



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
CITOTÓXICA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE
HOJAS DE *Sigesbeckia serrata* DC.”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Previo a la obtención del Título de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

AUTORA: MARÍA JOSÉ RIVERA GUILCAPI

TUTORA: DRA. SUSANA ABDO LÓPEZ, M.SC.

**Riobamba-Ecuador
2018**

©2018, María José Rivera Guilcapi

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El tribunal del Trabajo de Titulación certifica que el trabajo de investigación: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE HOJAS DE *Sigesbeckia serrata* DC** de responsabilidad de la señorita María José Rivera Guilcapi, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Susana Abdo, M.Sc.

DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN

BQF. Diego Vinuesa, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

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

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

MARÍA JOSÉ RIVERA GUILCAPI

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, María José Rivera Guilcapi soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

MARÍA JOSÉ RIVERA GUILCAPI

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación se lo dedico a Dios, a mi familia y sobre todo a mi madre María Teresa Rivera Guilcapi, ya que con su apoyo incondicional he podido culminar con éxito esta etapa tan importante en mi vida, ya que ha sido mi mano derecha durante todo este tiempo.

María José

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios en primer lugar, por su amor y su bondad infinita, que gracias a él puedo sentirme feliz ante todos mis logros que son resultados de su ayuda, y cuando caigo y me pone a prueba, aprendo de mis errores para que mejore como ser humano. El elaborar este trabajo de titulación ha sido una gran bendición en todo sentido y le agradezco a mis abuelitos y en especial a mi madre, que ha sido sumamente importante por estar siempre no solo en esta etapa de mi vida sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mí como persona, y no cesan mis ganas de decir que es gracias a usted que esta meta, está cumplida. A mi compañero de vida durante este tiempo te agradezco por tu desinteresada ayuda, por echarme una mano cuando siempre la necesité, por aportar considerablemente en esta etapa de mi vida eres un gran hombre y me encanta tenerte a mi lado La vida se encuentra plagada de retos, y uno de ellos es la universidad, tras verme dentro de ella, más que ser un reto es una base no solo en adquirir conocimientos en el campo en el que me he visto inmersa sino para lo que concierne a la vida y mi futuro. Les agradezco a mis maestros por haberme formado como una excelente profesional y por su esfuerzo diario y a los buenos amigos que hice en mi vida universitaria, por la ayuda brindada y los buenos momentos que convivimos que son únicos e inolvidables.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	xvi
SUMMARY	xvii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1 Género <i>Sigesbeckia</i>	5
1.2 <i>Sigesbeckia serrata</i> DC	5
1.2.1 <i>Nombres comunes</i>	5
1.2.2 <i>Sinónimos</i>	6
1.2.3 <i>Taxonomía</i>	6
1.2.4 <i>Descripción botánica</i>	6
1.2.5 <i>Hábitat</i>	7
1.2.6 <i>Rango</i>	7
1.2.7 <i>Usos etnobotánicos</i>	7
1.2.8 <i>Investigaciones de actividad biológica y farmacológica</i>	8
1.3 Respuesta inflamatoria	9
1.3.1 <i>Compuestos antiinflamatorios naturales</i>	12
1.3.2 <i>Mecanismo de acción de flavonoides como antiinflamatorios</i>	13
1.4 Antioxidantes	15
1.4.1 <i>Antioxidantes y antiinflamatorios</i>	17
1.5 Compuestos fenólicos y su cuantificación	18
1.6 Flavonoides y su análisis	20
1.7 Ensayo de capacidad de captación de radicales por DPPH.....	20
1.8 Uso de sales de tetrazolio en biología celular	21
CAPÍTULO II	
2. MARCO METODOLÓGICO.....	22
2.1 Lugar de investigación.....	22
2.2 Recolección de material vegetal	22
2.3 Identificación del material vegetal.....	22
2.4 Materiales, Equipos y Reactivos	22
2.4.1 <i>Material vegetal</i>	23
2.4.2 <i>Material biológico</i>	23
2.4.3 <i>Material farmacológico</i>	23

2.4.4	<i>Materiales de laboratorio</i>	23
2.4.5	<i>Equipos de laboratorio</i>	24
2.4.6	<i>Reactivos</i>	25
2.5	Técnicas y métodos	26
2.5.1	<i>Determinación de los parámetros de control de calidad de la droga cruda</i>	26
2.5.2	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	26
2.5.3	<i>Determinación de cenizas totales</i>	27
2.5.4	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	28
2.5.5	<i>Determinación de cenizas solubles en ácido clorhídrico</i>	28
2.5.6	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	29
2.5.6.1	<i>Extracción</i>	29
2.5.6.2	<i>Ensayo de Sudán</i>	32
2.5.6.3	<i>Ensayo de Dragendorff</i>	32
2.5.6.4	<i>Ensayo de Mayer</i>	32
2.5.6.5	<i>Ensayo de Wagner</i>	32
2.5.6.6	<i>Ensayo de Baljet</i>	33
2.5.6.7	<i>Ensayo de Libermann-Burchard</i>	33
2.5.6.8	<i>Ensayo de resinas</i>	34
2.5.6.9	<i>Ensayo de la espuma</i>	34
2.5.6.10	<i>Ensayo de cloruro férrico</i>	34
2.5.6.11	<i>Ensayo de Shinoda</i>	35
2.5.6.12	<i>Ensayo de Borntrager</i>	35
2.5.6.13	<i>Ensayo de antocianidinas</i>	35
2.5.6.14	<i>Ensayo de mucílagos</i>	35
2.5.6.15	<i>Ensayo de principios amargos y astringentes</i>	36
2.5.7	<i>Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado</i>	36
2.5.8	<i>Determinación de fenoles totales</i>	36
2.5.9	<i>Determinación de flavonoides totales</i>	37
2.5.10	<i>Capacidad antioxidante</i>	37
2.5.11	<i>Aislamiento de neutrófilos de sangre humana</i>	38
2.5.12	<i>Ensayo de citotoxicidad in vitro con neutrófilos aislados</i>	38
2.5.13	<i>Ensayo antiinflamatorio in vitro con neutrófilos aislados</i>	39
CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1	Control de calidad de droga cruda de <i>Sigesbeckia serrata</i>	41
3.2	Tamizaje fitoquímico	42

3.3	Control de calidad del extracto hidroalcohólico.....	43
3.4	Cuantificación de fenoles totales.....	44
3.5	Cuantificación de flavonoides totales	45
3.6	Actividad antioxidante in vitro	46
3.7	Actividad antiinflamatoria in vitro.....	49
3.8	Actividad citotóxica in vitro	52
CAPÍTULO IV		
	CONCLUSIONES.....	56
	RECOMENDACIONES.....	57
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Materiales utilizados en el laboratorio	23
Tabla 2-2:	Equipos utilizados en el laboratorio	24
Tabla 3-2:	Reactivos utilizados en el laboratorio.....	25
Tabla 4-2:	Protocolo para la realización del ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> de <i>Sigesbeckia serrata</i> .DC.	39
Tabla 1-3:	Control de calidad de droga cruda de <i>Sigesbeckia serrata</i>	41
Tabla 2-3:	Tamizaje fitoquímico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	42
Tabla 3-3:	Parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	43
Tabla 4-3:	Cuantificación de fenoles totales en extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	45
Tabla 5-3:	Cuantificación de fenoles totales en extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	46
Tabla 6-3:	Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	47
Tabla 7-3:	Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	50
Tabla 8-3:	Actividad citotóxica <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	47
Gráfico 2-3: Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	48
Gráfico 3-3: Actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	50
Gráfico 4-3: Actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	51
Gráfico 5-3: Actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	53
Gráfico 6-3: Actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Sigesbeckia serrata</i>	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2:	Protocolo de extracción para el tamizaje fitoquímico	30
Figura 2-2:	Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.	31
Figura 3-2:	Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico	31
Figura 4-2:	Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.	31

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A.** Actividad antioxidante
- Anexo B.** Análisis estadísticos de la actividad antiinflamatoria
- Anexo C.** Análisis estadístico de la actividad citotóxica
- Anexo D.** Droga cruda de *Sigesbeckia serrata*
- Anexo E.** Control de calidad de droga cruda
- Anexo F.** Control de calidad de extracto hidroalcohólico
- Anexo G.** Tamizaje fitoquímico
- Anexo H.** Preparación de extractos
- Anexo I.** Cuantificación de fenoles y flavonoides
- Anexo J.** Obtención de neutrófilos aislados
- Anexo K.** Actividad citotóxica
- Anexo L.** Actividad antiinflamatoria
- Anexo M.** Actividad antioxidante
- Anexo N.** Patente no comercial de manejo de flora silvestre
- Anexo O.** Contrato marco de acceso a los recursos genéticos entre
Ministerio de Ambiente y ESPOCH
- Anexo P.** Guía de movilización interna de especímenes de flora silvestre

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<i>S. serrata</i> =	<i>Sigesbeckia serrata</i>
UV=	Radiación ultravioleta
AINE=	Antiinflamatorio no esteroide
OMS=	Organización Mundial de la Salud
DPPH=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
COX=	Ciclooxigenasa
NO=	Óxido nítrico
IL=	Interleucina
TNF=	Factor de necrosis tumoral
LPS=	Lipopolisacáridos
ROS=	Especies reactivas de oxígeno
SOD=	Superóxido dismutasa
ADN=	Ácido desoxirribonucleico
LDL=	Lipoproteína de baja densidad
IC50=	Concentración que inhibe el 50% de la actividad
IC25=	Concentración que inhibe el 25% de la actividad
ASA=	Ácido acetilsalicílico

RESUMEN

El presente estudio de investigación tuvo como finalidad evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata* DC. Para esto, se determinaron los parámetros de calidad a través de pruebas físico químicas, tanto en la droga cruda como el extracto, se realizó un tamizaje fitoquímico a través de pruebas colorimétricas y organolépticas, se cuantificó el contenido de fenoles totales expresados como ácido gálico y flavonoides expresados como quercetina con técnicas espectrofotométricas. La capacidad antioxidante fue estimada a través de la prueba de captación de radical DPPH, la capacidad antiinflamatoria y citotóxica se evaluó con el ensayo WST-1 para producción de superóxidos en neutrófilos activados. Se determinó que *Sigesbeckia serrata* presenta en su composición alcaloides, triterpenos, taninos, flavonoides, catequinas, cumarinas y resinas. El contenido de fenoles totales fue de 74.48 ± 0.41 mg/g de extracto, mientras que el de flavonoides fue de 60.43 ± 1.24 mg/g de extracto. Este extracto hidroalcohólico presentó un IC₂₅ de 524.70 ppm para su actividad antiinflamatoria, 727.96 ppm para su actividad citotóxica, y 572,95 ppm para su actividad antioxidante. Se concluye que no posee un potencial antiinflamatorio ni citotóxico destacado en comparación con ácido acetilsalicílico, ni tampoco una apreciable capacidad antioxidante. Se recomienda realizar estudios sobre los alcaloides que presenta esta especie, y complementar esta investigación con diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar su actividad antioxidante y antiinflamatoria en otras condiciones.

Palabras clave: <*Sigesbeckia serrata*>, <ANTIOXIDANTE>, <ANTIINFLAMATORIO>, <CITOTÓXICO>, <SACHA JÍCAMA>, <NEUTRÓFILOS AISLADOS>, <COMPUESTOS FENÓLICOS>, <FLAVONOIDES>

ABSTRACT

The purpose of this research study was to evaluate the *in vitro* anti-inflammatory and cytotoxic activity of the hydroalcoholic extract of *Sigesbeckia serrata* DC leaves. For this, the quality parameters were determined through physical and chemical tests, both in the raw drug and the extract, a phytochemical screening was carried out through colorimetric and organoleptic tests, the content of total phenols expressed as gallic acid and flavonoids expressed as quercetin with spectrophotometric techniques was quantified. The antioxidant capacity was estimated through the DPPH radical uptake test, the anti-inflammatory and cytotoxic capacity was evaluated with the WST-1 assay for production of superoxides in activated neutrophils. It was determined that *Sigesbeckia serrata* presents in its composition alkaloids, triterpines, tannins, flavinoids, catechins, coumarins and resins. The content of total phenols was 74.48 ± 0.41 mg / g of extract, while that of flavonoids was 60.43 ± 1.24 mg / g of extract. This hydroalcoholic extract presented an IC₂₅ of 524.70 ppm for its anti-inflammatory activity, 727.96 ppm for its cytotoxic activity, and 572.95 ppm for its antioxidant activity. It is concluded that it does not have an outstanding anti-inflammatory or cytotoxic potential compared to acetylsalicylic acid, nor an appreciable antioxidant capacity. It is recommended to carry out studies on the alkaloids that this species presents, and to complement this research with various *in vitro* and *in vivo* tests to determine its antioxidant and anti-inflammatory activity in other conditions.

Keywords: SACHA JÍCAMA (*Sigesbeckia serrata*), ANTIOXIDANTS, ANTIINFLAMMATORY, CITOTOXICO, ISOLATED NEUTROPHILS, PHENOLIC COMPOSES, FLAVONOIDES.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una gran cantidad de problemas de salud que producen deterioro en la calidad de vida de la población y que están caracterizadas por la respuesta inflamatoria. La inflamación es la reacción defensiva natural del sistema inmunológico que se presenta ante un daño causado a los tejidos orgánicos por factores internos o externos (microorganismos, necrosis, traumatismos, agentes físicos o químicos, ataque autoinmune) con el fin de aislar la zona afectada, contener la lesión, destruir el agente dañino e iniciar la reparación del tejido (Villalba, 2014, p. 2261).

La respuesta inflamatoria no es una enfermedad en sí, sino un conjunto de síntomas que indica la presencia de un problema, por tanto, no es tan importante eliminarla, sino buscar y resolver la causa que la ha desencadenado. Sin embargo, ya que está caracterizada por dolor y edema evidente en el paciente, es un motivo muy común para la búsqueda de asistencia sanitaria, o para el uso del recurso terapéutico más accesible.

De los tratamientos disponibles dentro de la medicina convencional para tratar los procesos inflamatorios, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son los que tienen un uso y prescripción más amplia. Estos incluyen un grupo de fármacos de diferentes estructuras químicas que forman parte de la primera escala de tratamiento del dolor propuesto por la OMS, y que complementa el tratamiento en posteriores escalas. Actúan principalmente sobre el proceso que desencadena la inflamación, pero también disminuyendo la transmisión del impulso doloroso (Ortiz-Pereda et al, 2007, pp. 148-155).

Se considera que el grupo de los AINEs es uno de los que más presencia tiene en el mercado farmacéutico a nivel mundial, alcanzándose un muy alto consumo (Masache, 2016, pp. 7-17). Datos estadísticos actuales señalan que cerca de 30 millones de personas a nivel mundial consumen diariamente AINEs (Morera et al, 2007, 458-464). Como una muestra, se conoce que aproximadamente 24 millones de prescripciones de AINEs se emiten cada año en Reino Unido, 15% de su población de adultos mayores los consumen con regularidad, y en 2004 fue el sexto grupo farmacológico más importante en volumen de ventas, lo que demuestra la magnitud de su uso (Seager y Hawkey. 2001, pp. 1236-1240.). En Estados Unidos, se realizan alrededor de 70 millones de prescripciones de AINEs al año (Frisancho, 1997, pp. 109-114).

Mundialmente, existen más de 30 marcas de AINEs que pertenecen a la industria farmacéutica, y en Ecuador el 80% del expendio de esta clase de medicamentos está representado por la venta de 8 productos, que conforman el 20% de la oferta, siendo la participación de los AINEs como la más importantes dentro de la demanda de fármacos en el país (Masache, 2016, pp. 7-17).

La prescripción de AINEs es un verdadero dilema para los facultativos sanitarios, ya que por sus actividades antiinflamatorias y analgésicas pueden ser útiles para el tratamiento de una gran variedad de afecciones, desde trastornos reumáticos a otras condiciones mucho más triviales, pero por otra parte poseen importantes efectos adversos, como la formación de úlceras gástricas y duodenales, que en muchas ocasiones llegan a la necesidad de intervención médica, o la muerte (Seager y Hawkey. 2001, pp. 1236-1240). Hay evidencia de que cerca de un 25% de los reportes de reacciones adversas a medicamentos están relacionados con la ingesta de AINEs, principalmente lesiones digestivas (Buttgereit, 2001, pp. 13-19).

Esto se complica al conocerse que la mayor cantidad de unidades de AINEs expendidos corresponden a automedicación, con su consecuente administración en muchos casos innecesaria y a dosis poco seguras, que aumenta la incidencia de sus efectos no deseados. La población ha trivializado a muchos de los antiinflamatorios más comunes, especialmente por la falta de control de su uso desde las farmacias y organismos de control sanitario, así como la poca educación de los usuarios al respecto (Masache, 2016, pp. 7-17).

Por esta razón, y para mejorar el acceso a tratamientos antiinflamatorios en países de escasos recursos, en la actualidad existe un marcado interés en la investigación de recursos terapéuticos vegetales que permitan disminuir las manifestaciones de los procesos inflamatorios. Conociéndose la relación entre la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con las enfermedades inflamatorias, se ha identificado que plantas que contengan sustancias con evidente capacidad antioxidante, como flavonoides, polifenoles o tocoferol, pueden evitar y reducir la inflamación (García et al, 2002, 214-216).

Se cuenta con un amplio conocimiento ancestral respecto al uso terapéutico de estas especies vegetales y su uso es vigente, puesto que la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de países en vías de desarrollo se basa en la medicina tradicional, por razones culturales o por la falta de cobertura de otros sistemas sanitarios (Bagozzi, 2004). Estudios etnobotánicos realizados en Ecuador manifiestan que al menos 273 tipos de plantas son comercializadas con fines medicinales en los mercados (Tinitana et al, 2016, p.29).

En nuestro país, varias universidades y centros tecnológicos donde se realiza investigación biológica han desarrollado ensayos experimentales para la determinación del potencial antiinflamatorio de muchas especies vegetales, especialmente que cuentan con registro de uso tradicional. Por ejemplo, un estudio ecuatoriano realizado en plantas medicinales utilizadas en las provincias de Loja y Azuay, en modelos de peces cebras, ha concluido que los extractos de *Cestrum aff. peruvianum*, *Galinsoga parviflora*, *Galium sp.*, *Oenothera tetraptera*, *Peperomia aff. galioides*, *Passiflora ampullaceae* y *Ambrosia arborescens*, poseen actividad antiinflamatoria comparable con indometacina y dexametasona (Peñaherrera et al, 2016, 1-12).

Una de estas especies vegetales usadas tradicionalmente es *Sigesbeckia serrata* DC., conocida en nuestro país por el nombre de sacha jícama. Se considera una planta de interés terapéutico ya que en comunidades de las provincias de Loja y Carchi es usada dentro de las prácticas de medicina tradicional para contrarrestar el dolor y la inflamación, especialmente reumático. Registros etnomedicinales mencionan su uso además para el tratamiento de quemaduras y diarrea. (De La Torre et al., 2008). Ya que estas propiedades atribuidas pueden aportar a disminuir la problemática de la alta incidencia de problemas inflamatorios y los efectos adversos derivados del mal uso de AINEs, mencionados anteriormente, se ha escogido estudiar esta especie, tomando en cuenta que, según bibliografía, no se han realizado investigaciones farmacológicas relevantes que comprueben su actividad biológica.

A través del presente estudio se ha determinado la capacidad antiinflamatoria del extracto de *Sigesbeckia serrata* utilizando un modelo *in vitro*. Se trata de una investigación innovadora, puesto que no se reportan ensayos similares al presente sobre esta especie en la bibliografía científica, y los resultados obtenidos permiten determinar la necesidad de efectuar posteriores análisis más profundos, incluso en modelos *in vivo*. Este tipo de investigaciones es muy importante para asegurar la efectividad y seguridad de los recursos terapéuticos de la medicina tradicional. La Dra. Alfrida Suárez, en su ponencia realizada en 2015 en la Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador, ha manifestado que la validación de la medicina tradicional consiste en confirmar científicamente sus propiedades terapéuticas para permitir su uso como medicamento en seres humanos, desde un punto de vista objetivo e imparcial, sin asumir *a priori* su efectividad ni forzar diseños experimentales para obtener un resultado positivo. De esta manera, además de incluir una alternativa terapéutica a los sistemas de salud, se preserva el conocimiento tradicional, que es una forma intangible de riqueza (Suárez, 2015).

Otro efecto de este tipo de investigaciones es que puede dar paso a la producción nacional de un fitofármaco, lo que redundaría en creación de empleo para productores, acondicionadores de materia prima, industria farmacéutica local, etc., disminuyendo la dependencia de la importación de medicamentos, y poniendo a disposición de la población una alternativa económica y accesible para el tratamiento de muchas patologías que contienen un componente inflamatorio.

Además, estos objetivos se encuentran alineados con las líneas de investigación de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la ESPOCH, y con el actual Plan Nacional del Buen Vivir 2017- 2021, especialmente con la política 2.1 del Objetivo 2, que dice: “Promover el rescate, reconocimiento, investigación y protección del patrimonio cultural, saberes ancestrales, cosmovisiones y dinámicas culturales”, y la política 3.5 del Objetivo 3: “Impulsar la generación de bioconocimiento como alternativa a la producción primario-exportadora, así como el desarrollo

de un sistema de bioseguridad que precautele las condiciones ambientales que pudieran afectar a las personas y otros seres vivos” (Concejo Nacional de Planificación del Ecuador, 2017).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata* DC.

Objetivos específicos

1. Evaluar la calidad de la droga cruda de *Sigesbeckia serrata*.
2. Determinar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides totales del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Sigesbeckia serrata* por técnicas espectrofotométricas.
3. Determinar la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Sigesbeckia serrata* con DPPH.
4. Determinar el potencial antiinflamatorio y citotóxico del extracto hidroalcohólico liofilizado de hojas de *Sigesbeckia serrata* a través del ensayo con WST-1 para producción de superóxidos en neutrófilos activados.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 GÉNERO SIGESBECKIA

El género *Sigesbeckia* está conformado por hierbas anuales de la familia Asteraceae que crece aproximadamente a un metro de altura. Existen varias especies que han sido utilizadas tradicionalmente en medicina para el tratamiento de dolor articular y muscular, dentro de las que destacan *S. orientalis*, *S. pubescens* y *S. glabracens*.

Se caracterizan por ramas cubiertas de pelos parduscos, hojas triangulares, flores amarillas en forma de lengua, que aparecen a fines de verano e inicios de otoño (Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, 2015).

El nombre del género proviene de una interesante historia. En 1700, Carl Linnaeus, un botánico, médico y zoólogo sueco, formalizó el sistema de nomenclatura para organismos, con un sistema binomial. Su trabajo permitió que se lo conociera como el padre de la taxonomía moderna. Este sistema se basaba en los órganos sexuales de la planta: estambres y pistilos, y no fue bien recibido en muchos círculos científicos ya que se consideró como antinatural, e incluso el Papa prohibió la presentación de las obras de Linnaeus en la biblioteca del Vaticano.

Uno de estos críticos fue el médico y botánico alemán Johann Georg Siegesbeck, quien decía que el sistema era repugnante e inmoral. Siegesbeck intentó refutar la clasificación basada en la caracterización de órganos sexuales, pero no pudo respaldar sus aseveraciones con sólidos argumentos académicos.

Una de las ideas de Linnaeus en su obra “Crítica Botánica” es que debería haber un vínculo entre la planta y el botánico quien la nombrara. Así, la magnolia tiene hermosas hojas y flores que recuerdan al botánico Magnol, mientras que *Dorstenia* tiene flores insignificantes, que se desvanecen más allá de su plenitud, como el trabajo de Dorsten.

Por lo tanto, no es de extrañarse que en el libro de clasificación “Hortus Cliffortianus”, Linnaeus haya nombrado a una pequeña y maloliente hierba como *Sigesbeckia*. Mientras que algunos autores todavía se refieren al género como *Siegesbeckia*, la ortografía correcta, según The Royal Botanical Gardens, es *Sigesbeckia* (Brummitt, 1967, p. 19).

1.2 *Sigesbeckia serrata* DC.

1.2.1 *Nombres comunes:*

- **México:** flor de araña (Escandón, 2003, p. 60)
- **Guatemala:** pega pega, cuanahuatch (Vibrans, 2009).
- **Ecuador:** sacha jícama (De La Torre et al., 2008).

