hojas y flores de *Tropaeolum majus* a diferentes concentraciones.

Concentraciones utilizadas	Inhibición inflamatoria de hojas (%)	Inhibición inflamatoria de flores (%)
200 ppm	$22,28 \pm 3,26$	$10,10 \pm 5,34$
400 ppm	$34,83 \pm 2,25$	$18,36 \pm 1,48$
600 ppm	$42,63 \pm 1,59$	$25,55 \pm 3,74$
800 ppm	$50,20 \pm 1,88$	$32,25 \pm 2,63$
1000 ppm	$52,98 \pm 1,35$	$36,19 \pm 2,41$
IC₅₀	835,04	1763,89
Rango	743,97 - 943,01	1436,83 - 2242,68

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Tabla 9-3. Porcentaje de inhibición de la inflamación de muestras de Aspirina a diferentes concentraciones.

Concentraciones utilizadas	Inhibición inflamatoria (%)
12,5 ppm	9,40 ± 0,74
25 ppm	20,69 ± 5,36
50 ppm	32,62 ± 1,61
100 ppm	54,37 ± 0,51
200 ppm	68,88 ± 3,90

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

En base a los resultados de la tabla 8-3 se observa que las hojas presentan mejores porcentajes de inhibición inflamatoria que las flores para cada una de las concentraciones evaluadas.

No se comparó los resultados de hojas y flores con las soluciones de aspirina, debido a que al preparar soluciones de aspirina a más de 200 ppm, estas perdieron actividad y presentaban valores incongruentes. El mejor resultado de porcentaje de inhibición inflamatoria de la aspirina fue a 200 ppm, mientras que un porcentaje de inhibición aceptable de hojas y flores de *T. majus* se obtuvo a una concentración de 1000 ppm.

Bazylko et al. (2013, pp.92-94) evaluó la actividad antiinflamatoria de una mezcla de hojas y flores de Capuchina por dos métodos. El primero por la determinación de la actividad inhibitoria sobre la hialuronidasa y el segundo la determinación de la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa 1. Los extractos acuoso e hidroalcohólico, no mostraron actividad inhibidora sobre la hialuronidasa, pero curiosamente, se encontró inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa 1 por ambos extractos. Los extractos obtenidos de la hierba liofilizada inhibieron con mayor fuerza la actividad de COX1 (entre el 29% y el 68%) a una concentración de 50 µg/ml, y mostraron un efecto comparable al de la indometacina 2 µM (60,66 ± 1,48%).

Los resultados obtenidos en el estudio de Bazylko (2013, pp.92-94) no difieren mucho de los que se pueden observar en la tabla 8-3, ya que se encontró un rango de inhibición en las hojas de 22,28% a 52,98%, en un rango de concentraciones entre 200 y 1000 ppm, a pesar de ser evaluado por otro método y separar las hojas de las flores.

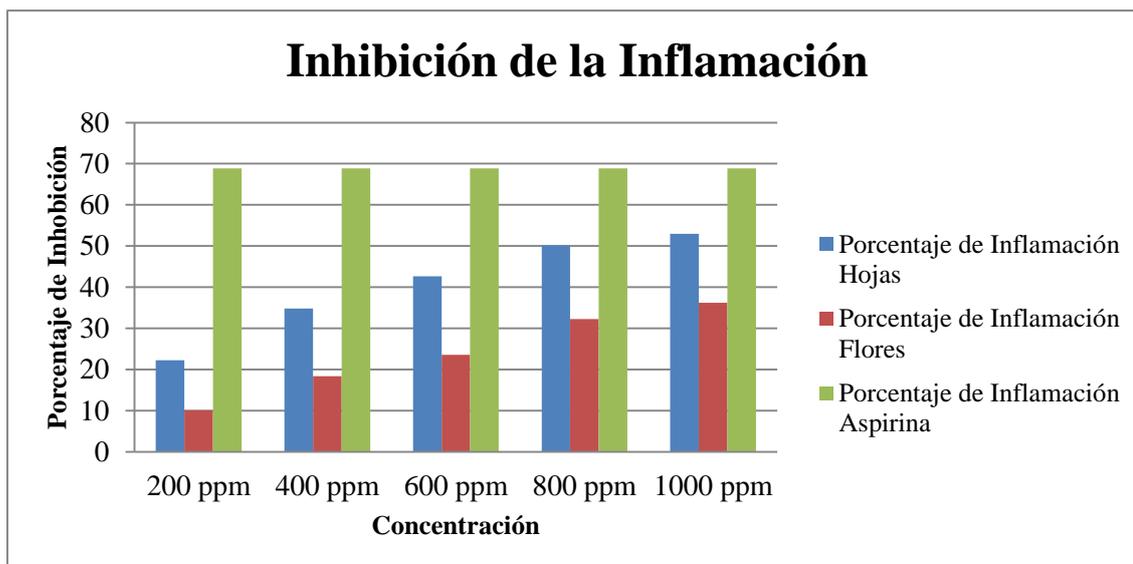


Gráfico 1-3. Porcentaje de inhibición de la inflamación obtenida de flores y hojas de *Tropaeolum majus* a diferentes concentraciones frente a la aspirina.

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Los datos obtenidos en el ensayo se evaluaron estadísticamente usando el programa SPSS. Se realizó un análisis previo de los resultados, sometiéndolos a pruebas de: balanceo, normalidad y homocedasticidad de varianzas.

Los resultados obtenidos del porcentaje de inflamación de los extractos de hojas y flores de *Tropaeolum majus*, se sometieron a una prueba de normalidad. El valor obtenido de $p=0,398$ es mayor a $0,05$ por lo que se aceptó la hipótesis nula ($H_0: \mu_1=\mu_2=\mu_3= \mu_4$) que dice que los datos siguen una distribución normal y se rechazó la hipótesis alternativa ($H_a= \mu_1\neq\mu_2\neq\mu_3\neq \mu_4$), que expone que los datos no siguen una distribución normal. (Anexo L)

En lo referente a la prueba de homocedasticidad de varianzas, el valor de $p=0,595$ nos indica que no podemos rechazar la hipótesis nula (p mayor a $0,05$).

$$\begin{array}{l}
 H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2 \\
 H_1 : \text{al menos una varianza difiere}
 \end{array}
 \left|
 \right.$$

Y concluimos que se cumple el supuesto de homocedasticidad. (Anexo M)

Una vez analizados estos requisitos se realizó una prueba de ANOVA para determinar la similitud en las medias de los datos obtenidos para los extractos de hojas y flores, se plantearon las siguientes hipótesis:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$$

$$H_1 : \text{al menos dos medias no son iguales.}$$

El valor de $p=0,000$, nos lleva a rechazar la hipótesis nula (p menor a $0,05$); por lo que las medias son distintas, al tratarse de dos grupos y no de tres no se puede realizar una prueba post hoc. Sin embargo, en la generación del gráfico se puede observar que estadísticamente el porcentaje de inflamación del extracto de hojas es 1,68 veces mayor que el extracto de flores. (Anexo N).

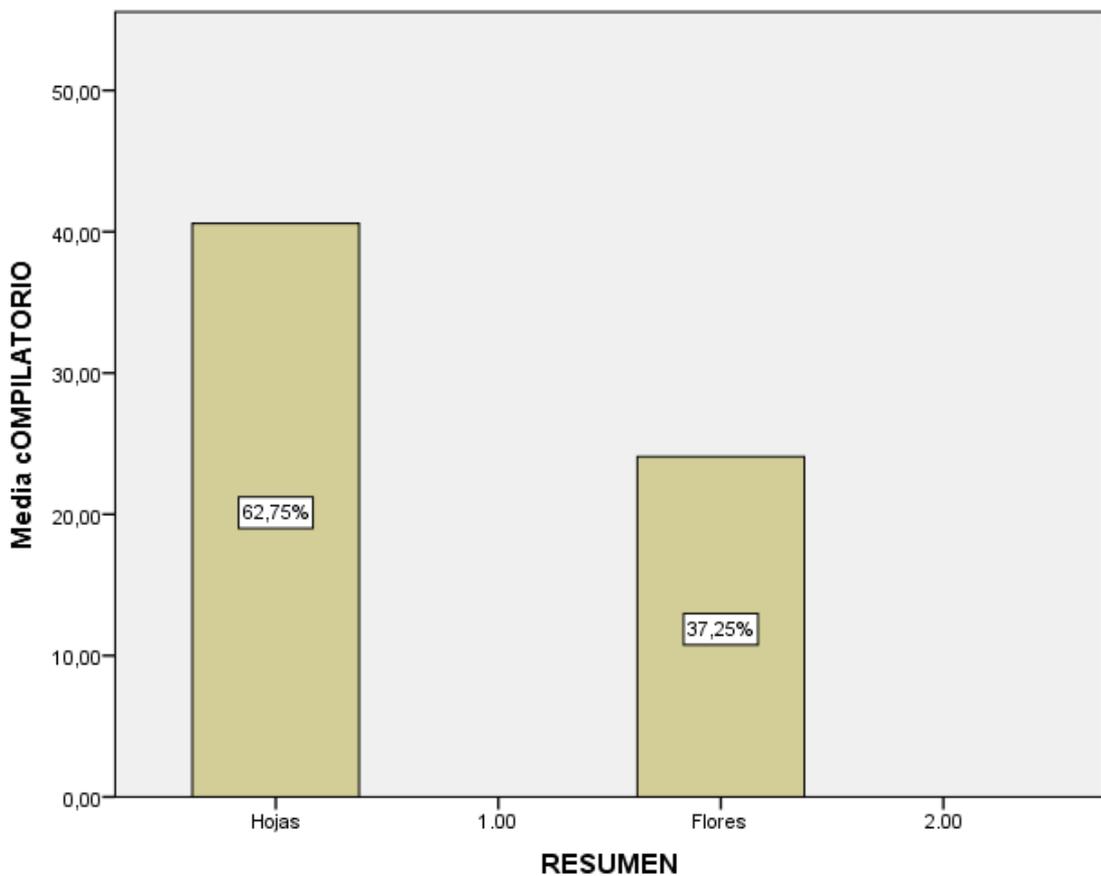


Gráfico 2-3. Media de porcentaje de inhibición de la inflamación obtenida de flores y hojas de *Tropaeolum majus*.

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

Se comparó además el porcentaje de inflamación de los extracto de hojas, flores y ácido acetilsalicílico para determinar si existe diferencias significativas entre los mismos. Previamente se realizó el análisis de balance, normalidad y homocedasticidad de varianzas siguiendo el mismo proceso.

Para la prueba de normalidad, los valores obtenidos fueron de $p=0,165$ para hojas, $p=0,467$ para flores y $p=0,999$ para aspirina, los tres son mayores a $0,05$ (nivel de confianza) se aceptó la

hipótesis nula ($H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$) que dice que los datos siguen una distribución normal en cada caso y se rechazó la hipótesis alternativa ($H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$), que expone que los datos no siguen una distribución normal. (Anexo L)

En lo que tiene que ver con la prueba de homocedasticidad de varianzas, el valor de $p=0,137$, nos indica que no podemos rechazar la hipótesis nula (p mayor a $0,05$).

$$\begin{array}{l} H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2 \\ H_1 : \text{al menos una varianza difiere} \end{array} \left| \right.$$

Y concluimos que se cumple el supuesto de homocedasticidad. (Anexo M)

Una vez analizados estos tres requisitos se realizó una prueba de ANOVA para determinar la similitud en las medias de los datos obtenidos, se plantearon las siguientes hipótesis:

$$\begin{array}{l} H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k \\ H_1 : \text{al menos dos medias no son iguales.} \end{array} \left| \right.$$

Por el valor de $p=0,000$, se rechazó la hipótesis nula (p menor a $0,05$). Por lo que se concluye que las medias son distintas, entonces la pregunta siguiente es: ¿cuáles medias difieren?, para responderla se realizó un Test post hoc de Tukey en el que se concluyó que son significativamente diferente los tres grupos evaluados: el porcentaje de inflamación de flores, hojas y aspirinas, siendo mejor el del grupo del ácido acetilsalicílico. (Anexo N), (Anexo O)