1.2.2 *Sinónimos:*

Sigesbeckia jorullensis, *Sigesbeckia cordiflora* (no válido), *Sigesbeckia mandonii* (no válido), *Polimnia odoratissima* (Vibrans, 2009).

1.2.3 *Taxonomía*

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribu: Millerieae

Género: *Sigesbeckia*

Especie: *Sigesbeckia serrata* DC (Muséum national d'Histoire naturelle, 2018)

1.2.4 *Descripción botánica*

Planta herbácea perenne, erecta. Crece hasta 1.5 m de alto. El tallo presenta pelos erectos en la base, y pelos glandulares en el ápice. Las hojas son opuestas, sésiles hacia la parte superior y con pecíolos alados hacia la parte inferior, angostas u ovadas, con ápice agudo, margen con dientes puntiagudos, tres nervios que se unen en la base, con pelos erectos y rígidos. La inflorescencia se presenta a modo de cabezuelas sobre pedúnculos de 4 cm de largo, delgados, con pelos glandulares, en las axilas de las hojas superiores (Vibrans, 2009).

Las cabezuelas están formadas por pequeñas flores sésiles en un receptáculo convexo o cónico, con brácteas en su superficie que presentan pelos glandulares en el ápice. Las flores están rodeadas

de 14 brácteas dispuestas en 2 series que forman el involucre campanulado. Las 5 o 6 brácteas exteriores son angostas con ápice ancho, cubiertos de pelos glandulares y pegajosos. Las brácteas inferiores abrazan la parte basal de cada una de las flores liguladas, con pelos glandulares. Las flores presentan corola amarilla, oblonga o en abanico, con 3 lóbulos al ápice, 2 mm de largo. El aquenio presenta una sola semilla, comprimida, negra, estriada. La raíz presenta muchas ramificaciones delgadas (Vibrans, 2009).

1.2.5 Hábitat:

Crece en zonas montañosas húmedas, en zonas intervenidas, cerca de campos de cultivo y pastizales, dese 1400 a 4000 m sobre el nivel del mar (Vibrans, 2009).

1.2.6 Rango:

Planta americana. Se distribuye en México, Centroamérica, Haití, República Dominicana, países andinos (Vibrans, 2009).

1.2.7 Usos etnobotánicos

Las partes aéreas de *Sigesbeckia orientalis* se han utilizado tradicionalmente para tratar afecciones reumáticas como artritis, dolor en las articulaciones y músculos, ciática, así como para tratar la hipertensión y algunas formas de parálisis. Se ha utilizado en las medicinas tradicionales de muchos países en todo el mundo y se mencionó por primera vez en China en 659 DC. Su nombre chino es Xi Xian Cao. En la medicina tradicional china, *Sigesbeckia orientalis* se utiliza para "disipar la humedad del viento y fortalecer los tendones: para obstrucciones dolorosas de viento-calor-humedad". En Europa, la planta se conoce comúnmente como hierba de San Pablo. Puesto en el lenguaje médico occidental, *Sigesbeckia orientalis* se prescribe en la medicina tradicional para aliviar las afecciones reumáticas y mejorar la movilidad de las articulaciones. Cuando se usan tradicionalmente, a los pacientes se les da la hierba seca para elaborar una decocción, ya sea solo o en combinación con hierbas como *Prunella vulgaris* o *Clematis chinensis* (Clematis chino). En China, a menudo se recetó *Sigesbeckia orientalis* por sí solo como una gran píldora de miel (Xi Xian Cao). Para hacer esta píldora de miel, la planta seca de *Sigesbeckia orientalis* se somete a decocción dos veces con agua, durante dos horas. Las decocciones (extracto líquido) se concentran a continuación. Posteriormente, la planta seca se infunde con vino de arroz y se calienta hasta que el vino sea completamente absorbido. La decocción concentrada y el material infusionado con vino se seca, se pulveriza y se mezcla con miel para preparar píldoras de miel grandes, cada píldora pesa 20 a 30 g y contiene 9 g del extracto de *Sigesbeckia orientalis*. En la medicina moderna, tales métodos de producción son muy imprecisos y existe el riesgo de contaminación, el uso de una planta incorrecta o el uso de material vegetal de calidad inferior. En

Europa, las hierbas medicinales tradicionales ahora están reguladas por la Directiva sobre productos medicinales tradicionales a base de plantas, según la cual existen requisitos estrictos de calidad y seguridad que los fabricantes deben cumplir y mantener para obtener una licencia para vender el producto. Las formas de dosificación tradicionales tampoco son apropiadas para el mercado occidental y los medicamentos autorizados de *Sigesbeckia orientalis* están disponibles en forma de tabletas, que contienen extracto de *Sigesbeckia orientalis* de grado farmacéutico (Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency, 2015).

En Ecuador, *Sigesbeckia serrata*, conocida como sachá jícama, es usada tradicionalmente para contrarrestar el dolor y la inflamación, especialmente reumático. Registros etnomedicinales mencionan su uso para el tratamiento de quemaduras en la provincia de Loja, y de diarrea en la provincia de Carchi (De La Torre et al., 2008).

En México, es conocida como flor de la araña, y según estudios etnobotánicos realizados en el estado de Hidalgo, tradicionalmente se usa su infusión para el tratamiento de la presión alta y diarrea (Escandón, 2003, p. 60).

1.2.8 Investigaciones de actividad biológica y farmacológica

Pocas son las investigaciones que se han realizado sobre la actividad biológica de la especie *Sigesbeckia serrata* DC. La presente búsqueda bibliográfica toma en cuenta la sinonimia de esta planta, además de ensayos realizados sobre otras especies del mismo género. Cabe mencionar que se conservará la denominación de *Sigesbeckia serrata* de acuerdo a como se encuentra catalogada en el herbario de la Universidad Nacional de Loja. Sin embargo, ha sido mencionada en bibliografía con los sinónimos: *Sigesbeckia jorullensis*, *Sigesbeckia cordiflora* (no válido), *Sigesbeckia mandonii* (no válido), y *Polimnia odoratissima* (Vibrans, 2009).

Las plantas del género *Sigesbeckia* son hierbas anuales de áreas cálidas, muchas especies cultivadas como plantas medicinales. *Sigesbeckia pubescens* es usada en Japón para el tratamiento de artritis. Los extractos de sus partes aéreas contienen diterpenos, principalmente derivados de kaurano y otros terpenoides, especialmente sesquiterpeno lactonas. *S. orientalis* se usa como panacea en Madagascar, su sabor amargo es debido a su contenido en darutósido. *Sigesbeckia jorullensis* es una hierba anual que crece entre 1 a 5 m, originaria del subtrópico americano. Crece en Europa bajo arbustos y en jardines. El aceite esencial que es secretado por sus pelos glandulares está compuesto mayoritariamente por sesquiterpenos y diterpenos, principalmente por d germacrene, además de monoterpenos, n alcanos y flavonoides (Heinrich et al, 2002, pp. 459-469).

En la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán, Argentina, se realizó la búsqueda de la actividad antibacteriana y molusquicida de extractos de 16 plantas de la familia de las compuestas, encontrándose que los extractos clorofórmicos y metanólicos de hojas y flores de *Sigesbeckia jorullensis* demostraron ser activos contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y algunas especies de lactobacillus, sin destacar frente a otros extractos vegetales ensayados (Bardón et al, 2007, pp. 227-231).

1.3 RESPUESTA INFLAMATORIA

Cuando se establece una infección bacteriana en el cuerpo, el propósito del sistema inmune es controlarla o erradicarla. La reacción inicial del sistema inmune a una infección varía, dependiendo del sitio que ha sido invadido y de la naturaleza del invasor. Puede haber muchos "desencadenantes", que pueden impulsar el sistema inmune a la acción. Estas son algunas de las formas en que se puede activar el sistema inmune. Si la invasión está en un área del cuerpo defendida principalmente por macrófagos, como los pulmones o los intestinos, estos macrófagos serán las primeras células inmunes en la escena. Comienzan a digerir el organismo invasor, y al presentar antígenos (proteínas de las bacterias destruidas), estimulan otras células del sistema inmune a la acción. Algunas bacterias, como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*, producen quimiotaxinas cuando ingresan al cuerpo, lo que delata su presencia en el sistema inmune, actuando como "migas de pan" que revelan la ubicación del invasor. Las quimiotaxinas son sustancias químicas que activan los fagocitos, las células inmunes cuya función es consumir y destruir las bacterias invasoras. Algunas bacterias se encuentran por primera vez, y son reconocidas por el sistema del complemento, que a su vez produce mensajeros químicos (citoquinas) que advierten a otras células del sistema inmune de que el cuerpo ha sido invadido. El invasor puede ser reconocido por el sistema inmune adquirido, es decir, los linfocitos. Estas células combaten la infección por sí mismas, o controlan otras células para hacerlo (Kennedy, 2015).

Se reconocen tres fases de la respuesta inflamatoria, y cada una de estas tiene sus propios mecanismos desencadenantes:

- Fase aguda transitoria, en la que se manifiesta aumento de temperatura local, vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar.
- Fase tardía subaguda, con un aumento moderado de temperatura, e infiltración de fagocitos y leucocitos.
- Fase crónica proliferativa, con fibrosis y lesiones a nivel de tejidos y endotelio. (Gómez Estrada et al, 2011, pp 182-217).

Aunque la respuesta inflamatoria es un mecanismo básico de supervivencia que permite desde la lucha contra agentes patógenos hasta la destrucción de células cancerígenas, una respuesta exagerada y crónica conduce a enfermedades como artritis reumatoide, arterioesclerosis, enfermedades cardiacas y de la circulación, asma, colitis, peritonitis, esclerosos múltiple, etc. Existe una gran cantidad de enzimas y mediadores que están involucrados en la respuesta inflamatoria. Los mediadores son muy variados, y entre ellos se destacan serotonina, histamina, enzimas hidrolíticas, anticuerpos, factores de crecimiento, citoquinas, quininas, especies reactivas de oxígeno, leucotrienos, prostanoïdes, factores activadores de plaquetas. Su función es dar inicio, mantener y modular el curso de la inflamación. Las prostaglandinas son sustancias reguladoras del crecimiento de las células, y se generan en varios tejidos por acción de enzimas como ciclooxigenasas. Las ciclooxigenasas se presentan en tres isoformas, conocidas como COX-1, COX-2 y COX-3. Su producción es estimulada por factores estimulantes de la inflamación, como citoquinas y factores séricos, y generan mecanismos que desembocan en dolor, aumento de temperatura e inflamación. Es en estas enzimas donde actúan la mayoría de antiinflamatorios no esteroïdales y corticoides. Por su parte, las citoquinas son un gran grupo de sustancias que inducen a la enzima óxido nítrico sintetasa y otras enzimas, además de las COX-2. Son secretadas por células inmunitarias, como mastocitos, macrófagos y neutrófilos, y se han identificado aproximadamente mil tipos, encontrándose pro inflamatorias y anti inflamatorias en dependencia del proceso en que participen. Entre las pro inflamatorias más importantes están algunas interleuquinas y el factor de necrosis tumoral alfa. El óxido nítrico (NO) interviene en la regulación de varios mecanismos biológicos tales como contracción muscular, transmisión del impulso nervioso, activación de plaquetas y de células inmunes. Niveles inusualmente altos de esta sustancia están relacionados con enfermedades inflamatorias crónicas, tales como artritis, colitis, entre otras. Se han identificado tres isoenzimas de óxido nítrico sintetasa, el tipo iNOs, que, inducida en células hepáticas, de musculatura lisa, macrófagos, neutrófilos, y endotelio vascular, en respuesta a otros estímulos de origen inmunológico, y genera grandes cantidades de NO. Esta puede activar las enzimas COX y aumentar la producción de prostaglandinas (Gómez Estrada et al, 2011, pp 182-217).

- **Cascada inmunológica**

Todos los métodos anteriores tienen el efecto de inducir a los fagocitos a migrar al sitio de la invasión. Una vez que alcanzan ese sitio, los fagocitos se activan y comienzan su tarea de digerir y destruir las bacterias invasoras. Una vez activados, también producen más citoquinas, que activan otras células del sistema inmune. En cierto sentido, la reacción inmune inicial conduce a una cascada de reacciones inmunológicas adicionales. Las células del sistema inmune se

comunican y cooperan de manera compleja. La operación completa del sistema inmune está lejos de ser entendida. Un punto importante a tener en cuenta es que los organismos invasores, si interfieren con cualquiera de los químicos anteriores, o las células que los producen, pueden causar un cambio profundo en la respuesta inmune de los organismos a ese organismo (Kennedy, 2015).

- **Efectos de la respuesta inflamatoria.**

El efecto físico primario de la respuesta inflamatoria es que la circulación sanguínea aumenta alrededor del área infectada. En particular, los vasos sanguíneos alrededor del sitio de la inflamación se dilatan, lo que permite un mayor flujo de sangre al área. Las brechas aparecen en las paredes de las células que rodean el área infectada, lo que permite que pasen las células más grandes de la sangre, es decir, las células inmunes. Como resultado del aumento del flujo sanguíneo, la presencia inmune se fortalece. Todos los diferentes tipos de células que constituyen el sistema inmune se congregan en el sitio de la inflamación, junto con un gran suministro de proteínas, que alimentan la respuesta inmune. Hay un aumento en el calor corporal, que puede tener un efecto antibiótico, regulando el balance de las reacciones químicas a favor del huésped. Los principales síntomas de la respuesta inflamatoria son los siguientes:

- Los tejidos en el área son rojos y cálidos, como resultado de la gran cantidad de sangre que llega al sitio.
- Los tejidos en el área están hinchados, de nuevo debido a la mayor cantidad de sangre y proteínas que están presentes.
- El área es dolorosa, debido a la expansión de los tejidos, lo que causa presión mecánica sobre las células nerviosas, y también debido a la presencia de mediadores del dolor (Kennedy, 2015).

Una vez que el proceso inflamatorio ha comenzado, continúa hasta que la infección que lo causó se haya erradicado. Los fagocitos continúan consumiendo y destruyendo bacterias, el sistema inmune adquirido se une y elimina las toxinas dañinas. Se produce pus, siendo el pus la ruina que queda de la batalla entre el invasor y el sistema inmune. El color del pus depende del organismo que causa la infección. Idealmente, la respuesta inflamatoria solo debería durar mientras exista la infección. Una vez que la amenaza de infección ha pasado, el área debe regresar a la existencia normal. El proceso real por el cual termina la respuesta inflamatoria ahora solo comienza a ser entendido. El elemento clave es un fenómeno conocido como "apoptosis". Cuando las células del cuerpo mueren de manera normal, al dañarse irremediablemente o al privarse de nutrientes, esto se conoce como muerte necrótica. Recientemente, la investigación ha demostrado que las células

también se pueden matar de otra manera, es decir, "suicidándose". Al recibir una determinada señal química, la mayoría de las células del cuerpo pueden autodestruirse. Esto se conoce como muerte apoptótica. Hay dos formas principales en que las células pueden comprometer apoptosis.

- 1) Al recibir una señal de apoptosis. Cuando se recibe una señal química que indica que la célula debe matarse, lo hace.
- 2) Al no recibir una señal de "mantenerse vivo". Ciertas células, una vez que alcanzan un estado activado, se preparan para matarse automáticamente dentro de un cierto período de tiempo, es decir, para confirmar apoptosis, a menos que se indique lo contrario. Sin embargo, puede haber otras células que les suministren una señal de "mantenerse vivo", lo que retrasa la apoptosis de la célula. Solo cuando la célula cebada deja de recibir esta señal de "mantenerse vivo", se mata (Kennedy, 2015).

El sistema inmune emplea el segundo método anterior. Las células inmunes implicadas en la respuesta inflamatoria, una vez que se activan, están preparadas para comprometer la apoptosis. Las células T colaboradoras emiten una señal de permanencia activa y continúan emitiendo esa señal mientras reconozcan antígenos extraños en el cuerpo, prolongando la respuesta inflamatoria. Solo cuando la infección se ha erradicado y no hay más antígenos extraños, las células T auxiliares dejan de emitir la señal de permanencia activa, lo que permite que las células implicadas en la respuesta inflamatoria desaparezcan. Si el antígeno extraño no se elimina del cuerpo, o las células T auxiliares no reconocen ese hecho, o si las células inmunes reciben la señal de permanecer vivo de otra fuente, entonces puede desarrollar inflamación crónica (Kennedy, 2015).

1.3.1 Compuestos antiinflamatorios naturales

Se han realizado muchas investigaciones que han demostrado la actividad antiinflamatoria realizadas en extractos vegetales y metabolitos secundarios aislados de estos. Es el caso de terpenos y terpenoides, se ha hallado una potente actividad en tripterina, pristimerina y tingenona, que inhibían la producción de IL y otros mediadores. Igualmente, iridoides glicosilados como aucubina y catalpol bloquean la activación de TNF. Los gingenósidos, que son saponinas triterpénicas aisladas del género Panax, inhiben la inducción de NO y TNF, lo cual avala su uso tradicional. Uno de los efectos de los flavonoides es su actividad antiinflamatoria, a través de la inhibición de TNF, como sucede con luteolina, quercetina y genisteína. Otros compuestos como silimarina e hipericina, tienen un efecto inhibitor similar, sobre TNF y varias interleukinas. Otros compuestos presentes en tratamientos naturales para la inflamación son geranina y corilagina,

aislados del té verde. Lignanos como pinoresinol, tienen actividad significativa sobre TNF y lipopolisacárido (Gómez Estrada et al, 2011, pp 182-217).

1.3.2 Mecanismo de acción de flavonoides como antiinflamatorios

Se ha reportado que varios flavonoides poseen actividad antiinflamatoria in vitro e in vivo. Aunque no está completamente entendidos, se proponen varios mecanismos de acción para explicar la acción antiinflamatoria in vivo. Un importante mecanismo para la actividad antiinflamatoria es la inhibición de eicosanoides que generan enzimas incluyendo fosfolipasa A2, ciclooxigenasas y lipoxigenasas, reduciendo así las concentraciones de prostanoides y leucotrienos. Otro de los mecanismos incluye la inhibición de la liberación de histamina, fosfodiesterasa, proteína quinasas y activación de transcriptasa (Rathee et al, 2009, pp. 229-235).

Inhibición de la Biosíntesis Prostanoides

La respuesta inflamatoria es una serie altamente sincronizada de procesos de activación celular, la mayoría de los cuales están vinculados a biosíntesis de prostanoides a través del metabolismo del ácido araquidónico. El ácido araquidónico se libera de los fosfolípidos por la fosfolipasa A2 y se oxida a prostaglandinas o tromboxanos por las acciones de la ciclooxigenasa o 5-lipoxigenasa, respectivamente. Muchos flavonoides juegan un papel importante en la inhibición de la formación de prostaglandinas. Hesperidina y diosmina han demostrado una inhibición significativa de la formación de prostaglandina in vivo. La inhibición de la fosfolipasa A2 por los flavonoides ha sido reportado adicionalmente en cantidad de estudios in vitro. Flavonoides de *Sophora flavescens* y una serie de biflavonoides (amentoflavona, bilobetina, morelloflavona y ginkgetina) en ciertas plantas medicinales han demostrado que inhiben las fosfolipasas C1 y A2, respectivamente. Morelloflavona es un inhibidor de la fosfolipasa A2, en modelos de edema plantar por carregenina en ratones después de su administración oral, así como edema en oído inducido por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) después de su administración tópica. Los flavonoides como la quercetina también inhiben la ciclooxigenasa. La quercetina es obtenida de numerosos alimentos, como cebollas, jugos de frutas y té, y es un fuerte inhibidor de las enzimas COX-2 y 5-LOX involucradas en la producción de los eicosanoides del ácido araquidónico. El resveratrol regula la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de la síntesis y liberación de mediadores proinflamatorios, modificación de la síntesis de eicosanoides, inhibición de las células inmunes activadas, o inhibición de sustancias tales como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa-2 (COX-2) a través de sus efectos inhibidores sobre el factor nuclear kappa B (NF-κB) o la proteína activadora-1 (AP-1) (Rathee et al, 2009, pp. 229-235).

Varios estudios clave han demostrado las propiedades antiinflamatorias de los flavonoides cítricos, que se deben a la inhibición de la síntesis y otras actividades biológicas de diferentes mediadores proinflamatorios, principalmente derivados de ácido araquidónico, prostaglandinas E2, F2 y tromboxano A2. Apigenina y sus glucósidos han demostrado ser buenos antiinflamatorios sin los efectos secundarios de otros productos. La cumarina y su derivado 7-hidroxi inhiben la biosíntesis de prostaglandina. Productos naturales como esculetina, fraxetina, daphnetina y otros derivados de cumarina son reconocidos como inhibidores no solo de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa, sino también de la generación del anión superóxido neutrófilo dependiente. La inhibición por flavonoides de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa catalizadas en la biosíntesis de prostanoides también ha sido ampliamente documentada. Un grupo de flavonoides aislados de plantas medicinales y que son inhibidores selectivos de la actividad de la lipoxigenasa in vitro incluye sideritoflavona, cirsiliol, hipolaetin-8-O-D-glucósido, hipolaetina, oroxindina, quercetagenin-7-O-D-glucósido, gossypina, hibifolina y gossypetina. Es importante destacar que la mayoría de las flavonas que exhiben inhibición de agregación plaquetaria también son potentes inhibidores de lipoxigenasa y ciclooxigenasa (Gómez Estrada et al, 2011, pp 182-217).

Flavonoides, como la quercetina, kaempferol y myricetina demostraron ser inhibidores efectivos de la agregación de plaquetas en perros y monos. Los flavonoles son particularmente antitrombóticos porque directamente eliminan los radicales libres, manteniendo concentraciones apropiadas de prostaciclina endotelial y óxido nítrico. Un estudio demostró que los flavonoides son poderosos agentes antitrombóticos in vitro e in vivo debido a la inhibición de la actividad de las vías de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa. Es bien sabido que el ácido araquidónico, que se libera en condiciones inflamatorias, se metaboliza por las plaquetas para formar prostaglandina, endoperóxidos y tromboxano A2, que lideran la activación y agregación de plaquetas. Se cree que el principal efecto antiagregante de los flavonoides es por inhibición de la formación de tromboxano A2. Los flavonoides afectan al metabolismo de ácido araquidónico de diferentes maneras. Algunos flavonoides específicamente bloquear la ciclooxigenasa o lipoxigenasa, mientras que otros bloquean ambas enzimas. Los estudios in vitro mostraron que los flavonoides se unen a las plaquetas y, por lo tanto, pueden tener un efecto acumulativo con el tiempo. Silibinina inhibe fuertemente la síntesis de prostaglandinas a través de las vías catalizadas por 5-lipoxigenasa, mientras que exhibe una inhibición de ciclooxigenasa insignificante. 5, 7 dihidroxi-3, 8-dimetoxiflavona, de la planta medicinal *Helichrysum picardii* inhibe la producción del metabolito de ciclooxigenasa tromboxano B2 y el metabolito de lipoxigenasa leucotrieno B4 en leucocitos activados de peritoneo de rata. Los flavonoides de *Artemisia copa* espina cetina, jaceosidina, axillarina, penduletina, tricina y chrysoeriol inhiben la producción de óxido nítrico y reducen la prostaglandina E2. Su flavonoide más activo es jaceosidina que inhibe la actividad de

la ciclooxigenasa-2 en una concentración dependiente con un IC₅₀ (citotoxicidad intrínseca) de 2.8 microM. Además, los otros flavonoides inhiben parcialmente la actividad de la fosfolipasa A2 sinovial. Los estudios también han demostrado la inhibición de flavonas en la activación de la transcripción de ciclooxigenasa en lipopolisacáridos activados en monocitos. Bilobetina y ginkgetina han demostrado de manera similar que inhiben la ciclooxigenasa y la inducción de óxido nítrico sintasa en LPS en monocitos activados. La Apigenina inhibe significativamente la expresión de ARNm de ciclooxigenasa y el óxido nítrico sintasa inducida en monocitos activados por LPS. Activación inducida por LPS de la actividad transcripcional de NF-κB también fue bloqueado por apigenina, esta actividad posiblemente ocurra a través de la inhibición de una quinasa específica inducida por LPS (Rathee et al, 2009, pp. 229-235).

1.4 Antioxidantes

Los antioxidantes pueden actuar como barreras físicas para prevenir la generación de ROS o el acceso de ROS a importantes sitios biológicos (filtros UV, membranas celulares); pueden funcionar como trampas químicas que "absorben" energía y electrones, atrapando ROS (carotenoides, antocianidinas); como sistemas catalíticos que neutralizan o desvían ROS [enzimas antioxidantes SOD (Superóxido dismutasa), catalasa y glutatión peroxidasa]; por unión o inactivación de iones metálicos para evitar la generación de ROS (ferritina, ceruloplasmina, catequinas); o como rompedores de cadenas que eliminan y destruyen ROS (ácido ascórbico, tocoferoles, úrico ácido, glutatión, flavonoides). Por lo tanto, y en función de su modo de acción, los antioxidantes pueden ser clasificados como primarios, secundarios o co-antioxidantes. Los antioxidantes primarios pueden donar átomos de hidrógeno rápidamente a un radical lipídico, formando un nuevo radical, que es más estable. Los antioxidantes secundarios reaccionan con los radicales iniciadores (o inhibir las enzimas de inicio), o reducir el nivel de oxígeno (sin generar especies reactivas). Por lo tanto, estos antioxidantes secundarios pueden retardar la tasa de reacción de iniciación por eliminación de iniciadores. Esto se puede realizar desactivando especies de alta energía (oxígeno singlete); absorber la luz UV; atrapando oxígeno; quelando el metal que cataliza la reacción, o inhibiendo enzimas, como peroxidasa, NADPH oxidasa, xantina oxidasa, entre otras enzimas oxidativas. Se han aplicado métodos directos e indirectos para determinar la actividad antioxidante en productos naturales. Los métodos directos se basan en el estudio del efecto de un producto probado (por ejemplo, alimentos) que contiene antioxidantes, en la degradación oxidativa de un sistema de prueba. El sustrato de oxidación pueden ser lípidos individuales, mezclas de lípidos (aceites), proteínas, ADN, plasma sanguíneo, LDL y membranas biológicas. Se pueden usar lípidos homogéneos o sistemas micro heterogéneos (micelas y liposomas) dependiendo de la solubilidad de las muestras. El método indirecto estudia la capacidad del antioxidante para secuestrar algunos radicales libres, que no están asociados con la

degradación oxidativa real. Los métodos directos, pueden basarse en la cinética de la peroxidación lipídica o en la cinética de los procesos (métodos de competencia directa). En el primer caso, dos modos de peroxidación lipídica pueden ser utilizados para probar la actividad antioxidante: uno de ellos es el modo de autooxidación cuando el proceso va progresando espontáneamente, con auto-aceleración debido a la acumulación de especies reactivas; el otro modo es basado en el uso del modelo cinético de reacción en cadena controlada. La utilización de compuestos termolábiles soluble en agua o en lípidos que se descomponen y producen libres radicales activos a temperaturas moderadas a cualquier velocidad deseada, que pueden ser fácilmente alterados y controlados son dos buenos ejemplos muy utilizados. Cuando estos azocompuestos termo-lábiles no se usan, y por aceleración de la oxidación de lípidos, ocurre un aumento de la presión parcial de oxígeno y la temperatura. Hay dos métodos muy populares para controlar la peroxidación de lípidos: determinación de conjugados dienos (absorbancia a 234 nm) y el ensayo TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). Este método mide el malonaldehído formado después de la descomposición del hidroperóxido lipídico, que forma un cromóforo rosado con ácido tiobarbitúrico (TBA). Sin embargo, TBARS es representativo de un lugar bastante tardío en la etapa de oxidación lipídica, cuando el sustrato de oxidación ha experimentado una transformación sustancial (Miguel, 2010, pp. 9252-9287).

Hay otros métodos, incluida la determinación del valor de peróxido, el valor de yodo, la cromatografía para medición de compuestos volátiles, medición de ácido fórmico [el método Rancimat de forma automatizada que mide la conductividad de los ácidos grasos de bajo peso molecular (ácido fórmico) producidos durante la autooxidación de lípidos a 100 °C o más]. En los métodos de competencia directa, los antioxidantes naturales compiten por el radical peroxilo con un captador de radicales libres. Los ejemplos de captadores de radicales libres de referencia incluyen la proteína natural fluorescente R-ficoeritrina y la crocina natural, o fluoresceína, que compiten con la muestra antioxidante para radicales peroxilo formados. Estos radicales pueden ser producidos a través del AAPH o AMVA. Este es el principio del llamado protocolo ORAC (capacidad de absorbancia de radical oxígeno). Otro ejemplo es el blanqueo de β -caroteno durante la autooxidación de ácido linoleico o en una reacción en cadena controlada mediante el uso de un iniciador de radicales libres: AAPH. Ejemplos de radicales libres que no están asociados con la degradación oxidativa real (indirecta) son 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) o 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH), ambos con diferente color según el estado. Otro ejemplo del método indirecto se basa en la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} , en presencia de 2,4,6-tripyridyl-s-triazine. Este método se conoce como FRAP (poder antioxidante reductor férrico). También hay métodos basados en la quimioluminiscencia del luminal en presencia de radicales libres, que se puede producir a través de AAPH. Además de los métodos para determinar la actividad antioxidante que rompe la cadena, también están los métodos restantes para evaluar la capacidad

de captar otros radicales libres como superóxido, hidroxilo, óxido nítrico, peroxinitrito o para quelar metales (antioxidantes secundarios). Muchos métodos se han desarrollado y compilado en artículos de revisión recientes, y también en algunos de ellos se informó ventajas y desventajas de esos métodos. La capacidad antioxidante de los aceites esenciales también ha sido evaluada usando varios métodos (Miguel, 2010, pp. 9252-9287).

1.4.1 *Antioxidantes y antiinflamatorios*

La inflamación es una respuesta protectora normal inducida por una lesión o infección tisular y funciona para combatir invasores en el cuerpo (microorganismos y células externas) y eliminar células muertas o dañadas. En la respuesta inflamatoria hay un aumento de la permeabilidad de las células del revestimiento endotelial y afluencias de leucocitos sanguíneos en el intersticio, actividad oxidativa y liberación de citoquinas [interleucinas y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)]. Al mismo tiempo, también hay una inducción de la actividad de varias enzimas (oxigenasas, óxido nítrico sintasas, peroxidasas) así como el metabolismo del ácido araquidónico. En el proceso inflamatorio también existe la expresión de celular moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM) y la molécula de adhesión de células vasculares (VCAM). Además de la capacidad de algunos metabolitos para eliminar radicales libres, también hay evidencia de que algunos productos naturales poseen actividad antiinflamatoria. Por ejemplo, el aceite esencial de manzanilla ha sido utilizado durante siglos como un antiinflamatorio y también para aliviar los síntomas asociados con eccema, dermatitis y otras irritaciones pronunciadas. Sin embargo, hay otros ejemplos de aceites esenciales (eucalipto, romero, lavanda, millefolia) junto con otras plantas (pino, clavo de olor y mirra) que se han utilizado como formulaciones mixtas como agentes antiinflamatorios. Generalmente se usa la prueba del edema de la pata del ratón inducido por carragenano para determinar el efecto antiinflamatorio y la actividad de diversos compuestos bioactivos, como extractos de plantas y aceites esenciales. Aunque este método permite identificar la actividad antiinflamatoria de las muestras, proporciona muy poca información sobre su mecanismo de acción. La actividad antiinflamatoria de los metabolitos puede atribuirse no solo a su capacidad antioxidante sino también a sus interacciones con las cascadas de señalización que implican citoquinas y reguladores de factores de transcripción, y en la expresión de genes proinflamatorios (Miguel, 2010, pp. 9252-9287).

En general, se acepta que los radicales libres juegan un papel importante en el desarrollo del daño tisular y eventos patológicos. Los lípidos que contienen ácidos grasos poliinsaturados son fácilmente oxidado por oxígeno molecular y tal oxidación procede por una cadena de radicales libres. Cuando el oxígeno se suministra en exceso o su reducción es insuficiente, especies reactivas de oxígeno tales como aniones superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno,

se generan. Los organismos aeróbicos están protegidos de la toxicidad del oxígeno por un sistema antioxidante natural que implica mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Hay un creciente interés en los efectos antioxidantes de los compuestos derivados de vegetales y su papel en la salud y enfermedad. Además de los efectos protectores de los antioxidantes endógenos, productos naturales con actividad antioxidante podrían retardar el daño oxidativo de un tejido aumentando esas defensas. Preparados naturales de la medicina mediterránea y china demuestran actividad antiinflamatoria en ensayos frente a diferentes modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, y estudios han demostrado una fuerte relación entre la capacidad antioxidante y antiinflamatoria (Schinella, 2002, pp. 1023-1033).

1.5 Compuestos fenólicos y su cuantificación

La capacidad de varios compuestos fenólicos para jugar roles conflictivos y complejos como captadores de radicales, antioxidantes y prooxidantes proporciona una justificación para un examen de sus actividades apoptóticas. Los compuestos fenólicos son de naturaleza omnipresente. Están universalmente distribuido en todo el reino vegetal en su mayoría como anillos aromáticos hidroxilados que también pueden ser conjugado con otros productos naturales como ácidos grasos y flavonoides, o polimerizados en entidades más grandes como las ligninas. El uso de fitoquímicos de base fenólica como agentes quimiopreventivos junto con el extenso uso y prevalencia de varios fenoles como sustancias químicas industriales o contaminantes medioambientales, exige un estudio minucioso y sistemático de las variables que definen sus reactividades químicas y subsecuentes actividades biológicas. En los últimos años, la investigación se ha centrado en la miríada de actividades biológicas de fenoles y su capacidad de formar especies radicales. La constante electrónica de Hammett ha sido particularmente pertinente para delinear las relaciones estructura cuantitativa – actividad (QSAR) relativas a la citotoxicidad de varios fenoles sustituidos, aunque homogéneos, en células de leucemia murina (Selassie, 2005, pp. 7234-7242).

Las plantas producen una extraordinaria diversidad de metabolitos fenólicos que contienen uno o más residuos de hidroxilos ácidos unidos a un anillo aromático de areno (fenilo). Ácidos hidroxicinámicos, flavonoides, antocianinas y taninos representan las principales clases de compuestos fenólicos, que en conjunto representan aproximadamente 40% del carbono orgánico en la biosfera. Aunque compuestos fenólicos estructurales tales como lignina, suberina y otros los polímeros estructurales comprenden gran parte de este conjunto de carbono, la increíble variedad de compuestos fenólicos no estructurales tiene muchas funciones en plantas, incluso actuando como antioxidantes. Los compuestos fenólicos son excelentes secuestradores de radicales de oxígeno porque el potencial de reducción de electrones del radical fenólico es menor que el

potencial de reducción de electrones de los radicales de oxígeno, y también porque los radicales fenoxilo son generalmente menos reactivos que los radicales de oxígeno. Por lo tanto, los compuestos fenólicos pueden eliminar reactivos intermedios de oxígeno sin promover más reacciones oxidativas. Se deduce que muchas tensiones ambientales que causan estrés oxidativo a menudo inducen la síntesis de compuestos fenólicos como metabolitos. Muchos métodos disponibles de cuantificación de compuestos fenólicos totales contenido en productos alimenticios o muestras biológicas se basan en la reacción de compuestos fenólicos con un reactivo colorimétrico, que permite la medición en la porción visible del espectro. El ensayo de Folin-Ciocalteu (F-C) pertenece a este tipo y ha sido propuesto como un método estandarizado para su uso en control de calidad de rutina y medición de la capacidad antioxidante de los productos alimenticios y suplementos dietéticos. El ensayo de F-C se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino de compuestos fenólicos a fosfomolibdicos / complejos de ácido fosfotúngstico para formar complejos azules que se determinan espectroscópicamente a aproximadamente 760 nm. Aunque la naturaleza química exacta de la F-C reacción es desconocida, se cree que las secuencias de reacciones reversibles de reducción de uno o dos electrones conducen a especies azules (posiblemente $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$). Consideraciones principales en la interpretación del ensayo F-C son que la química no es específica y que otras oxidaciones de sustratos en una muestra de extracto dada pueden interferir en un inhibidor, de forma aditiva. La inhibición podría ocurrir como resultado de oxidantes que compiten con el reactivo F-C o por aire después de que la muestra se haga alcalina. Por esta razón, el reactivo F-C se agrega antes del álcali. Los efectos aditivos no previstos ocurren desde fenoles, aminas aromáticas, altos niveles de azúcar o ácido ascórbico en el extracto. El ácido ascórbico reacciona fácilmente con el reactivo F-C y por lo tanto debe ser considerado. Sulfitos y dióxido de azufre también reaccionan con el reactivo F-C, y esto ha sido un problema en vinos, donde el SO_2 es un aditivo común. Debido a la química de F-C, de hecho, es una medida de fenoles totales y otros sustratos de oxidación. Sin embargo, el ensayo F-C es simple y reproducible y ha sido ampliamente utilizado para el estudio de antioxidantes fenólicos (Ainsworth y Gillespie, 2007, p. 875).

1.6 Flavonoides y su análisis:

Los flavonoides son una clase de metabolitos secundarios de plantas derivados de la condensación de un ácido cinámico con tres grupos malonil-CoA. Todos los flavonoides surgen de esta reacción inicial, que es catalizada por la enzima chalcona sintasa. La chalcona generalmente se convierte rápidamente en un fenilbenzopirano, y otra modificación conduce a las flavonas, isoflavonas, flavonoles o antocianinas. Adicionales cambios conducen a otras estructuras, principalmente a través de glicosilación, pero también vía acilación o alquilación, dando la gran variedad de estructuras flavonoides que se ven a través del reino vegetal. A los efectos del análisis, los

flavonoides se pueden clasificar básicamente en tres tipos: glucósidos flavonoides, flavonoides no polares (agliconas, flavonoides metilados o alquilados) y antocianinas. Cada tipo requiere una técnica analítica diferente. Las proantocianidinas, especialmente las formas oligoméricas, constituirían una cuarta clase (Bloor, 2001, pp 3-14).

El análisis de flavonoides ha sido realizado generalmente por métodos colorimétricos, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, cromatografía de gases con espectrometría de masas, y cromatografía líquida de alto rendimiento. Aunque las técnicas cromatográficas en combinación con análisis de espectro de absorción y espectrometría de masas proporcionan información definitiva para la identificación y cuantificación de flavonoides, estos métodos por lo general requieren instrumentos avanzados, varios estándares de calidad y consumen mucho tiempo. Por otro lado, los métodos colorimétricos dirigidos a los flavonoides de estructuras similares son convenientes y apropiados para análisis de rutina. Sin embargo, ninguno de los métodos colorimétricos puede detectar todos los tipos de flavonoides. Por ejemplo, dentro de los grupos principales de flavonoides, solo flavonoides y flavonoles se encuentran como complejos estables con cloruro de aluminio (Ainsworth y Gillespie, 2007, p. 875).

1.7 Ensayo de capacidad de captación de radicales por DPPH:

El radical DPPH es un radical de nitrógeno orgánico de larga duración y tiene un color morado oscuro. Está disponible comercialmente y no tiene que generarse antes del ensayo.

En este ensayo, el radical cromógeno púrpura se reduce por antioxidantes / compuestos reductores la correspondiente hidracina de color amarillo pálido La capacidad reductora de antioxidantes hacia DPPH puede evaluarse mediante resonancia de spin electrónico o controlando la disminución de la absorbancia a 515-528 nm hasta que permanece estable en medios orgánicos. Este método ampliamente utilizado fue reportado por primera vez por Brand-Williams et al. en 1995 (Brand-Williams et al, 1995, pp 25-30).

El porcentaje de DPPH (% DPPH rem) restante se calcula como:

$$\% \text{ DPPH rem} = 100 [\text{DPPH}]_{\text{rem}} / [\text{DPPH}]_{T=0}$$

% DPPH rem es proporcional a la concentración del antioxidante, y la concentración que causa una disminución en el la concentración inicial de DPPH en un 50% se define como EC50. El tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario con EC50 es definido como TEC50. En base a los valores de TEC50, el comportamiento cinético del antioxidante se clasifica de la siguiente manera: <5 min (rápido), 5-30 min (intermedio) y > 30 min (lento). Se ha introducido otro parámetro para expresar la capacidad antioxidante, llamada "eficiencia antirradical" [AE = (1 / CE50) TEC50] que es más discriminativo que TEC50 y más útil porque tiene en cuenta el tiempo de reacción. El ensayo DPPH es técnicamente simple y rápido, y necesita solo un

espectrofotómetro UV-Vis, esto explica su uso generalizado en el cribado de antioxidantes. Análisis de una gran cantidad de muestras puede realizarse usando microplacas (Karadag et al, 2009, pp 41-60).

1.8 Usos de sales de tetrazolio en biología celular:

Las sales de tetrazolio se han convertido en algunas de las herramientas más utilizadas en biología celular para medir la actividad metabólica de las células que van desde el mamífero hasta el origen microbiano. Con células de mamíferos, los estudios de fraccionamiento indican que el cofactor de nucleótido de piridina reducido, NADH es responsable de la mayoría de la reducción de MTT (2-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) y esto es respaldado por estudios con células completas. La reducción del MTT no solo está asociada con las mitocondrias, sino también con el citoplasma y con las membranas mitocondriales que incluyen el compartimento endosoma / lisosoma y membrana plasmática. La carga positiva neta en sales de tetrazolio como MTT parece ser el factor predominante involucrado en su captación celular a través del potencial de la membrana plasmática. Sin embargo, colorantes de tetrazolio de segunda generación que forman formazanos solubles en agua y requieren un aceptador de electrones para la reducción, como XTT (sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium sal) y WST-1 (sodium 5-(2,4-disulfophenyl)-2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-2H tetrazolium sal), se caracterizan por una carga negativa y, por lo tanto, son en gran parte impermeables a las células. Una evidencia considerable indica que su reducción ocurre en la superficie de la célula, o en el nivel de la membrana plasmática a través del transporte de electrones de membrana al plasma (Berridge et al, 2005, pp 127-152).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1 Lugar de Investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 Recolección del material vegetal

Se realizó la recolección del material vegetal de la especie *Sigesbeckia serrata DC*, en las afueras de la Universidad Nacional de Loja, Parroquia Argelia, cantón Loja, provincia de Loja, con las siguientes coordenadas geográficas:

- Latitud: -4.0329396
- Longitud: -79.20254
- Altitud: 2137 msnm

2.3 Identificación del material vegetal

Las plantas a ser investigadas fueron identificadas por el Ing. Nelson Jaramillo en el lugar de la recolección y verificadas por el Ing. Zhofre Aguirre Mendoza, Ph.D. Director del Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja. Esta investigación se realizó dentro del Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos firmado entre el Ministerio de Ambiente y la ESPOCH, asignado con el número MAE-DNB-CM-2018-0086, y con el número de orden de movilización 024-2018-UPN-VS-DPAL-MAE (Anexos N, O y P).

2.4 Materiales, Equipos y Reactivos

Para llevar a cabo la siguiente investigación fue necesario adquirir los siguientes equipos materiales y reactivos que se los nombrar a continuación.

2.4.1 *Material Vegetal*

Se usó las hojas de la planta *Sigesbeckia serrata* DC que es de interés para nuestra investigación. Se procede a secar la planta a temperatura ambiente, se coloca en un lugar seco que no se exponga a los rayos UV. Una vez totalmente seca se procede a ser triturada en molino (marca Arthur H. Thomas C.O) con el objetivo de obtener partículas de 2 – 3 mm, para la preparación del extracto que será utilizado en los diferentes ensayos.

2.4.2 *Material Biológico*

Para poder realizar el ensayo de la actividad antiinflamatoria y citotóxica fue fundamental aislar neutrófilos a partir de sangre humana de un paciente voluntario que se encuentre en perfectas condiciones de salud.

2.4.3 *Material farmacológico*

Fue necesario emplear ácido acetyl salicílico (100 mg) que es utilizada como control positivo en el ensayo de la actividad antiinflamatoria que se realizara en el laboratorio.

2.4.4 *Materiales de laboratorio*

Tabla 1-2: Materiales utilizados en el laboratorio

Análisis	Materiales
CONTROL DE CALIDAD	Pinzas para cápsula
	Cápsulas de porcelana
	Reverbero
	Piseta
	Crisoles de porcelana
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Papel Filtro
	Frascos ámbar de 1000 ml
	Vasos de precipitación de 250mL
	Trípodes
	Embudos simples
	Gradilla
	Tubos de ensayo
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	Trípodes
	Frasco tapa rosca de 10 mL
	Kitasato
	Probeta de 250 mL

	Embudo Buchner
	Pipetas de 5 mL y 10 mL
EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES	Pipeta graduada 10 mL
	Balones esmerilados de 150 mL
	Vaso de precipitación de 250 mL
ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	Paleta
	Balones de aforo de 250 ml y 10 ml
	Pipetas Pasteur
	Tubos de ensayo
	Piseta
ENSAYO ANTIINFLAMATORIO Y CITOTÓXICO	Torniquete
	Tubos de ensayo
	Gradilla
	Alcohol
	Algodón
	Jeringas 1 mL, 3 mL, 5 mL, 10 mL y 20 mL
	Micropipeta automática graduable 100 µL - 1000µL
	Vasos de precipitación de 50mL
	Balones aforados 10mL y 25mL
	Piseta
	Micropocillos
	Agua destilada

Realizado por: María José Rivera, 2018

2.4.5 Equipos de laboratorio

Tabla 2-2: Equipos utilizados en el laboratorio

Análisis	Equipo
Control de Materia Prima y Tamizaje Fitoquímico	Estufa Memmert SNB400
	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Balanza analítica Radwag
	Sonicador Marca Branson 2510
	Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C
Desecador	
Obtención del extracto bruto	Vórtex mixer MRC S1 – 100
	Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath
	Agitador magnético Dragon LAB MS-S
	Sonicador Marca Branson 2510
Extracción de compuestos fenólicos y flavonoides	Sonicador Marca Branson 2510
	Estufa Memmert SNB400
Ensayo Antiinflamatorio, Citotóxico y Antioxidante	Balanza analítica Radwag
	Sonicador Marca Branson 2510
	Centrífuga
	Vórtex mixer MRC S1 – 100

	Agitador magnético Dragon LAB MS-S
	Centrífuga
	Lector de microplacas

Realizado por: María José Rivera, 2018

2.4.6 Reactivos

Tabla 3-2: Reactivos utilizados en el laboratorio

Análisis	Reactivos
Tamizaje Fitoquímico	Reactivo de Dragendorff
	Reactivo de Wagner
	Reactivo de Mayer
	Reactivo de Liberman Buchard
	Reactivo de Baljet
	Reactivo para resinas
	Reactivo para catequinas
	Reactivo de Borntrager
	Reactivo de Fehling
	Reactivo de FeCl ₃
	Reactivo de Shinoda
	Reactivo de antocianidinas
	Cloruro de sodio
Obtención del extracto bruto	Magnesio metálico
Extracción de compuestos fenólicos y flavonoides	Metanol
	Ácido sulfúrico al 2%
	Éter etílico
	Metanol
	Hidróxido de amonio al 25%
	Goma arábiga
	Sulfato anhidro de sodio
Ensayo Antiinflamatorio	Acetato de etilo
	Ficoll Paque
	Agua destilada
	Reactivo WST-1
	Zimozan
	Solución modificada de Hans al 9.5g/L
	Dimetil sulfóxido al 5%
	Tritón X al 0.1%
Ensayo Citotóxico	Solución de aspirina
	Reactivo WST-1
	Ficoll Paque
	Dimetil sulfóxido al 5%
	Tritón X al 0.1%
	Solución modificada de Hans al 9.5g/L
Agua destilada	

Ensayo Antioxidante	Metanol
	Solución patrón de ácido gálico
	Agua destilada
	Solución de DPPH

Realizado por: María José Rivera, 2018

2.5 Técnicas y métodos

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

Ya recolectada la planta se hizo el control de calidad de la droga cruda. Cada ensayo se realizó por triplicado, basándose en pruebas fisicoquímicas, para evaluar la calidad de la droga. A continuación, se describen cada uno de los procedimientos que se realizaron, según manuales de farmacognosia y productos naturales (Miranda, 2006)

2.5.2 *Determinación del contenido de humedad*

Con este análisis se puede determinar la presencia de agua presente en la planta, es muy importante como indicador de estabilidad. Los límites señalados en las farmacopeas oscilan entre 8 y 14% ya que si existe gran cantidad de humedad el riesgo de contaminación microbiana al igual que la hidrólisis de ciertos metabolitos se puede presentar.