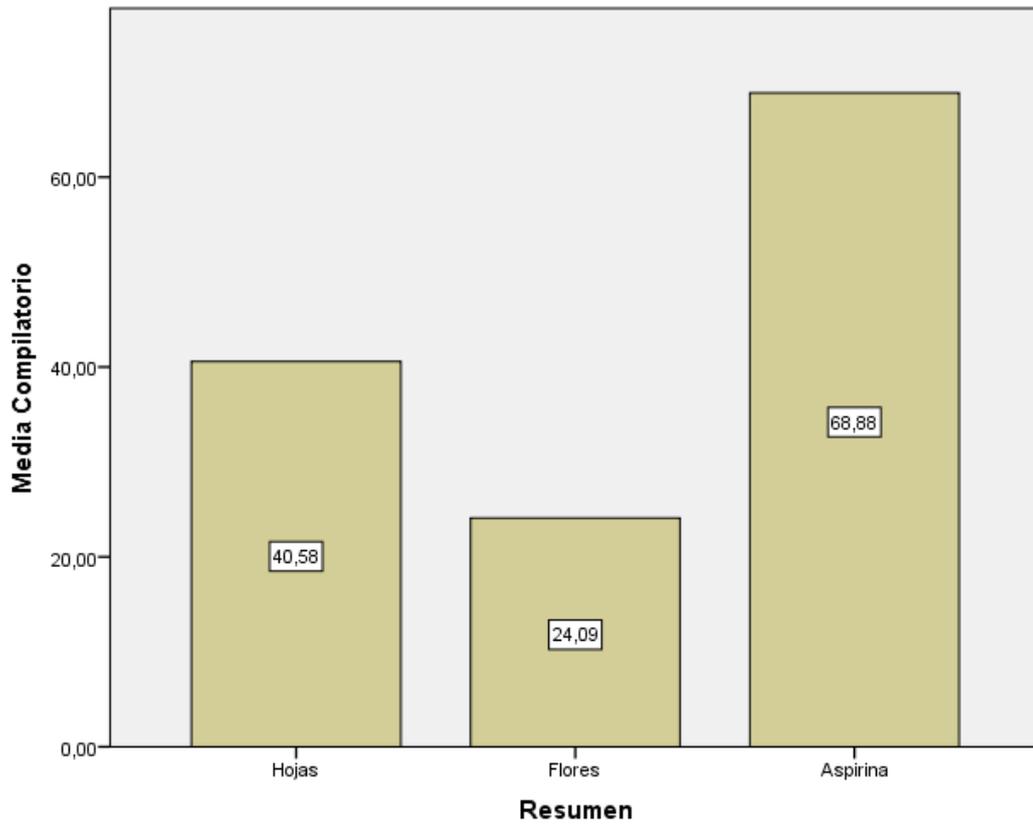


Gráfico 3-3. Media de porcentaje de inhibición de la inflamación obtenida de flores y hojas de *Tropaeolum majus*, comparada con Aspirina a 200 ppm

Realizado por: Ricardo Márquez, 2018.

CONCLUSIONES

Se recolectó la cantidad suficiente de hojas y flores de *Tropaeolum majus*, tomando en cuenta la localización, las condiciones geográficas y climáticas del lugar, para evaluar y discutir los resultados de forma apropiada, ya que son un factor influyente en la presencia o ausencia de metabolitos secundarios en la planta.

Al realizar el tamizaje fitoquímico, los principales metabolitos secundarios que se hallaron fueron: triterpenos y/o esteroides, compuestos fenólicos, taninos y flavonoides, además se encontraron pequeñas cantidades de alcaloides.

La liofilización tanto de hojas como de flores, sirvió para concentrar los metabolitos secundarios, y así determinar su cantidad espectrofotométricamente.

Se cuantificaron tanto flavonoides como fenoles totales, se encontró una mayor cantidad de flavonoides que fenoles, presentando valores de 16817,714 mg Eq Q/g Extracto de Hojas y 14418,286 mg Eq Q/g Extracto de Flores para flavonoides y de 11877,778 mg Eq GAE/g de Extracto de Hojas y 4438,889 mg Eq GAE/g de Extracto de Flores para fenoles.

La capacidad antioxidante de flores y hojas de *Tropaeolum majus*, se evaluó por el ensayo de captación de radical DPPH', encontrándose que las hojas tienen mayor actividad captadora de radicales libres que las flores, con valores de IC₅₀ de 501,69 µg/ml para hojas, y 11119,35 µg/ml para flores.

La capacidad inflamatoria de hojas y flores de *Tropaeolum majus* se expresó a través del IC₅₀, y se halló que el extracto liofilizado de hojas tiene mayor actividad que el extracto de flores, con valores de 835,04 µg/ml para hojas y 1763,89 µg/ml para flores, considerando a éstas últimas menos activas por las posibles interacción de varios metabolitos secundarios.

RECOMENDACIONES

Se recomienda aislar los compuestos presentes en cada parte de la planta, ya que en la mayoría de ensayos realizados hasta ahora se han usado mezclas de hojas y flores y no se han tratado de manera individualizada, descubrir por medio de técnicas cromatográficas y RMN acoplada con espectrometría de masas, las estructuras básicas que determinan la actividad antiinflamatoria a concentraciones altas.

En estudios previos, se ha determinado que la actividad *ex vivo* puede presentar mejores resultados que la actividad *in vitro*, por lo que sería recomendable realizar este tipo de ensayos con esta especie de crecimiento en la región andina y que no ha sido muy estudiada para comparar su rendimiento con estudios de plantas del mismo género recolectadas en otras partes del mundo.