El método más empleado es el gravimétrico, pero no es aconsejable utilizarlo en drogas que tiene sustancias volátiles.

Procedimiento

Se pesa 2 g en una balanza analítica de la droga seca y triturada, se invierte en la cápsula de porcelana que anteriormente fue tarada. Se procede a desecar la droga en la cápsula a una temperatura de 105° C introduciéndole en una estufa de aire caliente durante 3 horas, posteriormente la cápsula se coloca en el desecador por 15 minutos hasta que se enfríe y se pesa. Se coloca nuevamente en la estufa la cápsula y se procede a pesar cada cierto tiempo hasta obtener un peso constante.

Expresión de resultados

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

Donde:

Hg = pérdida en peso por desecación (%).

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

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

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

2.5.3 Determinación de cenizas totales

Al obtener las cenizas totales incineradas el residuo inorgánico de la planta representa los minerales que contiene.

Procedimiento

Se pesa 2 g de la droga que se pulverizó en el crisol de porcelana anteriormente tarada. Posteriormente se calienta suavemente hasta carbonizar y después se incinera en la mufla a una temperatura de 750°C por dos horas.

Se saca la muestra y se coloca en el desecador hasta que se enfríe y luego se pesa, se debe repetir el proceso hasta que al pesar no difieran en más de 0.5 mg por g (masa constante).

Se añade peróxido de hidrógeno concentrado para blanquear la muestra, y se ingresa nuevamente a la estufa ya que esto quiere decir que nos quedaron trazas de carbón y hasta que quede completamente blanco.

Expresión de resultados

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

$$\%CT = \frac{Ca}{100 - H} \times 100$$

Donde:

Ca= porcentaje de cenizas en base hidratada.

M= masa de la cápsula vacía

M1= masa de la cápsula con la muestra antes del proceso de incineración.

M2= masa de la cápsula con la muestra incinerada.

CT= porcentaje de cenizas totales.

H= contenido de humedad.

2.5.4 Determinación de Cenizas Solubles en Agua

Forman parte de las cenizas totales y se caracterizan por ser solubles en agua.

Procedimiento

A las cenizas totales que se obtuvieron anteriormente se añade 15 mL de agua, se tapa el crisol y se procede a hervir suavemente durante 5 minutos. Una vez hecho todos estos pasos se filtra y lo que queda en el papel de cenizas restantes colocamos en el crisol inicial, se coloca en la mufla hasta previa carbonización e incineración por dos horas. Se retira de la mufla el crisol con la muestra, se coloca en el desecador hasta que se enfríe, se pesa, y se vuelve a repetir hasta que al pesar por dos veces no difiera en más de 0.5 mg por gramos.

2.5.5 Determinación de Cenizas Solubles en Ácido Clorhídrico

Se disuelve las cenizas con ácido clorhídrico al 10% y con el residuo podemos realizar los ensayos.

Procedimiento

Las pruebas se realizan por triplicado. Se adiciona 20 mL de ácido clorhídrico al 10%, se coloca el crisol, se tapa y se deja hervir en un reverbero durante 5 minutos. Luego se filtra la solución y lo restante se lava con agua destilada, posteriormente se carboniza el papel filtro colocando en un reverbero a una temperatura de 100-105°C y se procede a incinerar en la mufla a una temperatura 700-750°C durante 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo indicado se coloca en la mufla y se deja enfriar.

Expresión de los resultados

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

$$CT = \frac{Ca}{100 - H} \times 100$$

Donde:

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

M= masa de la cápsula vacía

M1= masa de la cápsula con la muestra antes del proceso de incineración.

M2= masa de la cápsula con la muestra incinerada.

CT= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base anhidra.

H= contenido de humedad.

2.5.6 Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fotoquímico o conocido como “screening” o tamizaje fitoquímico, es la etapa inicial de la investigación ya que permite la determinación cualitativa de los principales grupos químicos que contiene la planta en investigación.

Primeramente, debemos realizar una maceración, para lo que se utiliza un solvente de diferente polaridad con el único propósito de maximizar la extracción de los metabolitos presentes en la planta.

La finalidad de realizar el tamizaje fotoquímico es poder interpretar los resultados del screening farmacológico e identificar las diferentes acciones terapéuticas que contenga.

2.5.6.1 Extracción

Las hojas de la planta seca y triturada son sometidas a extracción con solventes de distinta polaridad, como se puede observar en el siguiente esquema basado en las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas. (MINSAP, 1992)

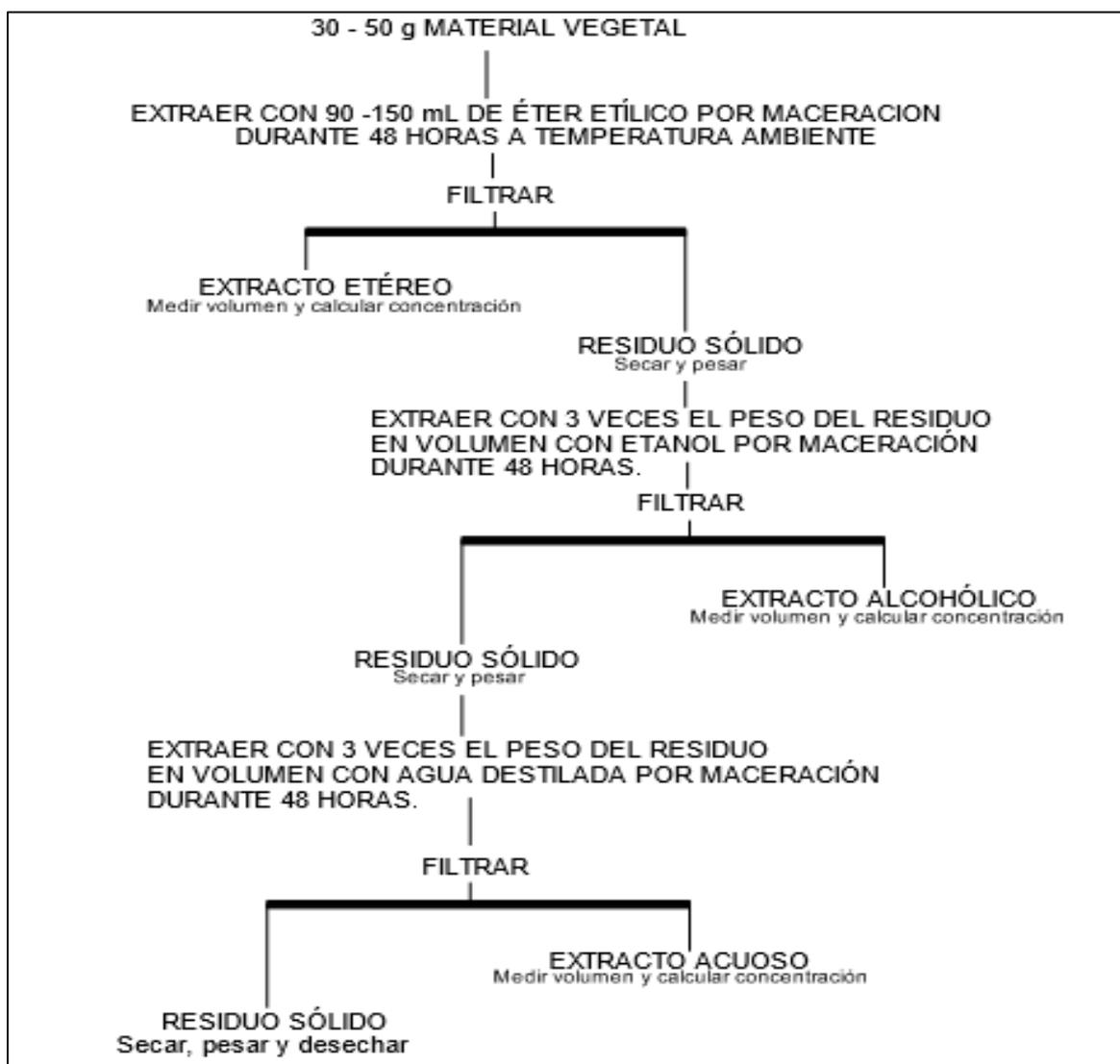


Figura 1-2: Protocolo de extracción para el tamizaje fitoquímico

Fuente: Miranda, 2006, pp.40

Ya obtenidos completamente todos los extractos, se procede a reconocer los metabólicos secundarios que posee la planta, guiándonos en los esquemas ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (MINSAP, 1992)

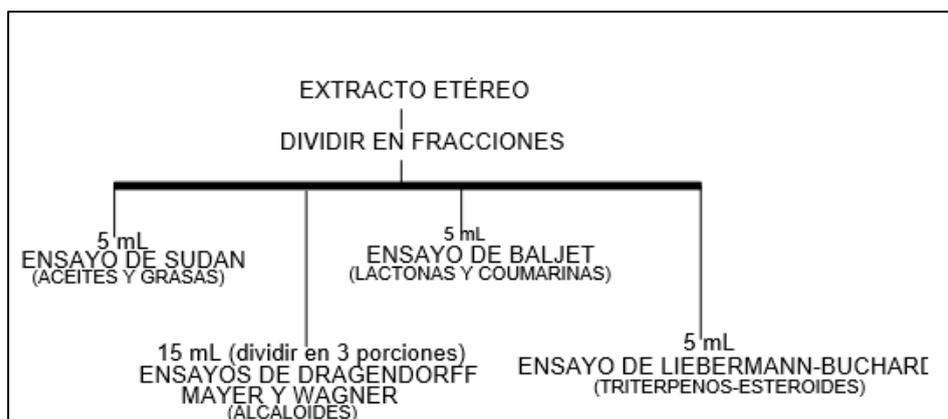


Figura 2-2: Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.

Fuente: Miranda, 2006, pp.40

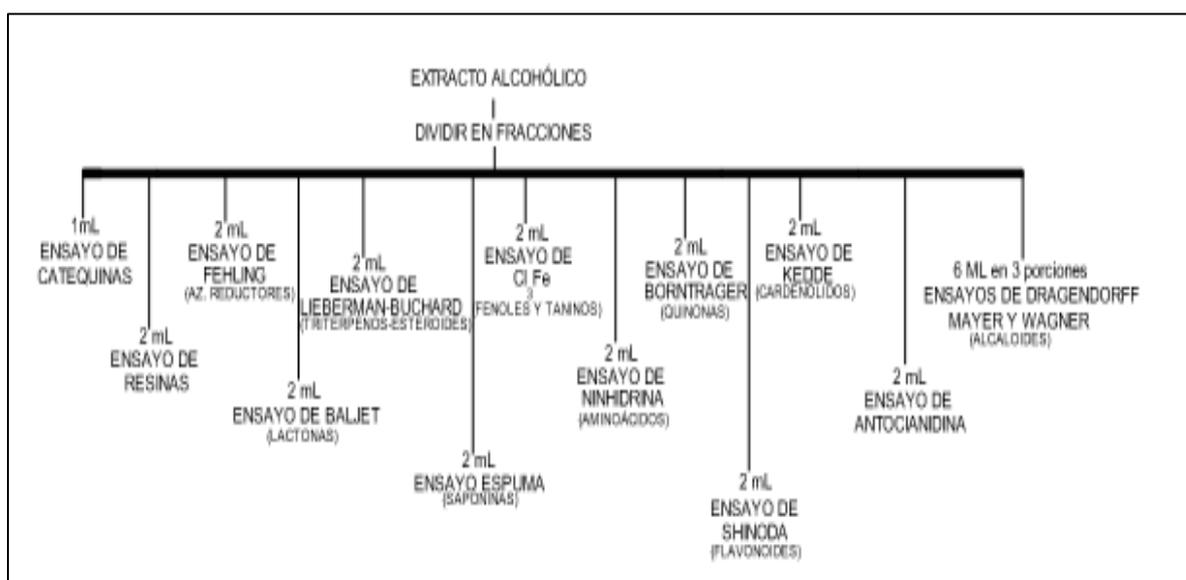


Figura 3-2 Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico

Fuente: Miranda, 2006, pp. 40

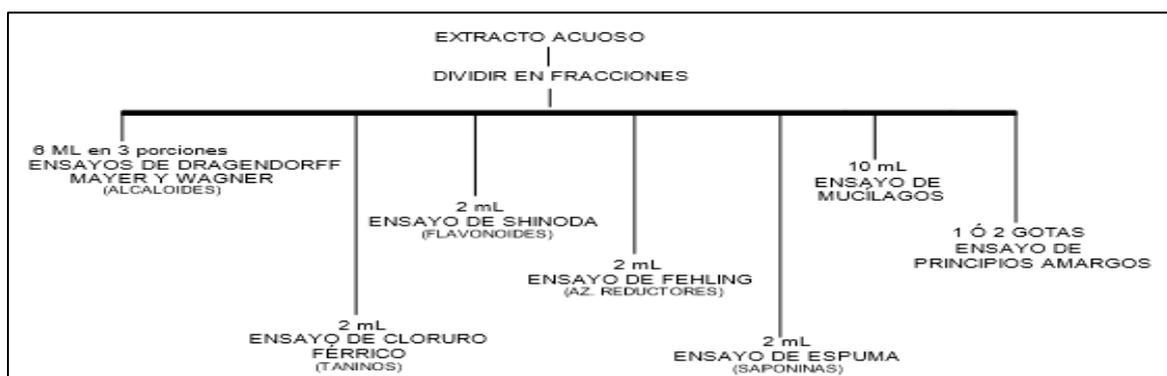


Figura 4-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.

Fuente: Miranda, 2006, pp.40

2.5.6.2 *Ensayo de Sudán*

En este ensayo se puede identificar la presencia de grasa en su composición. Se toma 5 mL del extracto vegetal al que le añadimos 1 mL de colorante de Sudán III o Sudán IV y se coloca en baño de agua hasta que el solvente se volatilice completamente.

Resultado

El ensayo da como resultado positivo cuando existe la presencia de una fina laminilla coloreada de color rojo en el líquido o en las paredes del tubo de ensayo se presentan gotas de color rojo.

2.5.6.3 *Ensayo de Dragendorff*

Permite identificar la presencia de alcaloides. La alícuota del extracto debe estar ya disuelta en un solvente orgánico, se procede a evaporar hasta eliminar por completo el solvente, y al residuo añadimos 1ml de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si tenemos un extracto acuoso, se añade una gota de ácido clorhídrico concentrado y se agrega 3 gotas de reactivo de Dragendorff.

Resultados

Se considera un ensayo positivo, si existe opalescencia (+), turbidez definida (++) o precipitado (+++).

2.5.6.4 *Ensayo de Mayer*

Es otro ensayo para identificar alcaloides. Se realiza la misma metodología que el ensayo de Dragendorff, pero se obtiene una solución ácida. Se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, se procede a agitar y posteriormente a filtrar, y finalmente se agrega el reactivo de Mayer de 2 a 3 gotas.

Resultado

Si el ensayo da positivo se presenta opalescencia (+), turbidez definida (++) y (+++) si presenta precipitado.

2.5.6.5 *Ensayo de Wagner*

Otro ensayo para identificación de alcaloides. Se toma una muestra del extracto, después se

procede a evaporar hasta eliminar por completo el solvente, al restante se le añade 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si es el extracto acuoso, se debe añadir una gota de ácido clorhídrico concentrado y finalmente se añade de 2 a 3 gotas del reactivo de Wagner.

Resultado

Si el ensayo es positivo se clasifica en tres niveles: cuando existe presencia de opalescencia (+), turbidez definida (++) y si presenta un precipitado (+++).

2.5.6.6 Ensayo de Baljet

Es un ensayo que nos permite identificar en el extracto compuestos que contengan, grupos lactónicos, como las cumarinas. Se procede a tomar una alícuota del extracto y se evapora hasta eliminar por completo el solvente, al residuo se agrega 1 mL de alcohol etílico, se mezcla y se adiciona el reactivo de Baljet 1ml.

Resultado

El ensayo es positivo, (++) cuando se produce una coloración rojiza y (+++) cuando hay presencia de un precipitado rojo.

2.5.6.7 Ensayo de Libermann-Burchard

Ayuda a detectar si existe compuestos triterpénicos y o esteroidales Para realizar este ensayo se necesita una alícuota del extracto, se debe evaporar hasta eliminar todo el solvente, y al residuo se le agrega 1 mL de cloroformo, después se añade 1 mL de anhídrido acético, se mezcla y se agrega de 2-3 gotas de ácido sulfúrico por las paredes del tubo de ensayo sin agitar.

Resultado

Si al realizar este ensayo da como resultado positivo el cambio de coloración es muy rápido:

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

2.5.6.8 *Ensayo de resinas*

Permite la identificación de resinas. Se toma una muestra del extracto etanólico, y se agrega 10 ml de agua destilada y se deja reposar por unos minutos.

Resultado

Si es positivo se observará un precipitado.

2.5.6.9 *Ensayo de la espuma*

Se puede identificar mediante este ensayo si existen saponinas esteroidales y triterpénicas. Se necesita 2 ml del extracto etanólico, y se procede a diluir en cinco veces su volumen en agua y se homogeniza fuertemente entre 5 y 10 minuto.

Resultado

El ensayo se considera positivo cuando existe espuma de más de 2 mm de altura en la superficie del líquido por un tiempo prolongado.

2.5.6.10 *Ensayo de Cloruro Férrico*

Permite identificar compuestos taninos y fenólicos en el extracto acuoso y alcohólico. Se toma la muestra del extracto y se agrega acetato de sodio con la finalidad de neutralizarlo y se añade tres gotas de cloruro férrico al 5% en solución salina.

Resultado

Es positivo cuando existe un cambio de coloración:

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

2.5.6.11 *Ensayo de Shinoda*

Se identifica si contiene flavonoides el extracto. Se diluye una muestra del extracto etanólico y/o acuoso con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y una pequeña cinta de magnesio metálico. Después que sucede la reacción se espera cinco minutos y se agrega alcohol amílico 1 mL, se agita y se deja reposar hasta que sus fases se separen.

Resultado

El resultado es considerado positivo si el alcohol amílico toma una coloración naranja, rojo, amarillo o carmelita.

2.5.6.12 *Ensayo de Borntrager*

Se identifica si existe quinonas en los extractos. Se toma una muestra del extracto y se procede a evaporar hasta eliminar por completo el solvente, al residuo se le agrega 1 mL de cloroformo, y finalmente se agrega 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua. Se homogeniza y se deja reposar hasta que se separaron sus fases.

Resultado

Es positivo cuando toma una coloración rosada la fase superior o acuosa alcalina del ensayo.

2.5.6.13 *Ensayo de Antocianidinas*

Identifica la presencia de estructuras de secuencia $C_6-C_3-C_6$ que pertenecen a los flavonoides. Se toma 2 ml del extracto etanólico y se agrega 1 ml de HCL concentrado, se calienta durante 10 min. Se espera hasta que se enfríe y se agrega 2 mL de alcohol amílico y 1 mL de agua. Luego se homogeniza bien y se deja reposar hasta separar en dos fases.

Resultado

Es positivo si en la fase amílica da una coloración marrón o rojo.

2.5.6.14 *Ensayo de Mucílagos*

Conocidos como polisacáridos, tiene la capacidad de formar un coloide hidrofílico que se caracteriza por tener un alto índice de masa que tiende a elevar la densidad del agua de donde se

extrae. Para este ensayo se toma una alícuota de la muestra del extracto, se coloca en agua hasta que se enfríe a una temperatura de 5 °C.

Resultado

Si su resultado es positivo toma una consistencia gelatinosa.

2.5.6.15 Ensayo de Principios amargos y astringentes

Para realizar este ensayo se toma una gota del extracto para saborearlo.

2.5.7 Preparación del extracto hidroalcohólico liofilizado

Se pesó 50 g de las hojas de la planta seca y triturada, se agregó 270 mL de agua y 730 mL se adiciona haciendo una relación de 1:10 EtOH 70%, se homogeniza y se deja macerar por 72 horas en un lugar oscuro y fresco. Después del tiempo transcurrido se filtra al vacío el extracto y finalmente la solución se concentra en el rotavapor a 60°C con el objetivo que el extracto quede libre de alcohol se filtra nuevamente y se congela, luego se liofiliza por un tiempo determinado hasta que el extracto quede libre de agua.

Finalmente se evalúa el rendimiento del extracto seco que se obtuvo:

$$\%RE = \frac{PL}{PO} \times 100$$

Donde:

%RE= porcentaje del rendimiento de extracción.

PL= peso del liofilizado obtenido

PO= peso de la planta del que partimos.

2.5.8 Determinación de fenoles totales

Para poder realizar la determinación de fenoles se utilizó la técnica conocida Folin-Ciocalteu, es una reacción de óxido-reducción colorimétrica ya que la sustancia oxidante es el reactivo de Folin-Ciocalteu. Después se procede a la preparación de la solución estándar de ácido gálico a concentraciones de 10, 20 , 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm (µg/mL), así podemos obtener la curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales del extracto utilizado para nuestro estudio.

Procedimiento:

Se toma una alícuota y se agrega 15 mL de agua destilada con 1.25 mL del Reactivo de Folin. Luego se debe esperar un tiempo de 8 minutos y se agrega 3.75 ml de Carbonato de Sodio 7.5% y se procede a aforar a 25 mL con agua destilada (vortear por 1 minuto + 2 horas en completa oscuridad). La medición para las lecturas se realiza a 765 nm (Hennebelle et al, 2008, pp. 211-222).

2.5.9 *Determinación de flavonoides totales*

Para poder realizar este ensayo se utilizó cloruro de aluminio y se midió por espectrofotometría. Se realizaron soluciones estándar de quercetina a concentraciones 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm (µg/mL), para la elaboración de una curva de calibración.

Procedimiento:

Se toma una alícuota del extracto y se añade 4 mL de agua destilada y se le agrega 0.3 mL de Nitrito de Sodio al 5%. Se debe esperar 5 minutos y agregar 0.3 mL de Cloruro de Aluminio al 10% (vortear en completa oscuridad por 5 minutos). Finalmente se agrega 2 mL de NaOH 1M y mezclar, se procede a medir y las lecturas se realizan a 510 nm (Hennebelle et al, 2008, pp. 211-222).

2.5.10 *Capacidad Antioxidante*

Para realizar la capacidad antioxidante se toma una alícuota de 100 µL y se homogeniza con 3,9 mL de la solución de DPPH por 20 minutos y se procede a incuba a una temperatura de 37 °C. Transcurrido ese tiempo se mide las absorbancias a una longitud de onda de 517 nm. Los radicales libres inhibidos DPPH (I%), se calcularon como se muestra a continuación (Elemike et al, 2017, 980-989).

$$I\% = \frac{ABS\ CONTROL - ABS\ MUESTRA}{ABS\ CONTROL} \times 100$$

Donde:

I%= porcentaje de los radicales libres inhibidos

ABS CONTROL= absorbancia de la muestra control.

ABS MUESTRA= absorbancia del extracto de

2.5.11 Aislamiento de neutrófilos de sangre humana

Se requiere de 10 mL de sangre venosa de un paciente sano, se recolecta en tubos de tapa roja, se agrega 1 mL de heparina sódica con el fin de evitar la coagulación sanguínea y se coloca MHS en relación 1:1 a la cantidad de sangre que fue extraída del paciente sano. Después se procede a ubicar 3mL de Ficoll en 4 tubos y se recomienda colocar lentamente la sangre tratada con MHS en proporción 4:3. Una vez terminados todos los pasos se procede a centrifugar por 30 a 1500 rpm. Después de transcurrido el tiempo se separan los neutrófilos de los tubos y se mezcla con MHS en proporción 2:1 y nuevamente se coloca a centrifugar por 20 minutos a 1500 rpm. Posteriormente se elimina el sobrenadante y se coloca la solución hipotónica de cloruro de amonio, y se coloca nuevamente a centrifugar. Finalmente, los neutrófilos son lavados con 1 mL MHS y resuspendidos a una concentración de 10^7 células/mL, manteniéndose en incubación a 37 °C hasta su posterior utilización (Berridge & Tan, 1998, pp. 74-82) (Tan & Berridge, 2000, p. 59-68).

2.5.12 Ensayo de citotoxicidad in vitro con neutrófilos aislados

Se realizó una solución diluyente de dimetilsulfóxido al 5% en MHS. Se prepara la solución de Tritón X-100 al 0.1% en MHS, posteriormente la solución madre de extracto hidroalcohólico liofilizado se pesó 25 mg de extracto en 25 ml de solución diluyente DMSO al 5%, y de la solución madre se realizó las respectivas diluciones a 200, 400, 600, 800, 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) (Berridge et al. 2005, pp.127-152).

La citotoxicidad in vitro del extracto en comparación con la aspirina se determinó mezclando en un pocillo 100 μL de las diluciones a 200, 400, 600, 800, 1000 ppm ($\mu\text{g/mL}$) del extracto, 140 μL de una suspensión de neutrófilos a aislados en MHS y 10 μL reactivo WST-1.

Tabla 4-2: Protocolo para la realización del ensayo de citotoxicidad *in vitro* de *Sigesbeckia serrata*.DC.

	Tratamientos	Soluciones de los Controles/extractos	Neutrófilos aislados	Reactivo WST-1
Controles del método	Control Positivo: solución de DMSO al 5%	100 µL	140 µL	10 µL
	Control Negativo: solución de Tritón X-100 al 0.1%	100 µL	140 µL	10 µL
Diluciones de la solución madre del extracto	1000ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	800 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	600 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	400 ppm	100 µL	140 µL	10 µL
	200 ppm	100 µL	140 µL	10 µL

Fuente: Berridge et al. 2005, pp. 127-152

Realizado por: María José Rivera, 2018.

En la tabla se encuentra las sustancias y la cantidad de cada una de ellas que se utilizó en los tratamientos que fueron realizados por triplicado. Posteriormente todos los tratamientos fueron incubados en una estufa a 37 °C durante 3 horas, y finalmente, se leyó su absorbancia en un lector de microplacas a 450 nm. Para calcular el porcentaje de viabilidad celular con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia de sustancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del DMSO al 5\%}} \times 100$$

2.5.13 Ensayo antiinflamatorio *in vitro* con neutrófilos aislados

Para la determinación de la actividad antiinflamatoria se desarrolla la técnica descrita por Tan y Berridge, y aplicada por Choudnary (Berridge et al. 2005, pp.127-152).

Para ello, el extracto liofilizado debe ser disuelto en DMSO 5% en solución modificada de Hank's, para lograr concentraciones de 12.5, 25, 50, 100 y 200 ppm. Conjuntamente, se preparan las muestras de ácido acetilsalicílico, como control, a las mismas concentraciones, disueltas en solución modificada de Hank's. Posteriormente, se preparan los micro pocillos para lector de

micro Elisa, con suspensión de neutrófilos aislados, a una concentración de 10^7 neutrófilos por mL, 100 μ L de DMSO como blanco y Tritón X-100 0.1% como control, las muestras de referencia de ácido acetilsalicílico con 10 uL de WST-1. Se incuba a 30 minutos a 37 °C. Luego, se agrega 50 μ L de zymosan A opsonizado y se incuba por 60 minutos. Finalmente, se mide en el lector de microplacas a 450 nm.

El porcentaje de la inhibición de la inflamación se calcula:

$$\% \text{ ANTIINFLAMATORIO} = 100 - \left(A_M \times \frac{100}{A_{DMSO}} \right)$$

Donde:

A_M = absorbancia de la muestra

A_{DMSO} = absorbancia del control

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 Control de calidad de droga cruda de *Sigesbeckia serrata*.

Después de realizar por triplicado los análisis para determinar la calidad de las hojas de *Sigesbeckia serrata* a utilizarse como droga cruda para los ensayos posteriores, se obtuvieron los resultados presentados a continuación.

Tabla 1-3: Control de calidad de droga cruda de *Sigesbeckia serrata*.

Parámetro	<i>Sigesbeckia serrata</i> hojas (%)	Límites (USP 35)
Humedad	11.51±0.54	≤ 14%
Cenizas totales	10.95±0.13	≤ 12%
Cenizas solubles en agua	4.77±0.37	≤ 7%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	2.21±0.09	≤ 5%

Realizado por: María José Rivera, 2018

El control de los parámetros físico químicos de la droga cruda es indispensable para asegurar que esta se encuentre en condiciones óptimas para su uso con fines medicinales y de investigación, libre de elementos contaminantes biológicos y no biológicos, garantizando su estabilidad (WHO, 1998, pp. 7-11).

De acuerdo a los análisis efectuados, la droga seca de *S. serrata* sobre la cual se realizó la presente investigación, tiene un contenido de 11.51% de humedad, 10.95% de contenido de cenizas solubles, 4.77% de contenido de cenizas solubles en agua, y 2.21% de contenido de cenizas insolubles en ácido clorhídrico. Todos estos valores se encuentran dentro de los parámetros establecidos como referencia en la USP N° 35, por cuanto se considera que la droga cruda es apta para determinarse su actividad biológica.

Un exceso de humedad promueve el crecimiento de bacterias, la presencia de hongos e insectos, y el deterioro de metabolitos secundarios por hidrólisis. Por su parte, el exceso de cenizas puede indicar una gran cantidad de impurezas adheridas al material vegetal, como pueden ser arena y tierra, o un gran contenido de sustancias minerales de la propia planta (WHO, 1998, pp. 7-11)

3.2 Tamizaje fitoquímico

Tabla 2-3: Tamizaje fitoquímico de hojas de *Sigesbeckia serrata*.

Tipo de metabolito	Ensayo	Extracto etéreo	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Aceites, grasas	Sudán	+		
Alcaloides	Dragendorff	+	+	+++
Alcaloides	Wagner	+++	+	++
Alcaloides	Mayer	+	+	++
Lactonas, cumarinas	Baljet	-	+++	
Triterpenos, esteroides	Liebermann Burchard	+ (azul)	+ (azul)	
Taninos	Cloruro férrico		+ (verde)	+ (rojo)
Azúcares reductores	Fehling		-	+
Catequinas	Catequinas		+	
Resinas	Resinas		+	
Saponinas	Espuma		-	-
Flavonoides	Shinoda		+	+
Antocianidinas	Antocianidinas		+	
Mucílagos	Mucílagos			+
Principios amargos	Principios amargos			-
Quinonas	Borntreger		-	
Glicósidos cardiotónicos	Kedde		-	
Aminoácidos libres, aminas	Ninhidrina		+	

Realizado por: María José Rivera, 2018

El tamizaje fitoquímico permite obtener una idea general de los grupos de metabolitos primarios y secundarios que se encuentran presentes en extractos de diferentes polaridades. Este conocimiento permite dirigir la investigación de las especies vegetales para la comprobación de sus actividades biológicas y terapéuticas, así como posibles interacciones, contraindicaciones, efectos adversos, estabilidad, entre otros, que deberán ser profundizados en ensayos más especializados.

Como puede observarse, los metabolitos más destacados en el extracto etéreo de *S. serrata* pertenecen a los alcaloides, aceites y/o grasas, y triterpenos. En el caso del extracto etanólico, se destaca la presencia de lactonas y/o cumarinas, alcaloides, triterpenos, taninos de estructura pirocatecólica, catequinas, resinas, flavonoides, antocianidinas y aminoácidos libres u otras aminas. En el extracto acuoso se evidencia la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides, mucílagos y azúcares reductores.

Estos resultados concuerdan con la investigación realizada en 2002 sobre los pelos glandulares de las hojas de esta planta y su producto de secreción. En este estudio se encontró la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos, grasas, y numerosos terpenoides que forman parte de su aceite esencial (Heinrich et al, 2002, pp. 459-469). Otras especies del género *Sigesbeckia* tienen una composición similar, como *S. pubescens* que contiene diterpenos derivados de kaurano y sesquiterpeno lactonas, y *S. orientalis*, que contiene principios amargos entre los que destaca darutósido (Heinrich et al, 2002, pp. 459-469) y en la que fueron identificados flavonoides como agliconas, con capacidad antioxidante (Nikolova y Dzhurmanski, 2009, pp. 109-111). La actividad antibiótica demostrada en otras investigaciones es atribuida a los diterpenos (Bardón et al, 2007, pp. 227-231).

En el extracto acuoso de *Siegesbeckia orientalis* se determinó la presencia mayoritaria de alcaloides, flavonoides y saponinas, y moderada de taninos y otros compuestos fenólicos (Nwaogu, 2017, pp. 54-60). En otro estudio sobre la misma especie, se encontraron azúcares, flavonoides, alcaloides, esteroides, aminoácidos, taninos, fenoles, lípidos y saponinas (Manjusha y Merugu, 2017, pp. 1526-1531). Así, se puede observar la similitud entre ambas especies, salvo por la presencia de saponinas, que no fue evidenciada en *S. serrata*. Se destaca la presencia de alcaloides en este género, que merece una investigación más profunda.

3.3 Control de calidad del extracto hidroalcohólico

Tabla 3-3: Parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*.

Parámetro	Resultados
Características Organolépticas	
Aspecto	Líquido
Color	Café oscuro
Sabor	Amargo
Olor	Herbal
Características fisicoquímicas	
Ph	6.58
Densidad	0.904
Índice de refracción	1.366
Sólidos totales	1.42±0.08

Realizado por: María José Rivera, 2018

Los controles fisicoquímicos y organolépticos realizados al extracto alcohólico permiten tener una idea general de sus principales características, a fin de que sirvan como parámetros de referencia para realizar comparaciones con otras muestras similares. En este caso, el extracto hidroalcohólico de *S. serrata* presenta un aspecto líquido, lo que indica que se encuentra muy

diluido y no presenta cantidades excesivas de compuestos que puedan darle un aspecto turbio o gelatinoso, como es el caso de los mucílagos. Su color es café oscuro, que generalmente es un indicativo de que la clorofila extraída ha sufrido oxidación, por cuanto se deduce que el extracto debe conservarse protegido de la luz y en envases herméticos para que sus compuestos no sufran degradación. El sabor es amargo, propio de muchos extractos vegetales, y su aroma característico es herbal.

En cuanto a sus características fisicoquímicas, presenta un pH de 6.58, lo que indica que contiene sustancias que son levemente ácidas, como flavonoides, fenoles, taninos, entre otros (Ochoa et al, 2013, pp. 52-59). La densidad relativa es de 0.904, menor a la del agua, lo que indica que existen sustancias en el extracto, como aceites, grasas, terpenos, entre otros (Ochoa et al, 2013, pp. 52-59). Su índice de refracción es de 1.366, igualmente dependiente de las sustancias que se han extraído, y su cantidad de sólidos totales es de 1.42 mg/g de materia seca, que no es un valor considerable. Este parámetro determina la cantidad de compuestos activos que pueden ser extraídos con un determinado método (WHO, 1998, pp. 7-11).

3.4 Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles totales del extracto hidroalcohólico de *S. serrata* fueron cuantificados según la técnica desarrollada por Folin y Ciocalteu (Folin & Ciocalteu, 1927). Para esto, fue realizada una curva de calibración utilizando ácido gálico, para comparar concentraciones de esta sustancia de referencia con sus respectivas absorbancias, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$y = 0.0014x + 0.0144 \text{ (R}^2 = 0.999\text{)}$$

donde “x” representa a la concentración en ppm y “y” representa la absorbancia. Así, se pudo interpolar el valor de la absorbancia obtenida tras la medición por triplicado de una muestra del extracto hidroalcohólico de *S. serrata* a una concentración de 1000 ppm, obteniéndose el resultado mostrado a continuación.

Tabla 4-3: Cuantificación de fenoles totales en extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Muestra de ensayo	Fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto)	Fenoles totales (g equivalentes de ácido gálico / 100 g de extracto) (%EQFT)
Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>S. serrata</i> (1000 ppm)	74.48±0.41	7.448±0.41

Realizado por: María José Rivera, 2018

El contenido de fenoles totales cuantificados como equivalentes de ácido gálico en el extracto hidroalcohólico de *S. serrata* es de 74.48±0.41 mg/g de extracto, o 7.448±0.41 g/100 g de extracto (%EQFT). No existen estudios publicados donde se determine este parámetro en esta especie, por cuanto no se puede dar una comparación de resultados. Sin embargo, investigaciones realizadas sobre *S. orientalis* reportan la presencia de compuestos fenólicos en cantidad moderada (Nwaogu, 2017, pp. 54-60).

Los compuestos fenólicos tales como flavonoides, taninos, cumarinas, xantonas, etc., poseen una significativa actividad antioxidante, y son vistos como sustancias terapéuticas promisorias para el tratamiento de patologías provocadas por la acción de radicales libres (Kang et al, 2003, pp. 231-236).

3.5 Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales fue realizada de acuerdo a las técnicas de Brend y Padmanabhan (2012). Para la curva de calibración se utilizaron los valores de las concentraciones crecientes de una solución de quercetina en comparación con sus respectivas absorbancias. Se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 0.0014x + 0.0144 \text{ (R}^2 = 0.999\text{)}$$

donde “x” representa a la concentración en ppm y “y” representa la absorbancia. Interpolando los valores de absorbancia obtenidos por triplicado de una muestra del extracto hidroalcohólico de *S. serrata* a una concentración de 1000 ppm, se obtuvo el siguiente resultado.

Tabla 5-3: Cuantificación de fenoles totales en extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Muestra de ensayo	Flavonoides totales (mg equivalentes de quercetina/g de extracto)	Flavonoides totales (g equivalentes de quercetina / 100 g de extracto) (%EQFT)
Extracto hidroalcohólico liofilizado de <i>S. serrata</i> (1000 ppm)	60.43±1.24	6.043±1.24

Realizado por: María José Rivera, 2018

El contenido de flavonoides totales cuantificados como equivalentes de quercetina en el extracto hidroalcohólico de *S. serrata* es de 60.43±1.24 41mg/g de extracto, o 6.043±1.24g/100 g de extracto (%EQFT). Esto coincide con los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, en donde se observó la evidente presencia de flavonoides.

En estudios de otras especies del género *Sigesbeckia* se observa una abundante presencia de flavonoides (Nwaogu, 2017, pp. 54-60). Los flavonoides son pigmentos aromáticos de 15 carbonos que se encuentran en plantas verdes, e incluyen chalconas, flavononas, flavonas, biflavonoides, dihidroflavonoles, antocianidinas y flavonoles. Ya que contienen un grupo hidroxilo aromático, como otros polifenoles, tienen una importante acción antioxidante (Kang et al, 2003, pp. 231-236). De hecho, varias investigaciones realizadas sobre *S. orientalis* atribuyen su actividad antioxidante y antiinflamatoria a su contenido en flavonoides (Manjusha y Merugu, 2017, pp. 1526-1531) (Nikolova y Dzhurmanski, 2009, pp. 109-111), además de las metil flavonas presentes en *Siegesbeckia glabrescens*, que mostraron actividad antiinflamatoria (Kim et al, 2008, pp. 1511-1514).

3.6 Actividad antioxidante *in vitro*

La estimación de la actividad antioxidante se realizó a través del ensayo de captación de electrones por DPPH, según la técnica desarrollada por Brand-Williams (1995), y modificada por Alhakmani y col. (2014).

Los resultados son presentados a continuación.

Tabla 6-3: Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Concentración del extracto (ppm)	Captación de radical libre DPPH (%)
10	8.39
20	8.66
50	9.72
100	9.99
200	18.91
500	27.96
1000	30.76

Realizado por: María José Rivera, 2018

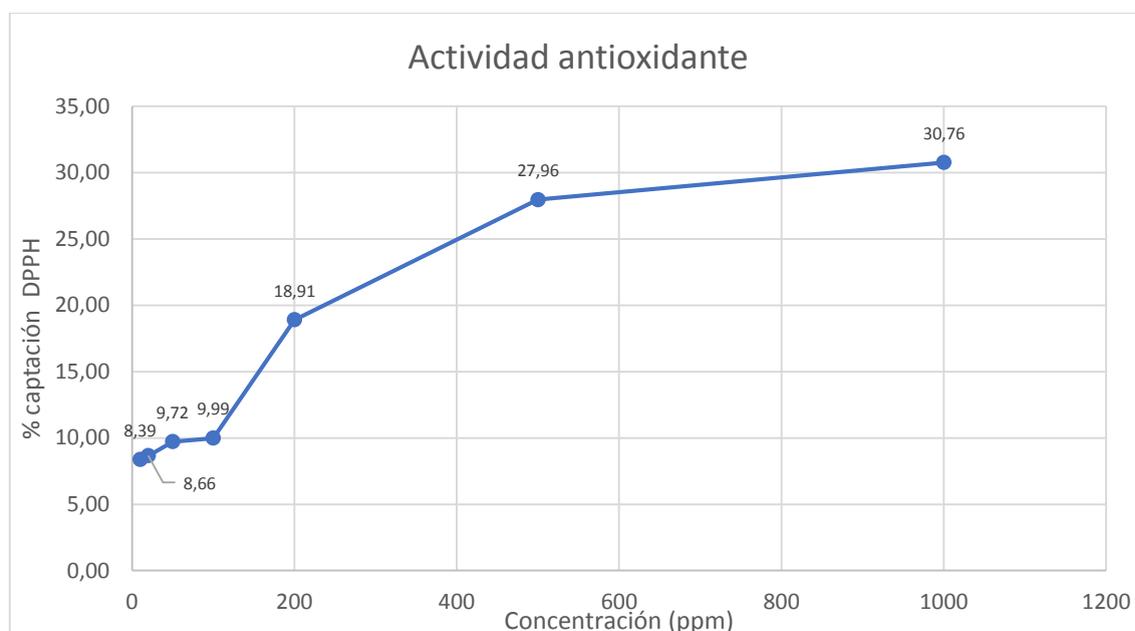


Gráfico 1-3: Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018

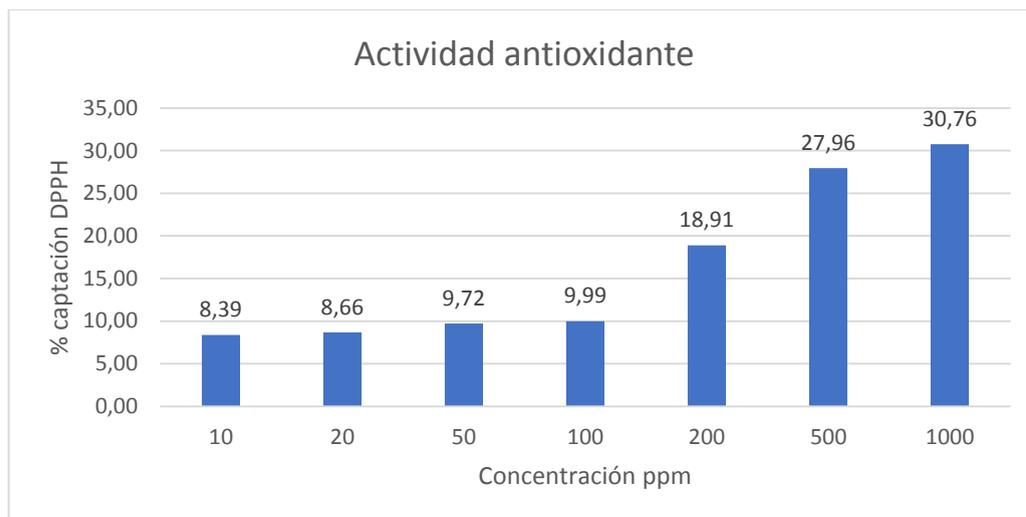


Gráfico 2-3: Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018

Como se muestra en la tabla, el extracto hidroalcohólico de *S. serrata* presenta actividad antioxidante expresada como capacidad de captación del radical libre DPPH, directamente proporcional a su concentración. Esta capacidad llega a un 30.76 % a 1000 ppm. Para fines prácticos, y ya que las concentraciones ensayadas no llegan a un 50%, se ha calculado el IC25 en lugar del IC50, dando como resultado 572.95 ppm.

Realizando los análisis estadísticos, se puede observar que la captación de radicales libres de DPPH está relacionada significativamente con las concentraciones del extracto de *Sigesbeckia serrata*. El 86.07% de esta capacidad de captación de radicales libres, depende de las concentraciones del extracto en estudio. Y por cada unidad de concentración de extracto de *S. serrata* aplicada en el espectrofotómetro la captación de radicales libres incrementa en 0.0245 puntos porcentuales (Anexo A).

Para realizar una comparación, se pueden mencionar ensayos similares efectuados sobre otra especie del mismo género, como *Sigesbeckia orientalis*. Así, un screening efectuado sobre varias especies para determinar su capacidad de captación de radicales DPPH demostró que el IC50 para el extracto metanólico de *S. orientalis* fue mayor a 200 ppm, por cuanto no fue considerado como un antioxidante potente (Nikolova y Dzhurmanski, 2009, pp. 109-111). Estos datos son confirmados por otro estudio, en donde comparando diferentes fracciones de un extracto de esta especie, se obtuvo un IC50 mínimo de 590 ppm para la capacidad de captación de radicales libres DPPH en una fracción de acetato de etilo (Yang et al, 2016, pp. 288-293). Según bibliografía, se considera que existe una capacidad antioxidante significativa cuando a 200 ppm existe una

capacidad captadora de radicales libres mayor o igual a 50%, o, dicho de otra manera, el IC50 es menor o igual a 200 ppm (Kang et al, 2003, pp. 231-236).

Sin embargo, ensayos realizados sobre *S. orientalis* para determinar su capacidad antioxidante a través de la captación de radicales libres de peróxido de hidrógeno, evidenciaron un IC50 de 64 ppm de un extracto clorofórmico, y de 43 ppm de un extracto metanólico (Manjusha y Merugu, 2017, pp. 1526-1531). En un screening de varias plantas utilizadas en medicina coreana, se determinó que el extracto acuoso de *S. orientalis* presentaba una capacidad de captación de radicales superóxido de 67.6% a 200 ppm, mientras que su extracto metanólico presentaba una capacidad de captación de radicales hidroxilo de 84.5% a 200 ppm (Kang et al, 2003, pp. 231-236).

Dado el alto valor de IC25 que se ha obtenido en el presente estudio, puede afirmarse que el extracto hidroalcohólico de *S. serrata* no posee una capacidad antioxidante significativa, tomándose como referencia su capacidad de captación de radicales DPPH. Esto puede deberse a que, según los datos recopilados, no posee una cantidad abundante de flavonoides y compuestos fenólicos en su composición, que son los metabolitos a los que mayormente se atribuye la capacidad antioxidante.

3.7 Actividad antiinflamatoria *in vitro*

La actividad antiinflamatoria fue estimada a través del estudio espectrofotométrico de la reducción de sales de tetrazolio (WST-1) en presencia de neutrófilos activos, de acuerdo a la técnica desarrollada por Tan y Berridge (2000), con modificaciones.

Los resultados son presentados a continuación.