Tropaeolum majus es una especie vegetal que ha sido objeto de diversos estudios en los cuales se han descubierto algunas actividades ya sea en mayor o menor medida tales como: antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerosas, cardioprotectoras, neuroprotectoras, antidiabéticas, antialérgicas y antiasmáticas, que aún se están indagando para conocer su verdadera dimensión y si pueden ser un aporte importante para la sociedad. Sin embargo, en la actualidad se han hallado nuevas propiedades que deben ser estudiadas a profundidad; ya que abren la posibilidad de tratar una patología tan grave como el cáncer, el descubrimiento del isotiocianato de bencilo (BITC) en la capuchina debe investigarse para conocer su efecto en el organismo humano y su posible uso para tratar el cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE MEDICAMENTOS, ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA MÉDICA. *Farmacopea Argentina*. 7^a Ed. Buenos Aires-Argentina: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2003, pp. 34-40

ALHAKMANI, F., KUMAR, S. y KHAN, S.A., Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 3, no. 8, 2013, pp. 623-627. ISSN 22211691. DOI 10.1016/S2221-1691(13)60126-4.

ANTHONY, K.P. y SALEH, M.A., Free Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Silymarin Components. , 2013, pp. 398-407. DOI 10.3390/antiox2040398.

ASTURNATURA, “*Tropaeolum majus L.*” [en línea]. Buenos Aires: Asturnatura, 2016. [Consulta: 28 febrero 2018]. Disponible en: <https://www.asturnatura.com/especie/tropaeolum-majus.html>.

BAJALAN, I. , et.al., Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of extracts from different populations of lavender. *Industrial Crops & Products* [en línea], vol. 87, 2016, pp. 255-260. ISSN 0926-6690. DOI 10.1016/j.indcrop.2016.04.059. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.059>.

BINET, P., BALSLEV, H., , et.al., Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador. *Herbario QCA & Herbario AAU*, vol. 1, 2008, pp. 1-3.

BINET, P., AVÉ, C., GALONS, H., MIOCQUE, M., RINJARD, P., y TRAN, G. 1994. Antihypertensive hydrazidones: α -aminoacylated 2-chlorobenzylidene hydrazines. *European Journal of Medicinal Chemistry* [en línea], vol. 29, no. 5, pp. 389-392. [Consulta: 22 marzo 2018]. DOI 10.1016/0223-5234(94)90064-7. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0223523494900647>.

BOERIS, M.A., TOSO, R.E. y SKLIAR, M.I., Actividad antiinflamatoria de *Salpichroa origanifolia*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, vol. 23, no. 2, 2004, pp. 138-141. ISSN 03262383.

BÓRDES, R., El proceso inflamatorio. *Revista de Enfermería* [en línea], vol. 4, 2014, pp. 9-12. Disponible en: <http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero4/pinflamatorio4.htm>.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E. y BERSET, C., "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *LWT - Food Science and Technology* [en línea], 1995, (Estados Unidos) vol. 28, no. 1, pp. 25-30. [Consulta: 28 febrero 2018]. DOI 10.1016/S0023-6438(95)80008-5. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643895800085>.

BREMNESS L. *Manual del herborista*. Madrid-España: Raíces, 1993, p. 285.

CASTILLO SÁNCHEZ, J. y BENAVENTE-GARCÍA, O. "FLAVONOIDES CONTRA LAS RADIACIONES". *Revista de la Universidad de Murcia* [en línea], 2009, vol. 12, no. 3, pp. 23-56. [Consulta: 24 abril 2018]. Disponible en: <https://www.um.es/lafem/Nutricion/DiscoLibro/07-Modificaciones/Saber mas/07-09.pdf>.

CHÁVEZ, J.P. *Listas de Plantas Medicinales del Ecuador y para qué sirven*. [blog]. Quito-Ecuador: Foros Ecuador, 2013. [Consulta: 28 febrero 2018]. Disponible en: <http://www.forosecuador.ec/forum/aficiones/salud/117954-lista-de-plantas-medicinales-del-ecuador-y-para-que-sirven>.

CLIMATE DATA ORG. *Clima: Ambato* [en línea]. México D.F: Climate Data Org, 2018. [Consulta: 24 abril 2018]. Disponible en: <https://es.climate-data.org/location/2957/>

CLIMATE DATA ORG. *Clima: Guano* [en línea]. México D.F: Climate Data Org, 2018. [Consulta: 24 abril 2018]. Disponible en: <https://es.climate-data.org/location/25406/>

CUVELIER, M.E. y BERSET, C., Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. , vol. 30, 1995, pp. 25-30.

DAVID, P; BAILEY, PJ; GLODENBERG, MM; FORD-HUTCHINSON, AW. “The role of the arachidonic acid products in pain and inflammation”. *Ann. Rev. Immunol*, vol. 2, nº 4 (1984), (Estados Unidos); p. 335.

DEMATTI MESP Y COAN RM. *Jardins com plantas medicinais*. París Francia: Jaboticabal: FUNEP, 1999, p. 65.

DE MEDEIROS, J.M.R., MACEDO, M., CONTANCIA, J.P., NGUYEN, C., CUNNINGHAM, G., MILES, D.H., “Antithrombin activity of medicinal plants of the Azores”. *Journal of Ethnopharmacology*, vol: 72, (2000), (Portugal), pp. 157–165.

FONT QUER P. *Plantas medicinales: el dioscórides renovado*. Barcelona-España: Labor, 1993, p. 1033.

GALLIN, JI. *Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) Fundamental Immunology.*, New York-Estados Unidos: Raven Press, 1989, pp.721-733

GALLIN, JI; GOLDSTEIN, IM; SNYDERMAN, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, New York-Estados Unidos: Raven Press, 1988, pp. 804-812

GOBIERNO PROVINCIAL DE TUNGURAHUA. *Plan Provincial de Riego Tungurahua 2014-2029* [en línea]. Ambato-Ecuador: Gobierno Provincial de Tungurahua, 2014. [Consulta: 24 abril 2018]. Disponible en: <http://rrnn.tungurahua.gob.ec/documentos/ver/549888cc83ba884a6000007d>.

GÓMEZ ESTRADA, H.A., GONZÁLEZ RUIZ, K.N. y MEDINA, J.D., Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, vol. 10, no. 3, 2011, pp. 182-217. ISSN 07177917.

GOOS, K.H., ALBRECHT, U., SCHNEIDER, B., “Efficacy and safety profile of a herbal drug containing nasturtium herb and horseradish root in acute sinusitis, acute bronchitis and acute urinary tract infection in comparison with other treatments in the daily practice/results of a prospective cohort study”. *Arzneimittelforschung*, vol. 56, n° 4 (2006), (United State of America) pp. 249–257.

GUZMÁN-PÉREZ, V., BUMKE-VOGT, C., SCHREINER, M., MEWIS, I., BORCHERT, A. y PFEIFFER, A.F.H. "Benzylglucosinolate Derived Isothiocyanate from *Tropaeolum majus* Reduces Gluconeogenic Gene and Protein Expression in Human Cells. En: P. MUKHOPADHYAY (ed.)", *PLOS ONE* [en línea], 2016, (Perú), vol. 11, no. 9, pp. e0162397. [Consulta: 5 abril 2018]. DOI 10.1371/journal.pone.0162397. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0162397>.

HAN, G.Q., PAN, J.X., LI, C.L., TU, F., “The screening of Chinese traditional drugs by biological assay and the isolation of some active components”. *International Journal of Chinese Medicine*, vol. 16, n° 6 (1991), (China) pp. 1–17.

INOCAR. *Información General de la República del Ecuador*. [en línea]. Guayaquil-Ecuador: INOCAR, 2012. [Consulta: 4 marzo 2018]. Disponible en: https://www.inocar.mil.ec/docs/derrotero/derrotero_cap_I.pdf

INOSTROZA, L., CASTRO, A., HERNÁNDEZ, E., CARHUAPOMA, M., YULI, R., COLLADO, A., & CÓRDOVA, J. “Actividad antioxidante de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (mashua) y su aplicación como colorante para yogur”. *Ciencia e Investigación* [en línea], 2017, (Perú) vol. 18, (n° 2), pp. 83-89. [Consulta: 4 marzo 2018]. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/13615>

INSTITUTO ECUATORIANO DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS. *Estadísticas de Camas y Egresos Hospitalarios – 2014* [en línea]. Quito-Ecuador: INEC. [Consulta: 4 marzo 2018]. Disponible en: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-de-camas-y-egresos-hospitalarios-2014/>

INSTITUTO ECUATORIANO DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS. *Cantón Ambato* [en línea]. Quito-Ecuador: INEC. [Consulta: 24 abril 2018]. Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Bibliotecas/Fasciculos_Censales/Fasc_Cantoniales/Tungurahua/Fasciculo_Ambato.pdf

INTERNATIONAL MYCOTHERAPY INSTITUTE. *"Importancia terapéutica de los triterpenos en Ganoderma lucidum."* [en línea]. Boston: International Mycotherapy Institute, 2014 [Consulta: 24 abril 2018]. Disponible en: <http://www.imispain.com/publicaciones/triterpenosganodermaalucidum/>.

ISHIZAKA, K. "Most cell activation an mediator release". *Progress in Allergy*, vol. 34, n° 1 (1984), (Estados Unidos) pp. 23-32.

KOO, CH; SHERMAN, JW; BAND, L; GOETZL, E. *Molecular diversity of human leukocyte receptors. Prostaglandin Thromboxane Leucotriene.* Boston-United States: Graw-Hill, 1989, pp. 191-198

LARSEN, GL; HERISON, PM. "Mediators of inflammation". *Rev. Immunol*, vol. 3, n° 6 (1983), (Estados Unidos) p. 335.

LOPEZ, T., Flavonoides. , vol. 21, 2017, pp. 108-114.

MALE, DK; CHAMPION, B; COOKE, A; OWEN, M. *Cell troffic and inflammation. Advance Immunology.* 2ª ed. New York-United States: Gower, 1991 pp. 890-934.

MARTÍNEZ BELTRÁN, M. Valoración de la lesión medular traumática mediante espectroscopia de RMN de protones (ERMNH1) Estudio experimental. (Tesis) (Doctoral). Universidad de Granada, Granada España. 1992. pp. 34-45

MAZÓN, N., CASTILLO T., R., VELÁSQUEZ, J., BARRERA, J. *Las plantas medicinales de la Sierra ecuatoriana: Biodiversidad y usos.* Quito, Ecuador: INIAP,

Estación Experimental Santa Catalina, Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos, 1997, (Plegable s/n.p).

MINISTERIO DEL AMBIENTE DE LA REPÚBLICA DEL ECUADOR. *Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030*

MINISTERIO DE SALUD DE CHILE. *Medicamentos Herbarios Tradicionales. 103 especies.* [en línea]. Santiago de Chile-Chile: Gobierno de Chile, 2009. [Consulta: 23 marzo 2018]. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/126188271/103-Plantas-medicinales-MINSAL>.

MIRANDA, M., *Farmacognosia y productos naturales.* La Habana Cuba, 2006.

MISHRA, K., OJHA, H. y CHAUDHURY, N.K., Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH Å assay : A critical review and results. *Food Chemistry* [en línea], vol. 130, no. 4, 2012, pp. 1036-1043. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/j.foodchem.2011.07.127. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), *Quality control methods for herbal materials.* 1998.

ORTIZ DE BOADA D AND COGUA J. 1989. “Reconocimiento de granos de polen de algunas plantas melíferas en la sabana de Bogotá”. *Agronomía Colombiana*, vol. 6, n° 6 (1989), (Colombia) pp. 52–63.

PICCIARELLI, P., ALPI, A., “Embryo-suspensor of *Tropaeolum majus*: identification of gibberellin A63”. *Phytochemistry*, vol. 26, no. 3 (1987), (Italia) pp. 329–330.

PICCIARELLI, P., ALPI, A., PISTELLI, L., SCALET, M., “Gibberellin-like activity in suspensors of *Tropaeolum majus* L. and *Cytisus laburnum* L. Planta”. *Phytochemistry*, vol. 16, no. 16 (1984), (Italia) pp. 162, 566–568.

PINTÃO, A.M., PAIS, M.S., COLEY, H., KELLAND, L.R., JUDSON, I.R., 1995. “In vitro and in vivo antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*”. *Planta Medica*, vol. 61, no. 12 (1995), (Italia) pp. 233–236.