Tabla 7-3: Actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Concentración	% Inhibición inflamatoria
Control (ácido acetilsalicílico)	
200 ppm	54.59±1.67
100 ppm	30.85±2.15
50 ppm	11.12±3.93
25 ppm	7.97±0.54
12.5 ppm	4.59±3.12
Extracto hidroalcohólico de <i>Sigesbeckia serrata</i>	
1000	53.74±1.49
800	45.11±2.36
600	38.44±3.06
400	12.13±0.91
200	2.51±1.21

Realizado por: María José Rivera, 2018

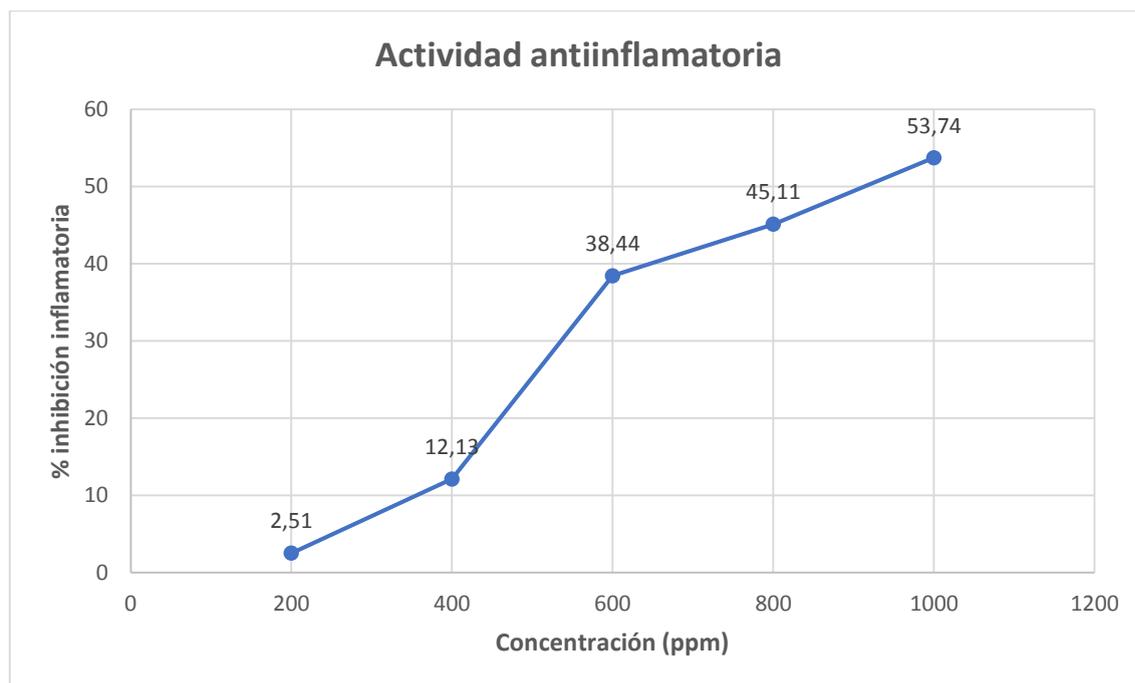


Gráfico 3-3: Actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018

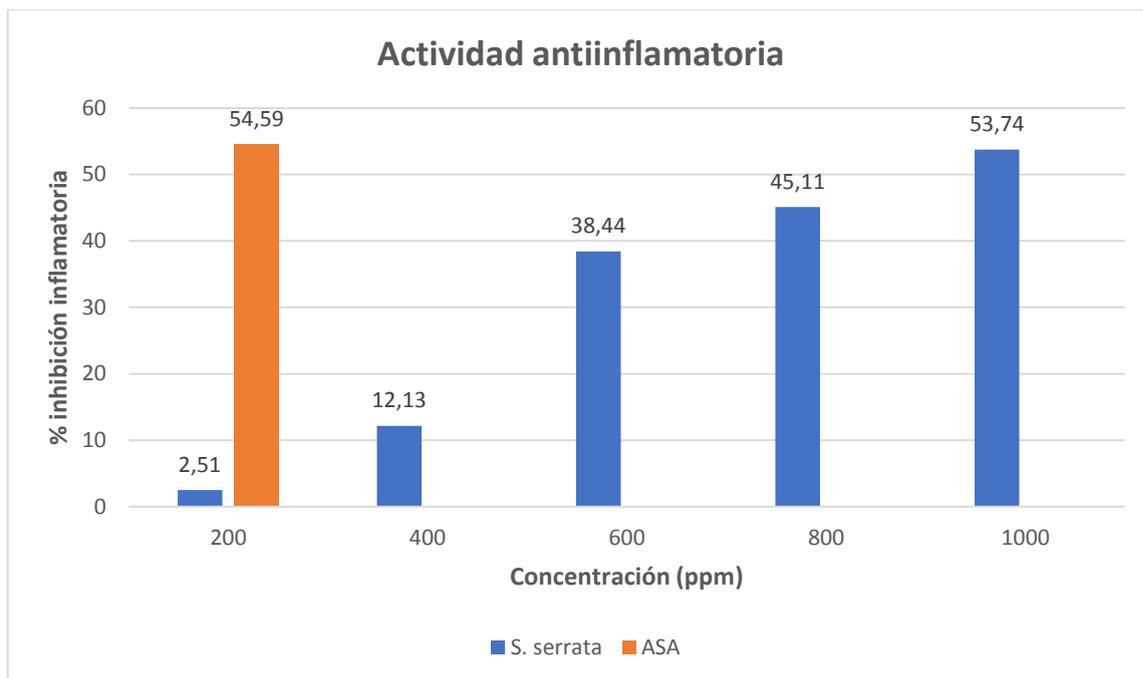


Gráfico 4-3: Actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018

Como puede observarse en la tabla, el extracto hidroalcohólico de *S. serrata* presenta una actividad antiinflamatoria directamente proporcional a su concentración, superando el 50% de inhibición inflamatoria a una concentración de 1000 ppm. Como puede observarse en la gráfica, el control de ácido acetilsalicílico utilizado superó este valor apenas a los 200 ppm de concentración, por cuanto puede estimarse a simple vista que la actividad antiinflamatoria de la especie investigada es menor que la del ácido acetilsalicílico. El IC₂₅ corresponde a 524.70 ppm, que es la concentración de extracto que se requiere para inhibir el proceso inflamatorio en un 25%.

Mediante la aplicación del test de ANOVA de un factor se determinó que existe diferencia significativa en el porcentaje de inhibición inflamatoria si se utiliza el extracto hidroalcohólico de hojas de *S. serrata*, y aspirina a 200 ppm, puesto que se obtuvo un valor p igual a 0, siendo menor al nivel de confianza (0.05). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, que dice que no existe diferencia significativa entre grupos, y se acepta la hipótesis alterna, que dice que por lo menos una media en los grupos es diferente (Anexo B).

Para establecer el conjunto de datos que presentan diferencia, se realizó el test de Tukey a 95% de confianza, observándose que el extracto de *S. serrata* a una concentración de 1000 ppm no presenta diferencias significativas con aspirina a 200 ppm respecto a su capacidad para inhibir la inflamación. Esto significaría que, en la práctica, el uso de ambas concentraciones produciría similares resultados. Sin embargo, se debe recordar que se trata de un ensayo *in vitro*, puesto que

in vivo intervienen una gran cantidad de factores biológicos que pueden alterar los resultados. Por otra parte, se valora más a aquellas sustancias que a bajas dosis pueden producir los efectos deseados, y este no es el caso del extracto de *S. serrata*, puesto que, como se observa, se debe quintuplicar su dosis para obtenerse el mismo efecto que con ácido acetilsalicílico. También se observa que los extractos de *S. serrata* a concentraciones de 200, 400, 600 y 800 ppm son significativamente diferentes entre sí en cuanto a su efecto antiinflamatorio, lo que demuestra que existe una fuerte relación directamente proporcional entre su concentración y su actividad (Anexo B).

Estos resultados difieren de los obtenidos al investigar la actividad antiinflamatoria de *S. orientalis*. En dicha especie, se ensayó el efecto del extracto etanólico en modelos *in vivo* e *in vitro*. Se observó que a 50 ppm se inhibía en un 57% la producción de NO, así como de citoquinas proinflamatorias, mostrando un efecto similar en el edema plantar inducido por carragenina en animales de experimentación (Hong et al, 2014, pp. 1-10).

En otro estudio, se comprobó la actividad antiinflamatoria de sesquiterpenos aislados de *S. orientalis* en un modelo celular, hallándose que eran capaces de inhibir de manera significativa la expresión de iNOS y COX-2 a través de la supresión de la activación de NF-kB (Li et al, 2011, pp. 1323-1327). Ensayos similares utilizando kireno, un diterpeno aislado de esta especie vegetal, en un modelo animal, evidenció el mismo efecto (Wang et al, 2011, pp. 1089-1094).

En otro ensayo realizado sobre macrófagos murinos para comparar varias especies del género *Sigesbeckia*, se comprobó que *S. glabrescens* posee una mayor actividad inhibitoria de inductores de la inflamación, como NO e IL-6, que *S. orientales* y *S. pubescens* (Guo et al, 2018, p.141).

La diferente actividad antiinflamatoria de *S. serrata* con otras especies del mismo género puede deberse al perfil fitoquímico de esta especie en estudio, donde se observa una menor cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos que las reportadas en estudios preliminares de *S. orientalis*, por ejemplo.

3.8 Actividad citotóxica in vitro

Para determinar el porcentaje de viabilidad celular a diferentes concentraciones del extracto, se ha utilizado el método espectrofotométrico de Tan y Berridge (2000) con modificaciones.

Los resultados son presentados a continuación:

Tabla 8-3: Actividad citotóxica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Concentración	% viabilidad celular
Control (ácido acetilsalicílico)	
200 ppm	56.83±3.05
100 ppm	71.85±1.88
50 ppm	74.42±6.05
25 ppm	81.92±3.08
12.5 ppm	88.82±14.02
Extracto hidroalcohólico de <i>Sigesbeckia serrata</i>	
1000	71.73±3.76
800	69.52±4.52
600	71.44±13.98
400	98.81±4.18
200	99.97±3.65

Realizado por: María José Rivera, 2018

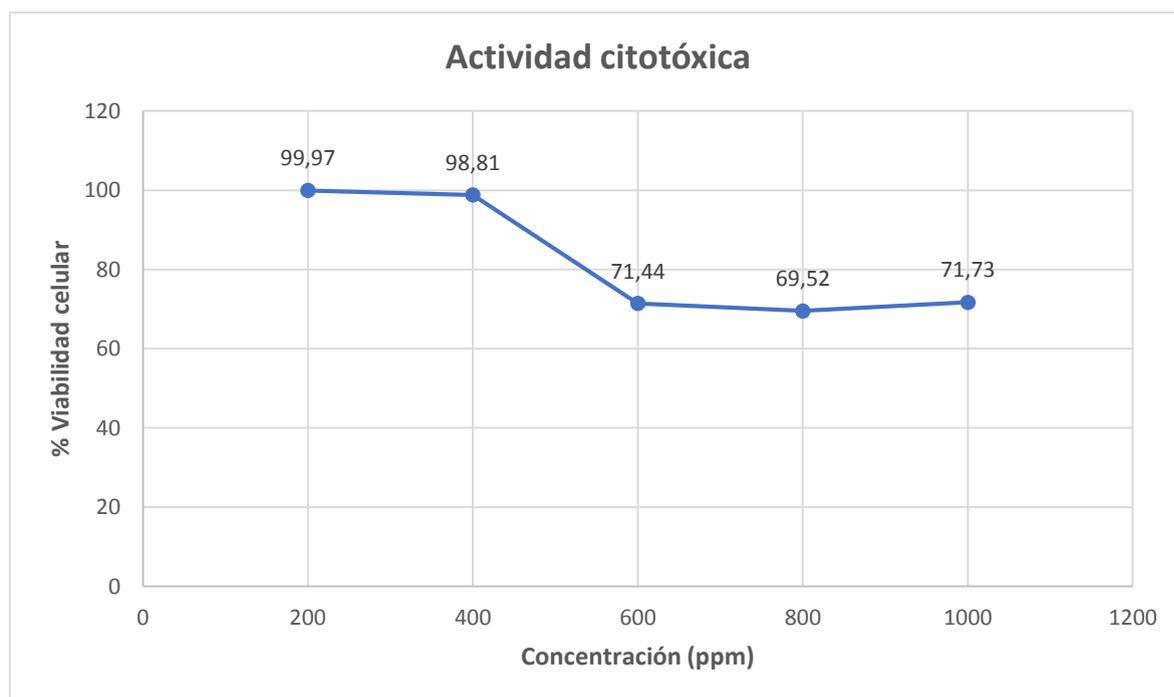


Gráfico 5-3: Actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018

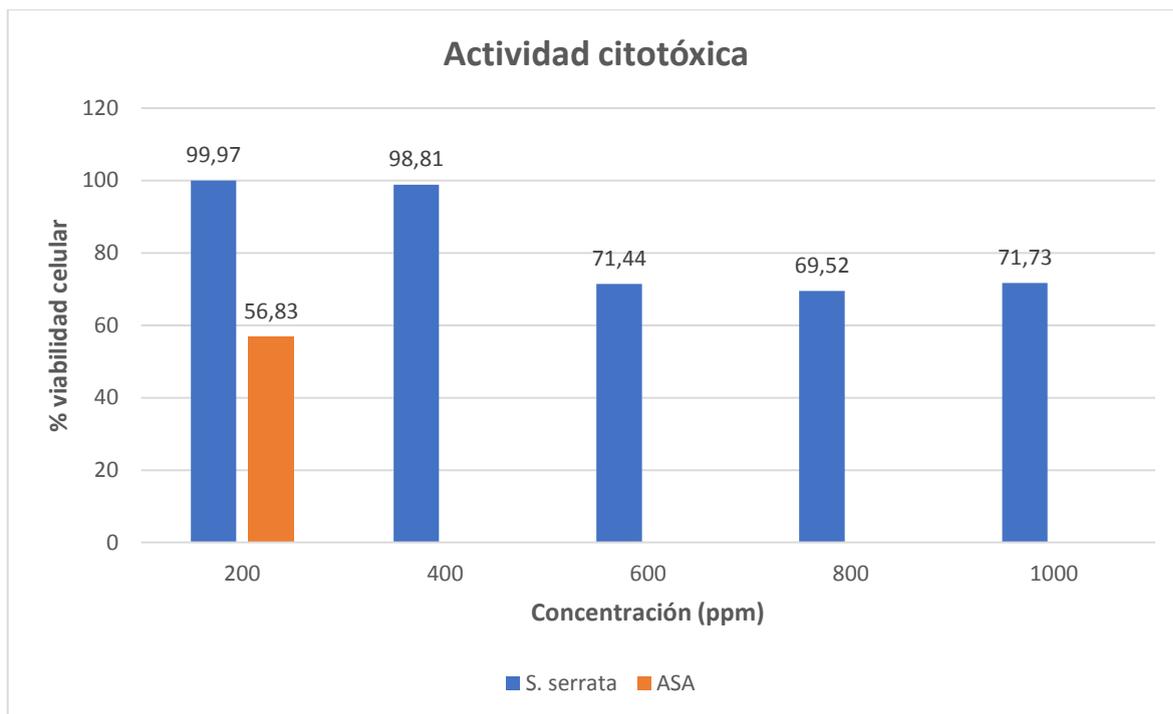


Gráfico 6-3: Actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018

Como puede observarse en la tabla, la viabilidad celular de neutrófilos aislados en presencia del extracto hidroalcohólico de *S. serrata* es inversamente proporcional a su concentración. A 1000 ppm la viabilidad celular es aún un poco mayor a 71%. Como puede verse en la gráfica, con el control de ácido acetilsalicílico a 200 ppm se obtuvo una reducción de la viabilidad celular cercana al 44%, mientras que a la misma concentración del extracto estudiado se presentó una insignificante reducción de la viabilidad celular, por cuanto se puede estimar que el efecto citotóxico de la especie investigada es menor a la de ácido acetilsalicílico. El IC₂₅ corresponde a 727.96 ppm, que es la concentración de extracto que se requiere para disminuir la viabilidad celular en un 25%.

Mediante la aplicación del test de ANOVA de un factor se determinó que existe diferencia significativa en el porcentaje de viabilidad celular obtenido si se utiliza el extracto hidroalcohólico de hojas de *S. serrata*, y aspirina a 200 ppm, puesto que se obtuvo un valor p igual a 0, siendo menor al nivel de confianza (0.05). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, que dice que no existe diferencia significativa entre grupos, y se acepta la hipótesis alterna, que dice que por lo menos una media en los grupos es diferente (Anexo C).

Para establecer el conjunto de datos que presentan diferencia, se realizó el test de Tukey a 95% de confianza, observándose que el extracto de *S. serrata* a una concentración de 600, 800 y 1000 ppm, junto con aspirina a 200 ppm, no presentan diferencias significativas entre si respecto a su

actividad citotóxica, al igual que los extractos de *S. serrata* a 200 y 400 ppm. Sin embargo, entre ambos conjuntos de datos, si se aprecian diferencias significativas. Esto demuestra que la relación directamente proporcional entre la concentración del extracto y su actividad citotóxica no es tan fuerte como la que existe en la actividad antiinflamatoria. Cabe destacar la observación de que el extracto de *S. serrata* a 1000 ppm y aspirina a 200 ppm no presentan diferencias significativas entre sí, por cuanto podría decirse que presentan una actividad citotóxica similar. Sin embargo, al igual que sucede al analizar la capacidad antiinflamatoria, es necesario quintuplicar la dosis de ácido acetilsalicílico haciendo uso de extracto de *S. serrata* para obtener un resultado similar, razón por la cual no se considera que tenga una actividad citotóxica importante (Anexo C).

Estos resultados difieren de los obtenidos tras la investigación de otras especies del género *Sigesbeckia*, tal como *Sigesbeckia orientalis*. Se determinó que su extracto metanólico presentaba una fuerte actividad citotóxica en células tumorales murinas, y que uno de los compuestos aislados, pubetalina, presentó un IC₅₀ de 0.45 ppm para células tumorales murinas, 0.49 ppm para células tumorales de pulmón humano, y 0.37 ppm para células tumorales de leucemia murina, considerándose una actividad significativa para valores menores o iguales a 4 ppm (Nguyen, 2000, pp. 84-86). En otro estudio que comparó la citotoxicidad de varias fracciones y compuestos obtenidos de *S. orientalis*, se determinó que la fracción de acetato de etilo presentaba una mayor actividad citotóxica, obteniéndose valores de IC₅₀ de 104.9, 97.6, 107.1, 101.6 y 76.6 ppm en células de las líneas HeLa, HepG2, SSMc-7721, Bel-7402 y A549 respectivamente. La fracción etérea mostró una actividad moderada. De entre los compuestos aislados, los más potentes fueron ácido ursólico y quercetina para todas las líneas celulares, con valores de IC₅₀ menores a 50 y 100 µM respectivamente (Yang et al, 2016, pp. 288-293).

La mayor parte de los estudios de citotoxicidad tienen como finalidad evaluar el potencial de un producto natural para prevenir y retrasar la proliferación de células cancerígenas. Numerosos estudios relacionan el desarrollo de las células malignas con procesos de oxidación descontrolados. Así, se ha demostrado que el consumo de sustancias antioxidantes disminuye el riesgo de desarrollo del cáncer, tales como antocianidinas, flavonoides y otros fenoles (Bagchi et al, 2014, pp. 69-73). Por lo tanto, en el caso del extracto hidroalcohólico de *S. serrata*, su poca actividad citotóxica puede ser relacionada con su igual reducida actividad antioxidante, que también explica que no haya presentado una actividad antiinflamatoria significativa, todo esto por no poseer una cantidad importantes de flavonoides y compuestos fenólicos que ejerzan dichas actividades.

CONCLUSIONES:

1. Los parámetros fisicoquímicos de la droga cruda de *Sigesbeckia serrata* se encuentran dentro de los valores de referencia para control de calidad. El extracto etéreo de hojas de *S. serrata* presenta en su composición alcaloides, aceites, grasas y triterpenos. En el extracto etanólico, lactonas y/o cumarinas, alcaloides, triterpenos, taninos de estructura pirocatecólica, catequinas, resinas, flavonoides, antocianidinas y aminoácidos libres, mientras que, en el extracto acuoso, alcaloides, taninos, flavonoides, mucílagos y azúcares reductores.
2. El contenido de fenoles totales cuantificados como equivalentes de ácido gálico en el extracto hidroalcohólico de *S. serrata* fue de 74.48 ± 0.41 mg/g de extracto. El contenido de flavonoides totales cuantificados como equivalentes de quercetina fue de 60.43 ± 1.24 mg/g de extracto.
3. El extracto de *S. serrata* posee una capacidad antioxidante, expresada como porcentaje de captación del radical DPPH, no significativa. Esta capacidad es dependiente de su concentración.
4. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata* a la concentración de 1000 ppm posee una capacidad antiinflamatoria *in vitro*, expresada como porcentaje de inhibición inflamatoria, no significativamente diferente en comparación con el ácido acetilsalicílico a una concentración de 200 ppm. Esta capacidad es dependiente de su concentración. Además, el extracto a las concentraciones de 600, 800 y 1000 ppm posee una capacidad citotóxica *in vitro* expresada como viabilidad celular, no significativamente diferente en comparación con ácido acetilsalicílico a 200 ppm. Esta capacidad es dependiente de su concentración.

RECOMENDACIONES:

- Se debería realizar estudios más profundos de esta especie por su alto contenido en alcaloides, a fin de dilucidar su naturaleza química y posibles actividades biológicas.
- Se deben complementar los estudios de actividad antiinflamatoria a través de otros ensayos, por ejemplo, aquellos realizados *in vivo*, a fin de conocer más acerca de su mecanismo de acción.
- Es necesario complementar los ensayos de actividad antioxidante a través de técnicas diferentes a la utilizada para conocer su mecanismo de acción.
- La identificación de los metabolitos secundarios específicos en la especie investigada es necesaria para poder guiar posteriores estudios sobre sus actividades terapéuticas.

BIBLIOGRAFÍA

Alhakmani, F, et al. “Determination of total phenol, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of seeds and fruits of *Zizyphus spina-christi* grown in Oman”. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [en línea], 2014, n° 4, pp. S656-S660. [Consulta: 10 de enero 2018]. ISSN 2221-1691. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221169115300666>.

Ainsworth, Elizabeth A.; Gillespie, Kelly M. “Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent”. *Nature protocols* [en línea], 2007, vol 2, n° 4, p. 875. [Consulta: 10 de enero 2018]. ISSN 1750-2799. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.102>

Bagchi, Debasis, et al. “Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview”. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [en línea], 2014, vol 768, pp. 69-73. [Consulta: 10 de enero 2018]. ISSN 0027-5107. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510714000700>

Bagozzi, D. *Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales* [en línea]. Centro de Prensa OMS, 2004. [Consulta: 10 enero 2018]. Disponible en: www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/

Bardón, Alicia, et al. “Bioactive plants from Argentina and Bolivia”. *Fitoterapia* [en línea], 2007, vol 78, n° 3, pp. 227-231. [Consulta: 25 de septiembre 2018]. ISSN 0367-326X. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X07000317>

Berridge, M. & Tan, A. “Trans-plasma membrane electron transport: a cellular assay for NADHand NADPH-oxidase based on extracellular, superoxide-mediated reduction of the sulfonated tetrazolium salt WST-1”. *Protoplasma* [en línea], 1998, vol. 205, pp. 74-82. . [Consulta: 10 de enero 2018]. ISSN 1615-6102. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01279296>

Berridge, Michael V, et al. “Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction”. *Biotechnology annual review* [en línea], 2005, vol 11, pp. 127-152. [Consulta: 10 de enero 2018]. ISSN 1387-2656. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1387265605110047>

Bloor, Stephen J. “Overview of methods for analysis and identification of flavonoids”. *Methods in enzymology* [en línea], 2001, vol 335, pp. 3-14. [Consulta: 28 de agosto 2018]. ISSN 0076-6879. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687901352278>

Brand-Williams, Wendy, et al. “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity”. *LWT-Food science and Technology* [en línea], 1995, vol 28, no 1, pp. 25-30. [Consulta: 15 de enero 2018]. ISSN 0023-6438. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>

Brummitt, R.K. “Three species of *Sigesbeckia* in Britain”. *Proc. Bot. Soc. Br. Isl.* [en línea], 1967, vol 7, n° 1, pp 19-21. [Consulta: 15 de enero 2018]. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.665.4907&rep=rep1&type=pdf>

Buttgereit, Frank et al. “Gastrointestinal toxic side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2–specific inhibitors”. *The American journal of medicine* [en línea], 2001, vol. 110, n° 3, pp. 13-19. [Consulta: 15 de enero 2018]. ISSN 0002-9343. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002934300007282>

Concejo Nacional de Planificación del Ecuador. *Plan Nacional para el Buen Vivir 2017-2021* [en línea]. 2017. [Consulta: 10 enero 2018]. Disponible en: https://observatorioplanificacion.cepal.org/sites/default/files/plan/files/Ecuador%20Plan%20Nacional%20para%20el%20Buen%20Vivir%202017-2021_0.pdf

De La Torre, Lucía, et al. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. 1 ed. Quito: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus, 2008.

Elemike, Elias E., et al. “Phytosynthesis of silver nanoparticles using aqueous leaf extracts of *Lippia citriodora*: Antimicrobial, larvicidal and photocatalytic evaluations”. *Materials Science and Engineering: C* [en línea], 2017, vol 75, pp. 980-989. [Consulta: 13 de junio 2018]. ISSN 0928-4931. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493116321580>

Escandón, E. B. *Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo*. 1 ed. México: UAEH; 2003, p.60

Frisancho, Velarde. “Gastropatía por antiinflamatorios no esteroideos”. *Bol. Soc. Peru. Med. Interna*, vol 10, n° 3 (1997) pp. 109-114.