PLANTAS MORENAL. *Taco de Reina - Tropaeolum majus*. [blog]. Buenos Aires: Plantas Morenal, 2015. [Consulta: 23 marzo 2018]. Disponible en: <http://plantasmorenal.blogspot.com/2011/05/taco-de-reina-tropaeolum-majus.html>

MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. *Real Farmacopea Española*. 2ª Ed. Madrid-España: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002, pp. 84-90

ROCHE, Cell Proliferation Reagent WST-1. *Cell Proliferation*, vol. 1, no. 11, 2007, pp. 1-4. ISSN 0006291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2008.07.050.

RODRÍGUEZ CARRANZA, R., Farmacología de la inflamación y de las alergias. *Guía de farmacología y terapéutica*, 2014, pp.77-83.

ROIT, IM; BROSTOFF, J; MALE, DK. *Inmunología*. 2ª ed. Barcelona-España: Salvat, 1992, pp. 945-1010

ROSAS, J., ROMAN, J., CASTELLANO, J., BELMONTE, M. *Enfermedades Reumáticas. Actualización SVR*. 2ª ed. Valencia-España: Sociedad Valenciana de Reumatología, 2013, pp. 469-476.

SANGALLI A, VIEIRA MC AND ZARATE NAH. “Resíduos Orgânicos e Nitrogênio na Produção de Biomassa da Capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)” ‘*JEWEL*’. *Cien Agrot*, vol. 28, no. 4, (2004), (Brasil) pp. 831–839.

SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO. *Memoria Técnica del Cantón Guano* [en línea]. Guano-Ecuador: SENPLADES, 2012. [Consulta: 24 abril 2018]. Disponible en: http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/ZONA3/NIVEL_DEL_PDOT_CANTONAL/CHIMBORAZO/GUANO/IEE

/MEMORIAS_TECNICAS/mt_guano_geopedologia.pdf.

SHEM-TOV, Y., et.al., Determination Of Total Polyphenol, Flavonoid And Anthocyanin Contents And Antioxidant Capacities Of Skins From Peanut (*Arachis Hypogaea*) Lines With Different Skin Colors. *Journal of Food Biochemistry*, vol. 36, no. 3, 2012, pp. 301-308. ISSN 01458884. DOI 10.1111/j.1745-4514.2011.00539.x.

SNYDERMAN, R; PIKE, MC. “Chemoattractant receptors on phagocytic cells”. *Rev. Immunol.*, vol. 257, no.2, (1984), (United States) pp.56-78

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA. *Sistemática de Plantas Vasculares-Tropaeolum majus*. [en línea]. Montevideo-Uruguay: Universidad de la República, 2011. [Consulta: 23 marzo 2018]. Disponible en: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/tropaeolaceae.html

VILLALBA, E., 2014. “Inflamación P”. *Revista de Actualización Clínica*, vol. 43, no.15, (España) pp. 2261-2265.

TAN, A.S. y 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., vol. 238, 2000, pp. 59-68.

ZANETTI, G.D., MANFRON, M.P., HOELZEL, S.C.S., 2004. “Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae)”. *IHERINGIA Série Botânica*, vol. 59, no.33 (2003), (Brasil) pp. 173–178.

ANEXOS

Anexo A: Localización, y proceso de secado de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.

Gráfico 1A Lugar de Recolección

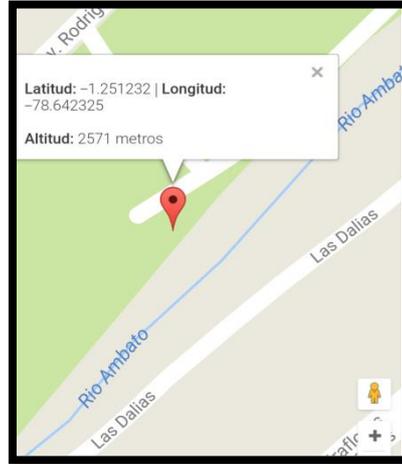


Gráfico 2A Secado de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.



Anexo B. Hojas y flores secas de *Tropaeolum majus* obtenidas de los extractos.

Gráfico 1B Extracto Etéreo



Gráfico 2B Extracto alcohólico.



Gráfico 3B Extracto acuoso.



Anexo C. Extractos de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*.

Gráfico 1C Extracto Etéreo



Gráfico 2C Extracto alcohólico.



Gráfico 3C. Extracto acuoso.



Anexo D. Tamizaje Fitoquímico de las Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* del Extracto Etéreo.

Gráfico 1D Hojas de *Tropaeolum majus* del Extracto Etéreo.

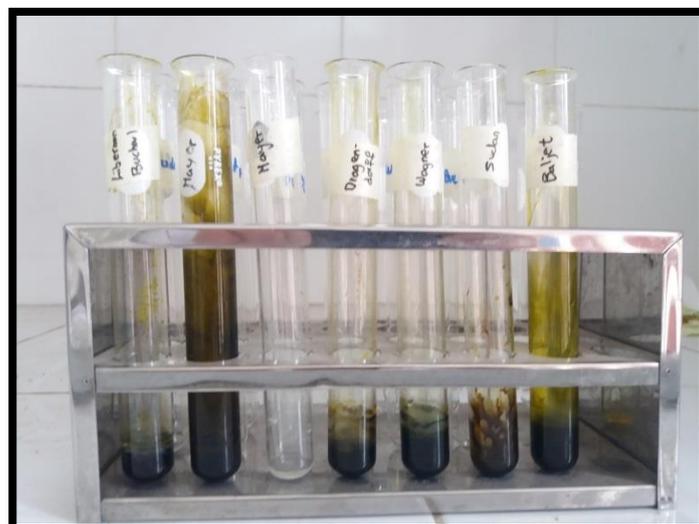


Gráfico 2D Flores de *Tropaeolum majus* del Extracto Etéreo.



Gráfico 3D Hojas de *Tropaeolum majus* del Extracto Alcohólico.



Gráfico 4D Flores de *Tropaeolum majus* del Extracto Alcohólico.



Gráfico 5D Hojas de *Tropaeolum majus* del Extracto Acuoso.



Gráfico 6D Flores de *Tropaeolum majus* del Extracto Acuoso.