García Bacallao, Lourdes, et al. “Plantas con propiedades antiinflamatorias”. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* [en línea], 2002, vol 21, n° 3, pp. 214-216. [Consulta: 18 de febrero

2018]. ISSN 1561-3011. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002002000300012&script=sci_arttext&tlng=pt

Gómez Estrada, Harold, et al. “Actividad antiinflamatoria de productos naturales”. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas* [en línea], 2011, vol 10, nº 3, pp 182-217. [Consulta: 18 de febrero 2018]. ISSN 0717 7917. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/856/85618379003/>

Guo, Hui, et al. “Comparison of the chemical profiles and inflammatory mediator-inhibitory effects of three Siegesbeckia herbs used as Herba Siegesbeckia (Xixiancao)”. *BMC complementary and alternative medicine* [en línea], 2018, vol 18, nº 1, p. 141. [Consulta: 11 de agosto 2018]. ISSN 1472-6882. Disponible en: <https://bmccomplementaltermmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-018-2205-x>

Heinrich, G., et al. “Glandular hairs of Sigesbeckia jorullensis Kunth (Asteraceae): morphology, histochemistry and composition of essential oil”. *Annals of Botany* [en línea], 2002, vol 89, nº 4, pp. 459-469. [Consulta: 11 de agosto 2018]. ISSN 1095-8290. Disponible en: <https://academic.oup.com/aob/article/89/4/459/200379>

Hennebelle, Thierry, et al. “Ethnopharmacology of Lippia alba”. *Journal of ethnopharmacology* [en línea], 2008, vol 116, nº 2, pp. 211-222. [Consulta: 11 de agosto 2018]. ISSN 0378-8741. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874107006447>

Hong, Yong-Han, et al. “Anti-inflammatory effects of Siegesbeckia orientalis ethanol extract in in vitro and in vivo models”. *BioMed research international* [en línea], 2014, vol. 14, pp. 1-10. [Consulta: 11 de agosto 2018]. ISSN 329712. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/329712/abs/>

Kang, et al. “Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea”. *Journal of ethnopharmacology* [en línea], 2003, vol 87, nº 2-3, pp. 231-236. [Consulta: 11 de agosto 2018]. ISSN 0378-8741. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103001429>

Karadag, Ayse, et al. “Review of methods to determine antioxidant capacities”. *Food analytical methods* [en línea], 2009, vol 2, nº 1, pp. 41-60. [Consulta: 11 de agosto 2018]. ISSN 1936-976X. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-008-9067-7>

Kennedy, Alan. *The Inflammatory Response* [en línea]. The Crohnie, 2015. [Consulta: 10 enero 2018]. Disponible en: <http://primer.crohn.ie/the-inflammatory-response>.

Kim, Jae Yeon et al. “In vitro anti-inflammatory activity of 3-O-methyl-flavones isolated from *Siegesbeckia glabrescens*”. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* [en línea], 2008, vol 18, nº 4, p. 1511-1514. [Consulta: 19 de agosto 2018]. ISSN 0960-894X. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X07015119>

Li, Hua, et al. “In vitro antiinflammatory activity of a new sesquiterpene lactone isolated from *Siegesbeckia glabrescens*”. *Phytotherapy Research* [en línea], 2011, vol 25, nº 9, pp. 1323-1327. [Consulta: 19 de agosto 2018]. ISSN 1099-1573. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.3420>

Manjusha, Vanna; Merugu, Manasa. “Spectrophotometric estimation of antioxidant activity of *Siegesbeckia orientalis* plant extracts by hydrogen peroxide scavenging method”. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* [en línea], 2017, vol 6, nº 7, pp. 1526-1531. [Consulta: 19 de agosto 2018]. ISSN 2278-4357. Disponible en: <http://www.wjpps.com/download/article/1498820888.pdf>

Masache Galván, César Augusto. *Análisis estratégico sobre el consumo y comercialización de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos genéricos y de marca en el Distrito Metropolitano de Quito* (Tesis). (Maestría) Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Maestría en Planificación y Dirección Estratégica, Quito, Ecuador. 2016, pp. 7-17.

Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency. *Sigesbeckia* [en línea]. 2015. [Consulta: 26 julio 2018]. Disponible en: <http://www.sigesbeckia.com/>.

Miguel, Maria Graça. “Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review”. *Molecules* [en línea], 2010, vol 15, nº 12, pp. 9252-9287. [Consulta: 19 de agosto 2018]. ISSN 1420-3049. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/15/12/9252>

Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba MINSAP. *Normas Ramales de Drogas crudas, extractos y tinturas*. NRSP, 1992, p. 309.

Miranda, M. *Farmacognosia y productos naturales*. La Habana: F. Varela, 2006, pp. 20-50

Morera Salas, Melvin, et al. “Consumo de antiinflamatorios no esteroideos en atención primaria en Costa Rica: evolución y variabilidad geográfica”. *Gaceta Sanitaria* [en línea], 2007, vol 21, nº 6, pp. 458-464. [Consulta: 15 de enero 2018]. ISSN 0213-9111. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-91112007000600004

Muséum national d’Histoire naturelle. *Sigesbeckia serrata DC* [en línea]. París: 2018. [Consulta: 26 julio 2018]. Disponible en: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/123360/tab/taxo.

Nguyen, Hai Nam. “Cytotoxic principle of *Siegesbeckia orientalis* growing in Vietnam”. *Journal of Chemistry* [en línea], 2000, vol 38, n° 4, pp. 84 – 86. [Consulta: 30 de agosto 2018]. ISSN 0213-9111. Disponible en:

<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/mrmc/2006/00000006/00000008/art00010>

Nikolova, M.; Dzhurmanski, A. “Evaluation of free radical scavenging capacity of extracts from cultivated plants”. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* [en línea], 2009, vol 23, n° sup 1, pp. 109-111. [Consulta: 30 de agosto 2018]. ISSN 10622. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13102818.2009.10818377>

Nwaogu, Linus, et al. “Chemical composition of *Siegesbeckia orientalis*: A valuable, but less known ethnomedicinal plant”. *Biokemistri* [en línea], 2017, vol 29, n° 2, pp. 54-60. [Consulta: 30 de agosto 2018]. ISSN 0795-8080. Disponible en: <http://nisebpublications.org/index.php/BKM/article/view/79>

Ochoa Pacheco, Ania, et al. “Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de hojas frescas de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana”. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* [en línea], 2013, vol 44, n° 1, pp. 52-59. [Consulta: 14 de marzo 2018]. ISSN 1870-0195. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-01952013000100007&script=sci_arttext

Ortiz-Pereda, Vicente, et al. “Antiinflamatorios no esteroideos y paracetamol en el tratamiento del dolor”. *Gaceta Médica de Bilbao* [en línea], 2007, vol 104, n° 4, pp. 148-155. [Consulta: 14 de enero 2018]. ISSN 0304-4858. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030448580774595X>

Peñaherrera, Eugenia, et al. “Efecto antiinflamatorio de extractos metanólicos de plantas de Azuay y Loja (Ecuador) a través del modelo de Peces Cebra”. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, vol 1390, n° 14 (2016) pp. 1-12.

Rathee, Permender, et al. “Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review”. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)* [en línea], 2009, vol 8, n° 3, pp. 229-235. [Consulta: 17 de agosto 2018]. ISSN 1871-5281. Disponible en: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/iadt/2009/00000008/00000003/art00008>

Schinella, G. R., et al. “Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts”. *Life sciences* [en línea], 2002, vol 70, n° 9, pp. 1023-1033. [Consulta: 17 de agosto 2018]. ISSN 0024-3205. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320501014825>

Seager, J. M.; Hawkey, C. J. “Indigestion and non-steroidal anti-inflammatory drugs. (ABC of the upper gastrointestinal tract)”. *British Medical Journal* [en línea], 2001, vol 323, n° 7323, pp. 1236-1240. [Consulta: 13 de febrero 2018]. ISSN 3102371. Disponible en: <http://go.galegroup.com/ps/anonymous?id=GALE%7CA80802154&sid=googleScholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=17592151&p=AONE&sw=w>

Selassie, Cynthia D., et al. “Cellular apoptosis and cytotoxicity of phenolic compounds: a quantitative structure– activity relationship study”. *Journal of medicinal chemistry* [en línea], 2005, vol 48, n° 23, pp. 7234-7242. [Consulta: 18 de febrero 2018]. ISSN 6122773. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm050567w>

Suárez, A. *Validación y Mitos de Plantas Medicinales* [en línea]. Loja: UTPL, 2015. [Consulta: 10 enero 2018]. Disponible en: <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/bitstream/28000/4851/2/Anexo%20Validación%20y%20Mitos%20de%20Plantas%20Medicinales.pdf>

Tan, A. & Berridge, M. “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”. *Journal of Immunological Methods* [en línea], 2000, vol 238, n° 1-2, pp. 59-68. [Consulta: 18 de enero 2018]. ISSN 0022-1759. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175900001563>

Tinitana, Fani, et al. “Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador”. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine* [en línea], vol 12, n° 1, p. 29. [Consulta: 18 de enero 2018]. ISSN 1746-4269. Disponible en: <https://ethnobiomed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13002-016-0100-4>

Vibrans, H. *Sigesbeckia jorullensis* [en línea]. México: Malezas de México, 2009. [Consulta: 10 enero 2018]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/sigesbeckia-jorullensis/fichas/ficha.htm>

Villalba Herrera, Ericka. “Inflamacion I”. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, vol 43, (2014) p. 2261.

Wang, Jian-ping, et al. “Topical anti-inflammatory and analgesic activity of kirenol isolated from *Sigesbeckia orientalis*”. *Journal of ethnopharmacology* [en línea], 2011, vol 137, n° 3, pp. 1089-1094. [Consulta: 20 de agosto 2018]. ISSN 0378-8741. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111004922>

World Health Organization, et al. *Quality control methods for medicinal plant materials*. 1998, pp. 7-11.

Yang, Yuan, et al. “Biological activity of extracts and active compounds isolated from *Siegesbeckia orientalis* L”. *Industrial crops and products* [en línea], 2016, vol 94, pp. 288-293. [Consulta: 20 de agosto 2018]. ISSN 0926-6690. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016305362>

ANEXOS

ANEXO A. Actividad antioxidante

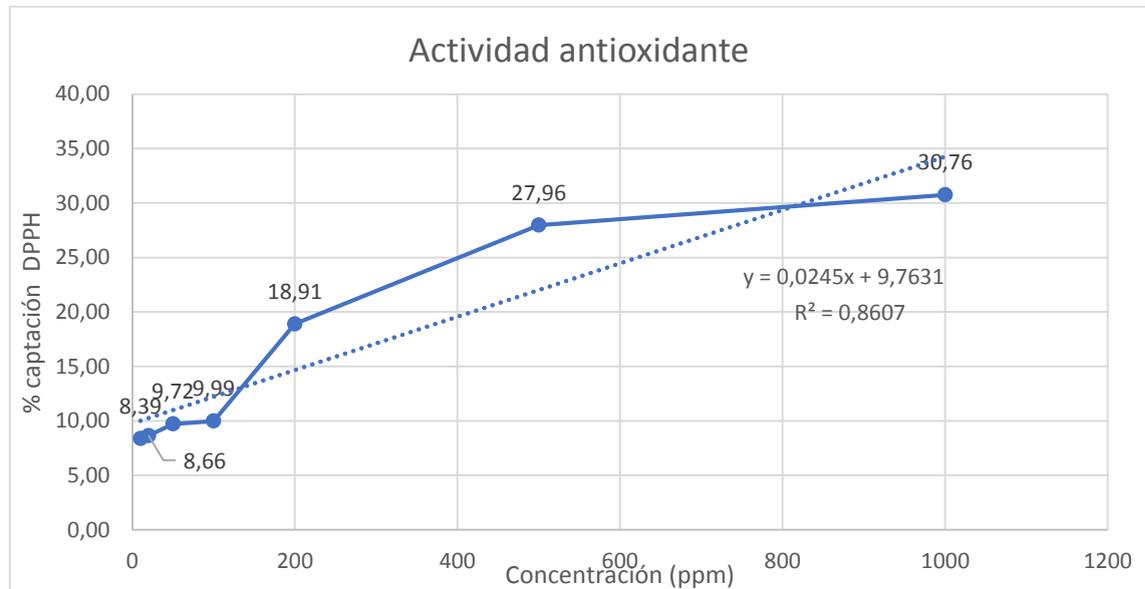


Gráfico 1-A: Actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*, con línea de tendencia

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO B. Análisis estadístico de la actividad antiinflamatoria

Tabla 1-B: Prueba de ANOVA de un factor para actividad antiinflamatoria de *S. serrata*

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores
Factor 6 1000 ppm, 800 ppm, 600 ppm, 400 ppm, 200 ppm, ASP 200

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	7274.94	1454.99	393.75	0.000
Error	12	44.34	3.70		
Total	17	7319.28			

Realizado por: María José Rivera, 2018.

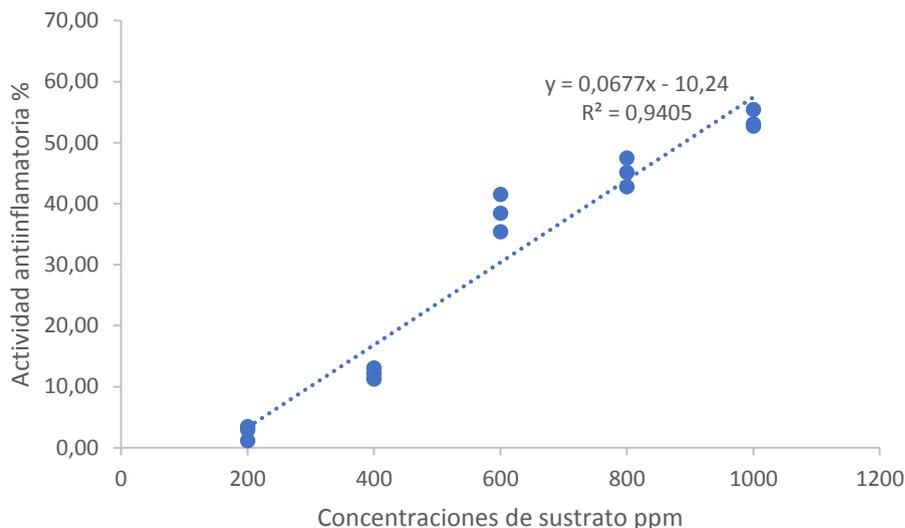


Gráfico 1-B: Actividad antiinflamatoria del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*, con línea de tendencia.

Realizado por: María José Rivera, 2018

Tabla 2-B: Test de Tukey para actividad antiinflamatoria de *S. serrata*

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1000 ppm	3	53.733	1.490	(51.315, 56.151)
800 ppm	3	45.10	2.36	(42.69, 47.52)
600 ppm	3	38.44	3.06	(36.02, 40.85)
400 ppm	3	12.130	0.910	(9.712, 14.548)
200 ppm	3	2.513	1.208	(0.095, 4.931)
ASP 200	3	54.590	1.669	(52.172, 57.008)

Desv.Est. agrupada = 1.92229

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
ASP 200	3	54.590	A
1000 ppm	3	53.733	A
800 ppm	3	45.10	B
600 ppm	3	38.44	C
400 ppm	3	12.130	D
200 ppm	3	2.513	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Realizado por: María José Rivera, 2018.

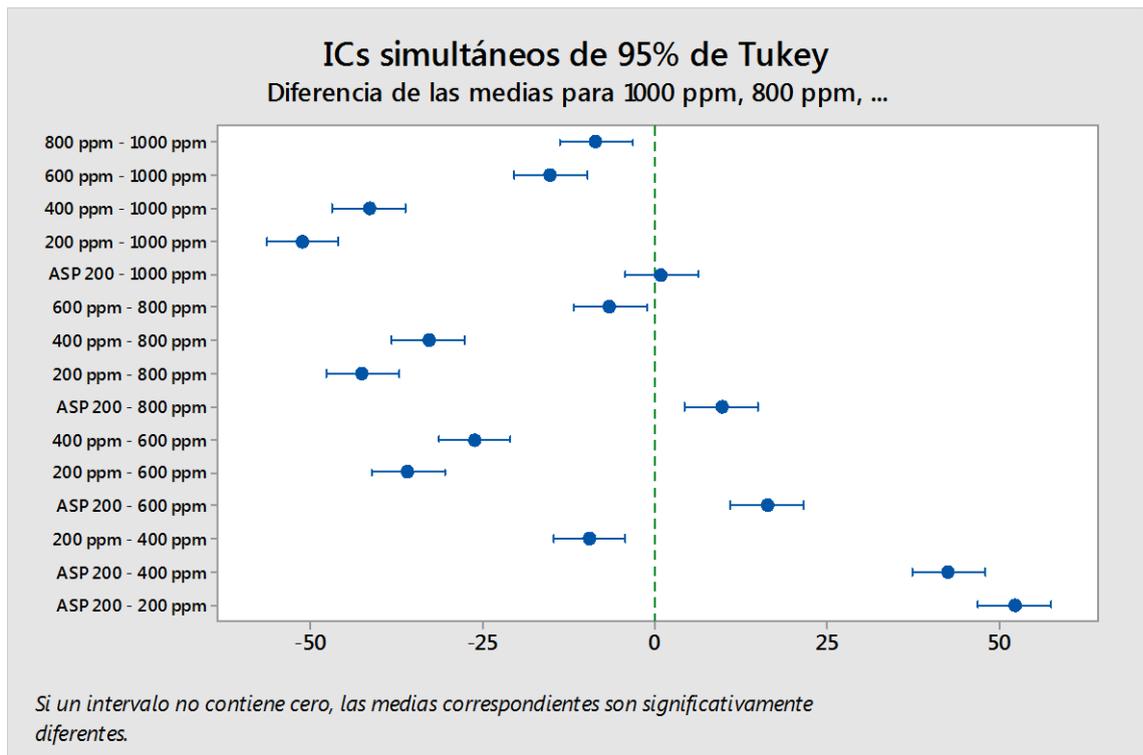


Gráfico 2-B: ICs simultáneos de 95% de Tukey para actividad antiinflamatoria de *S. serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO C. Análisis estadístico de la actividad citotóxica

Tabla 1-C: Prueba de ANOVA de un factor para actividad citotóxica de *S. serrata*

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	1000 ppm, 800 ppm, 600 ppm, 400 ppm, 200 ppm, ASP 200

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	4554.0	910.79	20.23	0.000
Error	12	540.2	45.02		
Total	17	5094.2			

Realizado por: María José Rivera, 2018

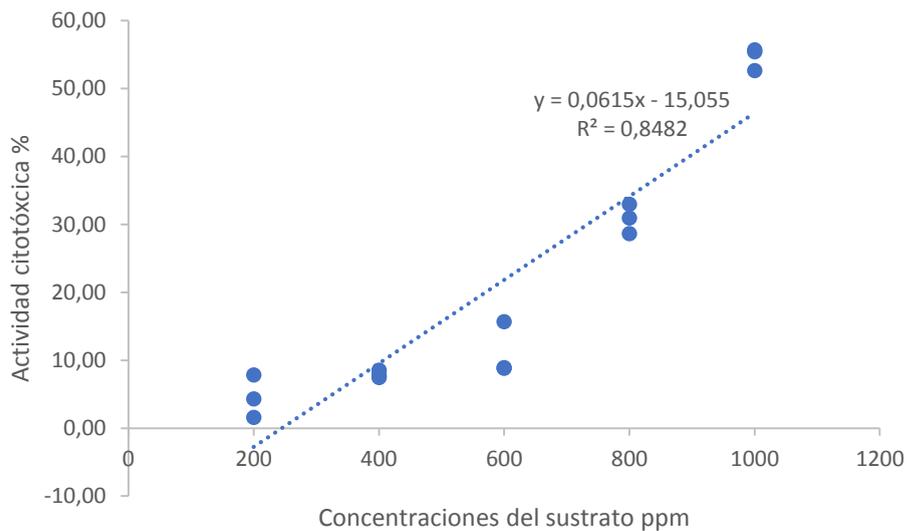


Gráfico 1-C: Actividad citotóxica del extracto hidroalcohólico de hojas de *Sigesbeckia serrata*, con línea de tendencia

Realizado por: María José Rivera, 2018.

Tabla 2-C: Test de Tukey para actividad citotóxica de *S. serrata*

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
1000 ppm	3	71.73	3.77	(63.29, 80.17)
800 ppm	3	69.52	4.52	(61.08, 77.96)
600 ppm	3	71.44	13.98	(63.00, 79.88)
400 ppm	3	98.81	4.18	(90.37, 107.25)
200 ppm	3	99.97	3.65	(91.53, 108.41)
ASP 200	3	56.83	3.05	(48.39, 65.27)

Desv.Est. agrupada = 6.70971

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
200 ppm	3	99.97	A
400 ppm	3	98.81	A
1000 ppm	3	71.73	B
600 ppm	3	71.44	B
800 ppm	3	69.52	B
ASP 200	3	56.83	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Realizado por: María José Rivera, 2018.