Anexo E. Determinación de la Humedad de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*.

Gráfico 1E Muestras para la Determinación de la Humedad



Gráfico 2E Peso de las muestras de Humedad de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*.



Anexo F. Determinación de Cenizas Totales, Solubles e Insolubles

Gráfico F1 Calcinación de Muestras de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*.



Gráfico F2 Determinación de Cenizas Totales de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*.



Gráfico F3 Cenizas Solubles e Insolubles de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*.



Anexo G. Extractos Hidroalcohólicos de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus*.

Gráfico G1 Extractos Hidroalcohólicos



Gráfico G2 Determinación de la Densidad Relativa de los Extractos Hidroalcohólicos



Anexo H. Liofilización de los Extractos Hidroalcohólicos.

Gráfico H1 Proceso de Liofilizado



Gráfico H2 Extracto Hidroalcohólico de Flores de *Tropaeolum majus* Liofilizado.



Anexo I. Soluciones de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* para determinación de Fenoles y Flavonoides.

Gráfico 1I Soluciones Madres

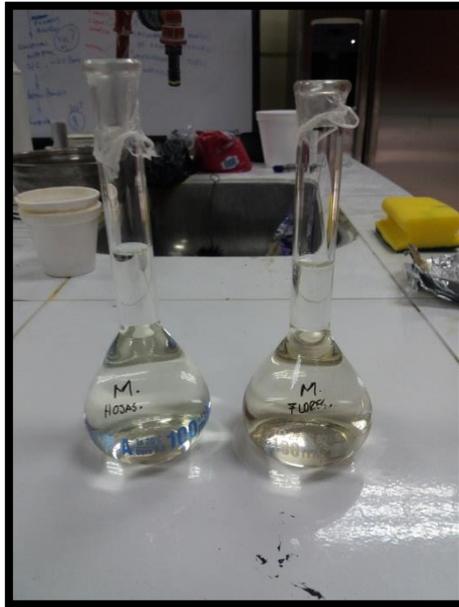


Gráfico 2I Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la cuantificación de fenoles totales

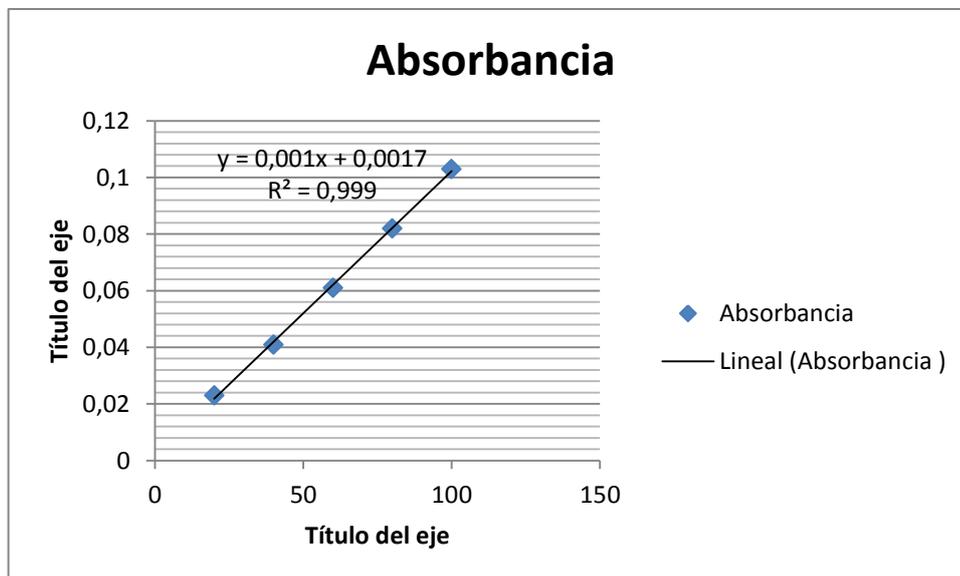
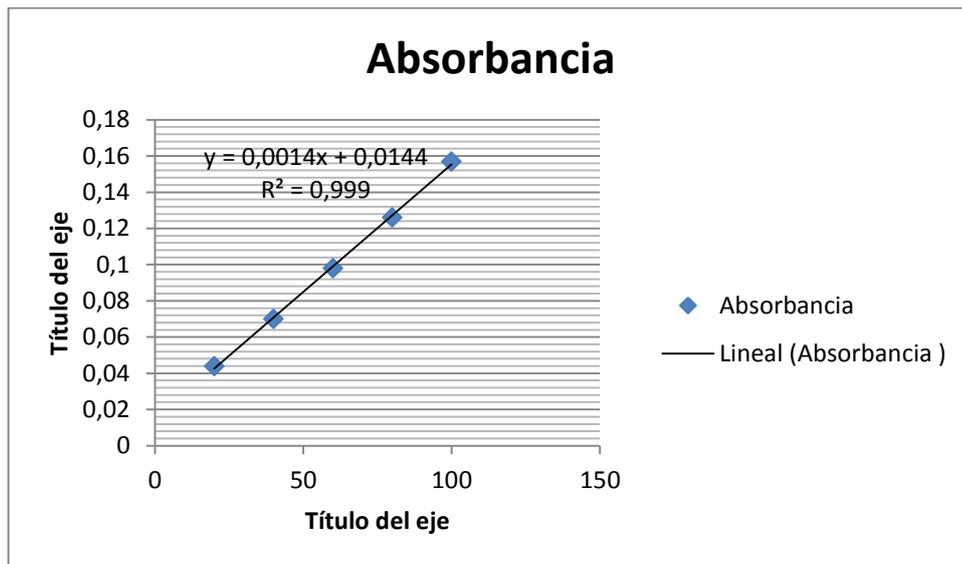


Gráfico 3I Curva de calibración de quercetina utilizada para la cuantificación de flavonoides.



Anexo J. Determinación de Capacidad Antioxidante de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* para Gráfico 1J Soluciones Madres



Tabla 1J Captación de DPPH % de Hojas de *Tropaeolum majus*

Concentraciones utilizadas (ppm)	Captación de DPPH % (hojas)
10	2,04
20	3,33
50	5,16
100	10,39
200	18,95
500	41,98
1000	83,22

Tabla 2J Captación de DPPH % de Flores de *Tropaeolum majus*

Concentraciones utilizadas (ppm)	Captación de DPPH % (flores)
10	1,63
20	2,24
50	3,13
100	3,53
200	5,84
500	12,98
1000	24,86

Anexo K. Ensayo de la Actividad Antiinflamatoria de *Tropaeolum majus*.

Gráfico 1K Muestras de Hojas y Flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina a diferentes concentraciones



Gráfico 2K Muestras previo a la Incubación

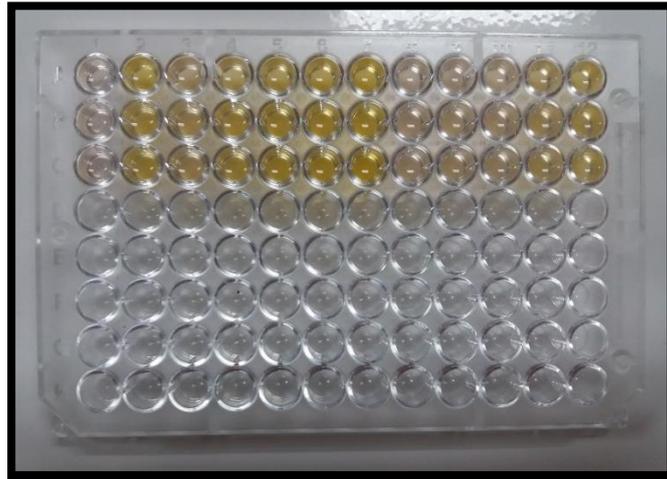


Gráfico 3K Muestras posterior a la Incubación

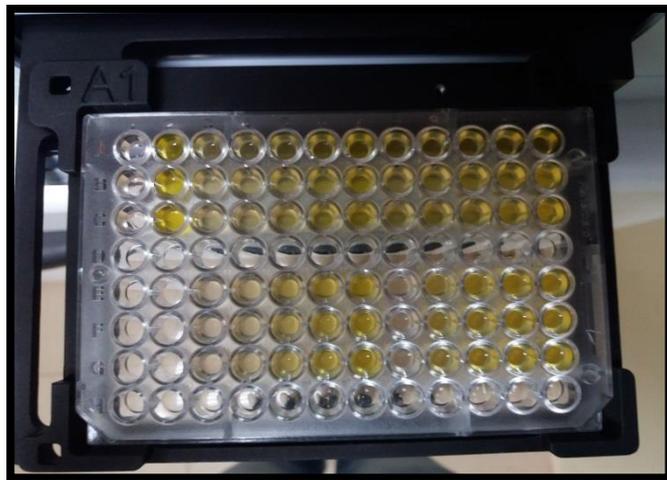


Gráfico 4K Equipo de Lectura de Absorbancias.



Anexo L. Pruebas de Normalidad para los datos obtenidos de hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Ácido Acetilsalicílico.

Gráfico 1L Prueba de Normalidad de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
cOMPILATORIO	,090	30	,200 [*]	,964	30	,398

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Gráfico 2L Prueba de Normalidad de hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina

Pruebas de normalidad

Resumen	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Compilatorio Hojas	,166	15	,200 [*]	,916	15	,165
Flores	,157	15	,200 [*]	,946	15	,467
Aspirina	,175	3	.	1,000	3	,999

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Anexo M. Prueba de Homogeneidad de Varianzas de los datos

Gráfico 1M. Prueba de Homogeneidad de Varianzas de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.

Prueba de homogeneidad de varianzas

cOMPILATORIO

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,289	1	28	,595

Gráfico 2M. Prueba de Homogeneidad de Varianzas de hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Compilatorio

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,126	2	30	,137

Anexo N. Prueba de ANOVA de los datos.

Gráfico 1N. Prueba de ANOVA de hojas y flores de *Tropaeolum majus*.

ANOVA

cOMPILATORIO

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2040,225	1	2040,225	17,088	,000
Dentro de grupos	3343,120	28	119,397		
Total	5383,345	29			

Gráfico 2N. Prueba de Homogeneidad de Varianzas de hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina.

ANOVA

Compilatorio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5681,602	2	2840,801	25,263	,000
Dentro de grupos	3373,462	30	112,449		
Total	9055,064	32			

Anexo O. Prueba Post Hoc (TUKEY) para hojas, flores de *Tropaeolum majus* y Aspirina.

Gráfico 1O Descriptivos de la Prueba Tukey.

Descriptivos

Compilatorio

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Hojas	15	40,5833	11,65779	3,01003	34,1275	47,0392	18,97	54,35
Flores	15	24,0900	10,14348	2,61904	18,4727	29,7073	5,75	38,45
Aspirina	3	68,8767	3,89500	2,24878	59,2009	78,5524	64,98	72,77
Total	33	35,6585	16,82173	2,92829	29,6938	41,6232	5,75	72,77

Gráfico 20 Comparaciones múltiples entre los grupos.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Compilatorio

	(I) Resumen	(J) Resumen	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	Hojas	Flores	16,49333*	3,87210	,001	6,9476	26,0391
		Aspirina	-28,29333*	6,70668	,001	-44,8271	-11,7596
	Flores	Hojas	-16,49333*	3,87210	,001	-26,0391	-6,9476
		Aspirina	-44,78667*	6,70668	,000	-61,3204	-28,2529
	Aspirina	Hojas	28,29333*	6,70668	,001	11,7596	44,8271
		Flores	44,78667*	6,70668	,000	28,2529	61,3204

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Gráfico 30 Subconjuntos Homogéneos

Compilatorio

Resumen	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	
HSD Tukey ^{a,b}	Flores	15	24,0900		
	Hojas	15		40,5833	
	Aspirina	3			68,8767
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Tukey B ^{a,b}	Flores	15	24,0900		
	Hojas	15		40,5833	
	Aspirina	3			68,8767

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

- a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,429.
- b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

Gráfico 40 Gráfico de Medias