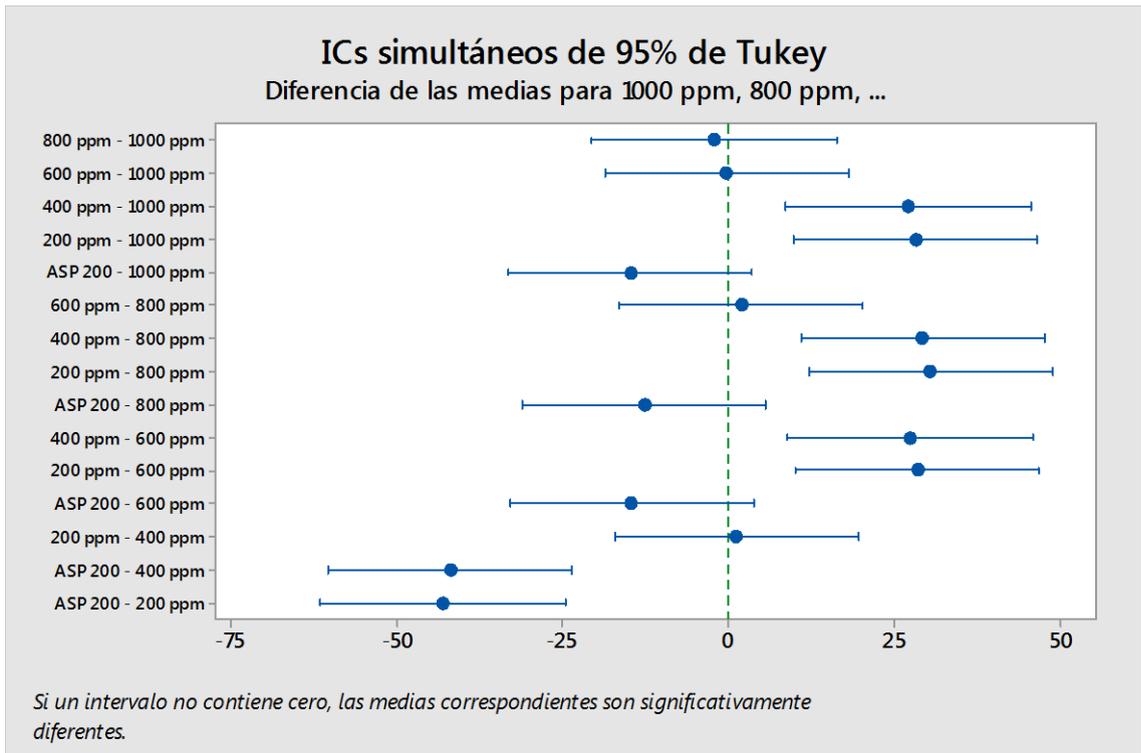


Gráfico 2-C: ICs simultáneos de 95% de Tukey para actividad antiinflamatoria de *S. serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO D. Droga cruda de *Sigesbeckia serrata*



Figura 1-D: Droga cruda de *Sigesbeckia serrata*

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO E. Control de calidad de droga cruda



Figura 1-E: Control de calidad de droga cruda

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO F. Control de calidad de extracto hidroalcohólico

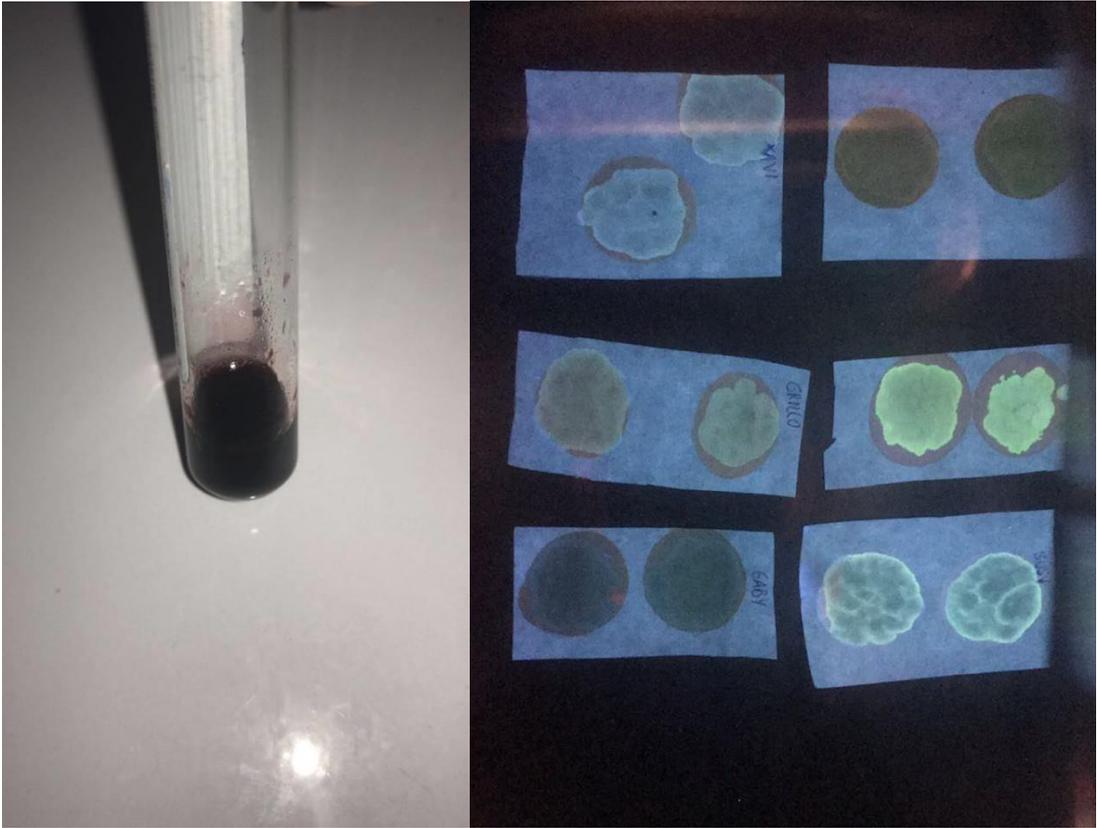


Figura 1-F: Control de calidad de extracto alcohólico

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO G. Tamizaje fitoquímico







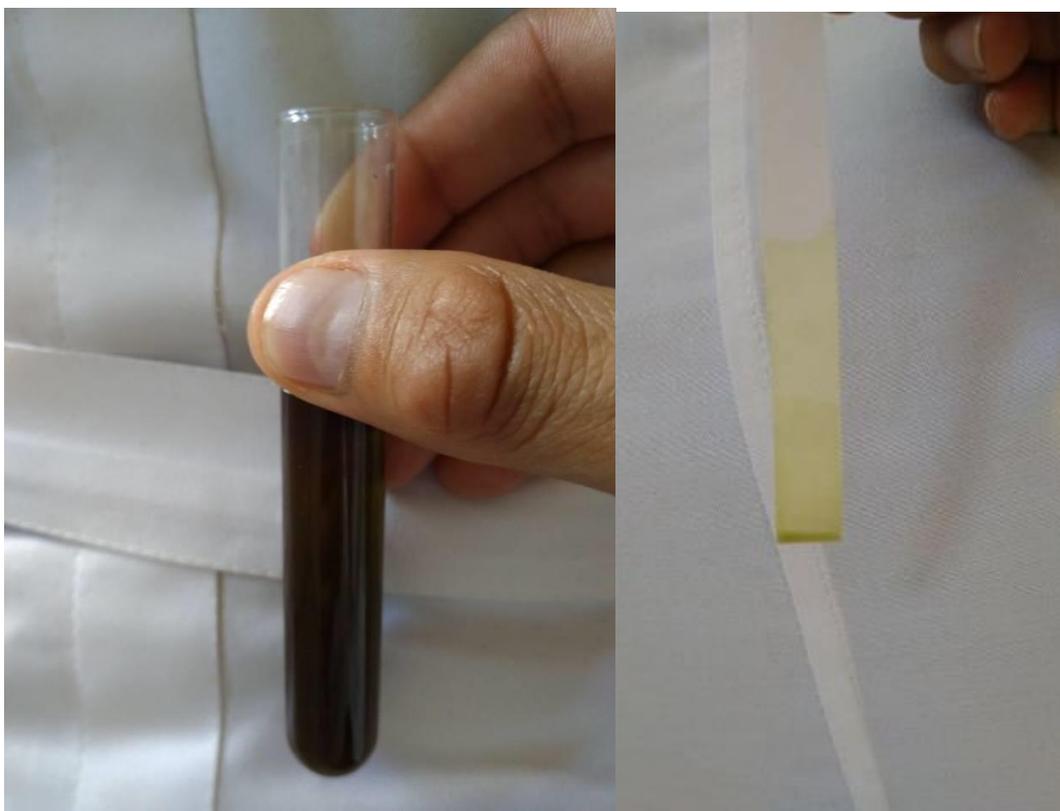
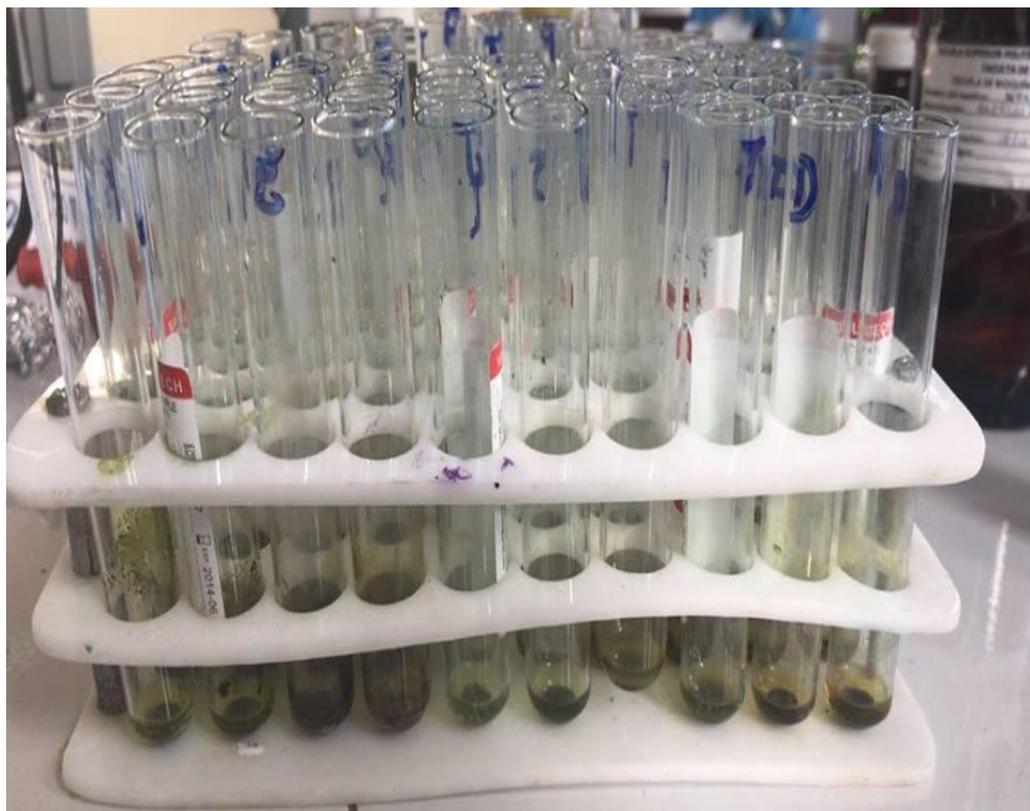


Figura 1-G: Tamizaje fitoquímico

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO H. Preparación de extractos



Figura 1-H: Preparación de extractos

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO I. Cuantificación de fenoles y flavonoides

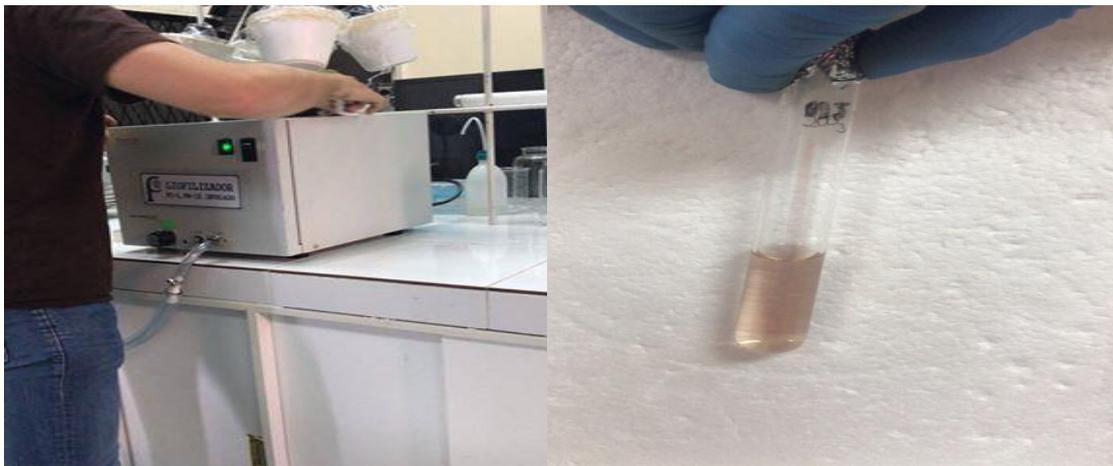


Figura 1-I: Cuantificación de fenoles y flavonoides

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO J. Obtención de neutrófilos aislados

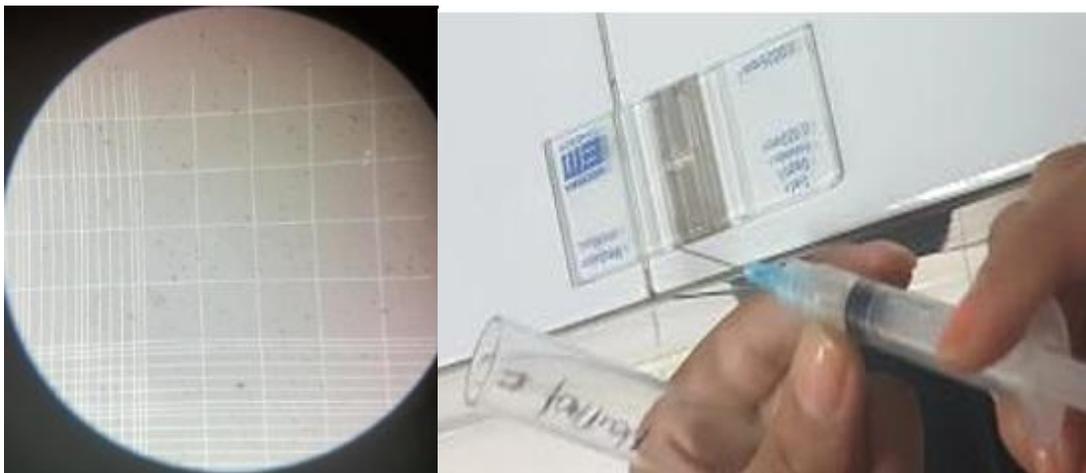
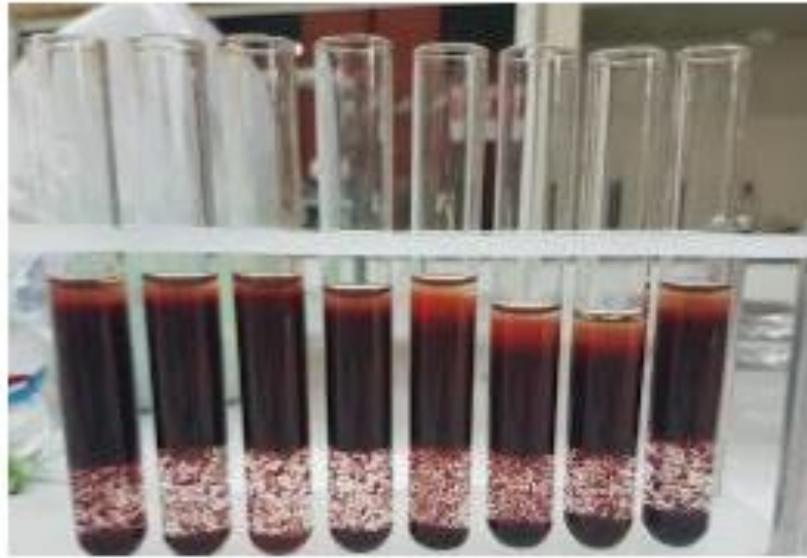


Figura 1-J: Obtención de neutrófilos aislados

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO K. Actividad citotóxica

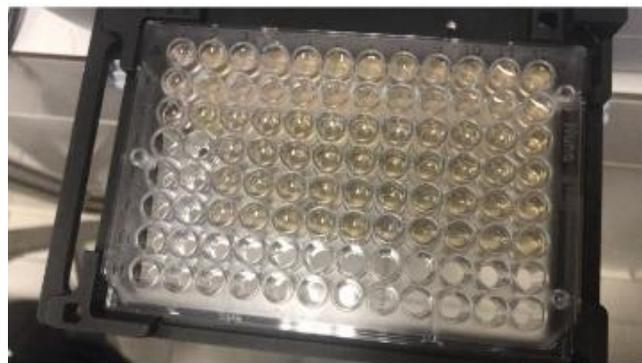


Figura 1-K: Actividad citotóxica

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO L. Actividad antiinflamatoria





Figura 1-L: Actividad antiinflamatoria

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO M. Actividad antioxidante

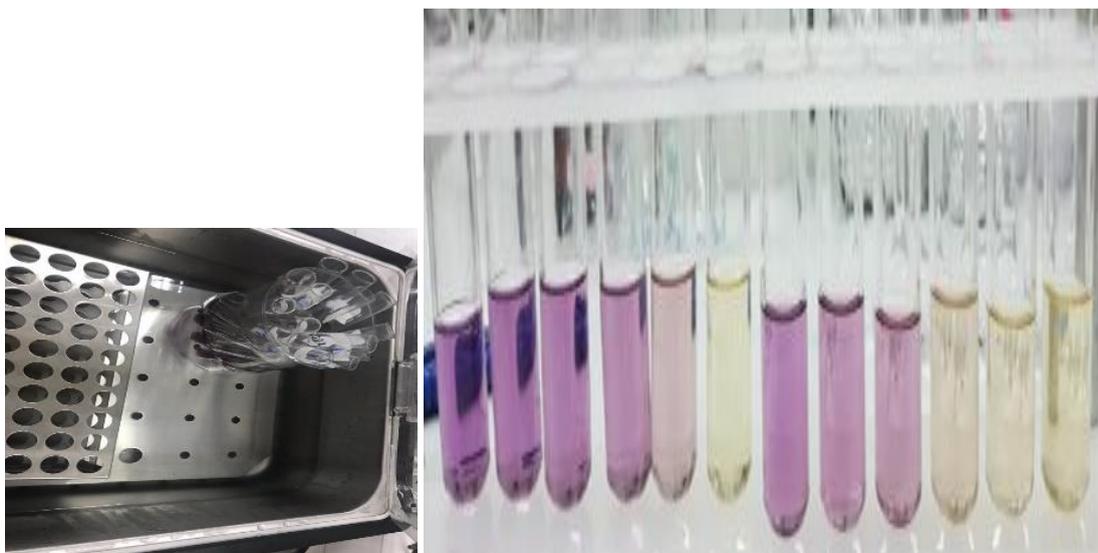
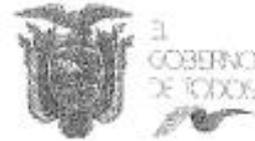


Figura 1-M: Actividad antioxidante

Realizado por: María José Rivera, 2018.

ANEXO N. Patente no comercial de manejo de flora silvestre

MINISTERIO DEL AMBIENTE



PATENTE NO COMERCIAL DE MANEJO DE FLORA SILVESTRE

HERBARIO: 005-2018-VS-DPL-MAE
Loja, 12 de julio de 2018

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere: El Código Orgánico del Ambiente, autoriza al: **Ing. Zhofre Aguirre Mendoza** con Cl. 110247006-7, Director del Herbario y Jardín Botánico "Reinaldo Espinosa" de la Universidad Nacional de Loja, para que realice en el país manejo y conservación "HERBARIO" con fines de préstamo, donación e intercambio con otros herbarios (exportación-importación) colección, investigación y educación; ubicado en la Argelia predios de la Ciudadela Universitaria, parroquia Punzara, cantón y provincia de Loja, de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Datos Generales

- 1.- Nombre de la empresa: **Herbario de la Universidad Nacional de Loja**
- 2.- Representante Legal: **Ing. Zhofre Aguirre Mendoza**
- 3.- Nacionalidad: **ecuatoriana**
- 4.- Domicilio legal: **Ciudadela Universitaria La Argelia.**
- 5.- Teléfono: **072547275**
- 6.- Domicilio: **Federico Chopin y Juan José Castillo (ciudadela Juan José Castillo-Loja)**

Especificaciones

- 1.- Solicitud de Patente dirigida a la Dirección Provincial: **Ing. Zhofre Aguirre Mendoza Director del Herbario y Jardín Botánico "Reinaldo Espinosa".**
- 2.- Complementos autorizados de manejo: préstamo, donación e intercambio (exportación-importación), investigación, colección exhibición y educación.
- 3.- Contraparte institucional del Ministerio del Ambiente: **Dirección Provincial Ambiental Loja**
- 4.- Responsabilidad técnica delegada por el Ministerio del Ambiente: **Blga. Guadalupe Calle Cueva.**
- 5.- Duración: **1 año – del 12 de julio del 2018 al 11 de julio del 2019**
- 6.- **Obligaciones del beneficiario:**
 - 6.1.- Llevar un registro completo de actividades realizadas.
 - 6.2.- Presentar un informe anual para la renovación de la patente y aquella que fuera requerida Por la autoridad en el transcurso del año, incluyendo la planificación de trabajo para el próximo año.
 - 6.3.- Regirse a las disposiciones citadas al reverso del presente documento.
 - 6.4.- Facilitar información y permitir el acceso de los funcionarios del Ministerio del Ambiente a sus instalaciones para el respectivo control.

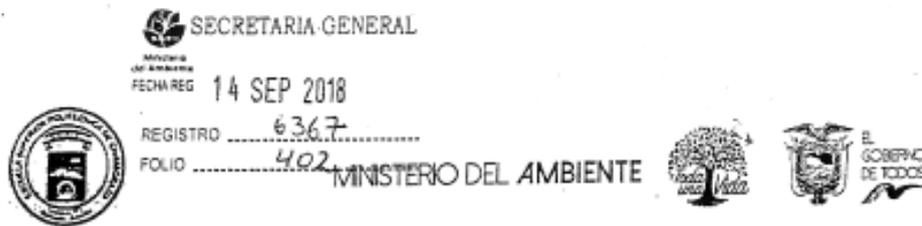
Ing. Victor Hugo Dominguez Esparza

COORDINADOR GENERAL ZONAL- ZONA 7 (LOJA, EL ORO Y ZAMORA CHINCHIPE)
DIRECTOR PROVINCIAL DE LOJA (SUBROGANTE)

VHDE/gcc/fo



ANEXO O. Contrato marco de acceso a los recursos genéticos entre Ministerio de Ambiente y ESPOCH



CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" CELEBRADO ENTRE EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, A TRAVÉS DE LA SUBSECRETARÍA DE PATRIMONIO NATURAL Y LA ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

MAE-DNB-CM-2018-0086

COMPARECIENTES:

A la suscripción del presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos del Programa de Investigación Científica Denominado: "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" comparecen, por una parte el MINISTERIO DEL AMBIENTE, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el LCDO. LÓPEZ MORA ALFREDO DANILO, en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, conforme se desprende de la Acción de Personal Nro. 0945 de 02 de mayo de 2018, delegado de la máxima autoridad mediante Acuerdo Ministerial Nro. 024 de 09 de marzo de 2016, publicado en el Registro Oficial Nro. 725 de 04 de abril de 2016, a quien en adelante se le denominará "MAE"; y, por otra parte, la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, debidamente representada por el Ing. BYRON ERNESTO VACA BARAHONA PhD., en su calidad de Rector, conforme consta del certificado emitido por el Ab. Carlos de la Cadena, Secretario General, documento que se agrega como habilitante y a quien en adelante se denomina "ESPOCH".

Las partes convienen en celebrar, el presente Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos respecto de la solicitud del programa de investigación científica denominado "ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD EN EL ECUADOR, ECOLOGÍA, CONSERVACIÓN Y SU POTENCIAL USO SOSTENIBLE" contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES.-

1. La Constitución de la República del Ecuador, en los artículos 3 numeral 7 establece que son deberes primordiales del Estado "(...)7. Proteger el patrimonio natural y cultural del país. (...) " y 83 numerales 6 y 13 establece como deberes y responsabilidades de las ecuatorianas y los ecuatorianos "(...) 6. Respetar los derechos de la naturaleza, preservar un ambiente sano y utilizar los recursos naturales de modo racional, sustentable y sostenible (...) 13. Conservar el patrimonio cultural y natural del país, y cuidar y mantener los bienes públicos (...)";
2. El artículo 14 de la Norma Suprema determina que: "...Se reconoce el derecho de la



*población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, **sumak kawsay**. Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados...* (lo destacado en negrillas es propio);

3. El numeral 27 de la Carta Magna prevé que: *"...Se reconoce y garantizará a las personas: el derecho a vivir en un ambiente sano, ecológicamente equilibrado, libre de contaminación y en armonía con la naturaleza. Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados...";*
4. El artículo 74 de la misma Norma Suprema preceptúa que: *"Las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades tendrán derecho a beneficiarse del ambiente y de las riquezas naturales que les permitan el buen vivir. Los servicios ambientales no serán susceptibles de apropiación; su producción, prestación, uso y aprovechamiento serán regulados por el Estado";*
5. Los artículos 275 y 276 del mismo cuerpo legal, señalan en su parte pertinente, respectivamente, que: *"...El régimen de desarrollo es el conjunto organizado, sostenible y dinámico de los sistemas económicos, políticos, socio-culturales y ambientales, que garantizan la realización del buen vivir, del **sumak kawsay**. El buen vivir requerirá que las personas, comunidades, pueblos y nacionalidades gocen efectivamente de sus derechos, y ejerzan responsabilidades en el marco de la interculturalidad, del respeto a sus diversidades, y de la convivencia armónica con la naturaleza y, el régimen de desarrollo tendrá como uno de sus objetivos, el siguiente: "...recuperar y conservar la naturaleza y mantener un ambiente sano y sustentable que garantice a las personas y colectividades el acceso equitativo, permanente y de calidad al agua, aire y suelo, y a los beneficios de los recursos del subsuelo y del patrimonio natural....";*
6. El tercer inciso del artículo 313 de la Constitución de la República determina que: *"...Se consideran sectores estratégicos la energía en todas sus formas, las telecomunicaciones, los recursos naturales no renovables, el transporte y la refinación de hidrocarburos, la biodiversidad y el patrimonio genético, el espectro radioeléctrico, el agua, y los demás que determine la ley...". (lo destacado en negrillas y subrayado es propio);*
7. El artículo 322 *ibídem* establece que *"...Se reconoce la propiedad intelectual de acuerdo con las condiciones que señale la ley. Se prohíbe toda forma de apropiación de conocimientos colectivos, en el ámbito de las ciencias, tecnologías y saberes ancestrales. Se prohíbe también la apropiación sobre los recursos genéticos que contienen la diversidad biológica y la agro-biodiversidad...";*

